

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MARCOS HENRIQUE LUCIANO SILVEIRA

***PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM CO₂ SUPERCRÍTICO NA
PRESENÇA DE ETANOL E LÍQUIDO IÔNICO: PRÉ-OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS
DO PROCESSO E AVALIAÇÃO DA ACESSIBILIDADE DOS SUBSTRATOS
PRODUZIDOS***

CURITIBA

2014

MARCOS HENRIQUE LUCIANO SILVEIRA

**PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM CO₂ SUPERCRÍTICO NA
PRESENÇA DE ETANOL E LÍQUIDO IÔNICO: PRÉ-OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS
DO PROCESSO E AVALIAÇÃO DA ACESSIBILIDADE DOS SUBSTRATOS
PRODUZIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química, Sub-Área de Química Orgânica.

Orientador: Dr. Luiz Pereira Ramos

**CURITIBA
2014**

D795p Silveira, Marcos Henrique Luciano
Pré-tratamento de bagaço de cana com CO₂ supercrítico na presença de etanol e líquido iônico: pré-otimização das variáveis do processo e avaliação da acessibilidade dos substratos produzidos. / Marcos Henrique Luciano Silveira. – Curitiba, 2014.
178f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Luiz Pereira Ramos.
Bibliografia: p. 111-130.

1. Cana-de-açúcar. 2. Bagaço de cana. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.

CDD: 547

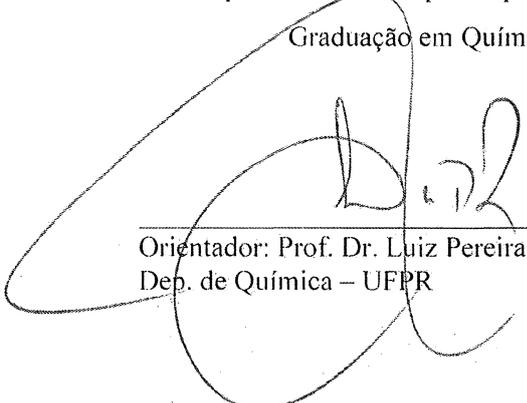
TERMO DE APROVAÇÃO

PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM CO₂ SUPERCRÍTICO NA PRESENÇA
DE ETANOL E LÍQUIDO IÔNICO: PRÉ-OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO E
AVALIAÇÃO DA ACESSIBILIDADE DOS SUBSTRATOS PRODUZIDOS

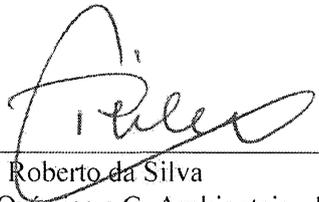
por

MARCOS HENRIQUE LUCIANO SILVEIRA

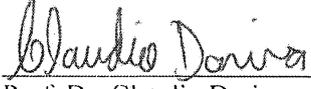
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



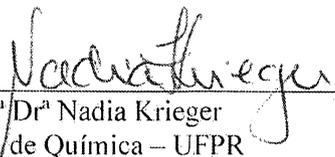
Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



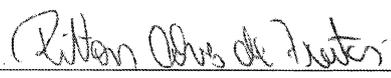
Prof. Dr. Roberto da Silva
Dep. de Química e C. Ambientais - UNESP



Prof. Dr. Claudio Dariva
Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais - UNIT



Profª/Drª Nadia Krieger
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Com satisfação que agradeço às pessoas que participaram do meu doutoramento nestes últimos 4 anos, sem vocês esta história não seria a mesma, portanto, **MUITO OBRIGADO**.

Inicialmente a Deus, que me proporcionou esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal, colocando pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, Onésio e Véra, que conseguiram com muita dedicação e esforço me proporcionar os melhores ensinamentos possíveis, de verdade, determinação e amor ao próximo, para que eu pudesse sempre buscar meus objetivos da melhor maneira.

À minha irmã Magali (Comadre), que é uma referencia de determinação para mim desde que eu ainda era criança, e meu cunhado (Compadre) e Valentina (Deuxtlânia), pelo amor e carinho.

À minha família, por sempre estar presente orando por mim, por mais distante que eu estivesse. Em especial à Marli, Marlene, vô Jorge, vó “Valdinha”. Todos vocês fazem parte disso. Amo vocês.

À minha noiva Suelen, por me apoiar, por me dar forças para buscar meus objetivos quando tudo parecia conspirar contra, por possibilitar que eu me sentisse completo ao seu lado, nos momentos fáceis ou difíceis, me dando amor para que eu pudesse seguir em frente. Te amo.

Ao professor Luiz Pereira Ramos, primeiramente pelas inúmeras oportunidades de aprendizado, pelos conselhos, pelas discussões científicas que muito me fizeram crescer, pelo apoio, por ser o meu referencial em minha carreira e acima de tudo pela amizade que construímos ao longo destes anos.

Aos meus amigos, Lucas, Edson, Richard, Eduardo Ribeiro (compadre), Felipe, Dion, Rodrigo, Henry Montecino, Eduardo Paiva, Marcos Santos (Metrohm), ao João Carvalho, pela amizade sempre benevolente, pelos conselhos e inúmeros momentos de descontração, por mais distante que eu estivesse.

Aos *Baggers* Julen Ibabe, Timo Kärkäs e Ander Amasorrain, que foram grandes companheiros enquanto estive na Finlândia, me proporcionando a possibilidade de compartilhar grandes momentos.

Aos meus amigos do CEPESQ, pelo convívio diário e contribuições para a realização destes trabalhos, em especial para Bruno Vanelli, Rodrigo Aguiar, Ana Paula Pitarelo, Luana Chiarello, Priscila Neves, Douglas Fockink, Tatyana Casagrande, Edilson, Thiago Michel Prado, Alexis Escorsim, Luis Kanda e Fabiane Hamerski.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFPR, que me proporcionaram crescimento profissional ao longo do meu doutoramento, seja através de disciplinas, seminários ou de uma simples conversa, em especial aos professores Claudiney Cordeiro e Sonia Zawadzki, esta última por participou desde a minha entrevista de ingresso no programa, da avaliação dos meus relatórios parciais, de qualificação e da minha banca de defesa final, e ao professor.

Aos professores do departamento de Engenharia Química da UFPR, Papa Matar Ndiaye e Marcos Lúcio Corazza, que sempre me ajudaram no laboratório quando eu precisei e pela amizade. Em especial ao meu chará, que foi meu co-orientador de doutorado e me recebeu muito bem em suas instalações.

Aos pesquisadores Matti Siika-Aho e Kristiina Kruus, pela orientação e amizade enquanto estive na Finlândia.

Ao CNPq e a CAPES, pelo suporte financeiro.

“...ainda que muito me falte talento, agarrei-me na vontade de persistir, ainda que muito me falte genialidade, segurei-me na dedicação do aprendizado, ainda que muito me falte o brilho, debrucei-me na fé dos humildes...”

Carlos Vitor dos Santos Mailart

RESUMO

Uma nova tecnologia de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar foi desenvolvida empregando dióxido de carbono supercrítico e etanol ($scCO_2/EtOH$) na presença de acetato de 1-butil-metil-imidazólio (Bmim[OAc]). Os experimentos foram realizados por 2 h variando a temperatura (110 a 180 °C), a pressão (195 a 250 bar) e a quantidade de Bmim[OAc] em relação à massa seca de material (0:1 a 1:1 Bmim[OAc]/bagaço). De acordo com os resultados, a concentração de Bmim[OAc] e a pressão do sistema favorecem a deslignificação e o aumento no teor de anidroglicose no substrato, ao passo que o aumento da temperatura favorece a diminuição no teor de anidroxilose no substrato. Os melhores resultados proporcionaram 41 % de deslignificação gerando um substrato com teor de 74 % de polissacarídeos. Como resultado da deslignificação, ocorreu o aumento da acessibilidade do substrato à hidrólise enzimática, que gerou conversão de 70 % de glucanas em glicose e 92 % de xilanas em xilose após 12 h de reação quando empregados 10 mg g⁻¹ de Cellic CTec2[®] (Novozymes) por substrato seco. Os líquidos iônicos (LI) contendo ânion acetato foram mais fáceis de recuperar após o pré-tratamento com $scCO_2/EtOH$ do que o LI contendo ânion cloreto, onde o emprego de Bmim[Cl] resultou em retenção de 25 % da massa inicial de LI no material, fato que levou a inativação das enzimas. Além disso, os LIs Bmim[OAc] e Emim[OAc] deslignificaram mais o material do que o Bmim[Cl], apresentando 42 %, 44 % e 36 % de deslignificação, respectivamente. Comportamento similar foi obtido para aumentos na distância interfibrilar de 44 %, 49 % e 9 %, e na largura do cristal de 17 %, 20 % e 9 %, respectivamente, ao passo que não foram encontradas variações estatisticamente significativas para os valores de índice de cristalinidade (CrI_{WAXS}). A acessibilidade dos substratos à hidrólise foi investigada mediante avaliação da capacidade de diferentes preparações enzimáticas em liberar açúcares redutores totais (AR_{Tot}), insolúveis (AR_{Insol}) e solúveis na presença de gluconolactona (AR_{Sol}). Tais medidas foram então utilizadas para expressar as atividades celulásica total, endoglucanásica e exoglucanásica, sendo a atividade β -glucosidásica ($AR_{\beta Sol}$) calculada pela subtração entre AR_{Sol} e AR_{Insol} . A hidrólise de celulose com enzimas purificadas revelou que tanto exoglucanases (ExG) quanto endoglucanases (EnG) do *Trichoderma reesei* atuam na degradação da celulose em duas etapas, a primeira gerando açúcares redutores insolúveis (AR_{Insol}) e a segunda causando a diminuição destes com o concomitante aumento na produção de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}). Já os experimentos realizados empregando os preparados enzimáticos multi-componentes revelaram que o aumento na quantidade de EG-II em preparado contendo CHB-I aumentou linearmente a produção de AR_{Tot} na presença e na ausência de β -glucosidase (βG). Na ausência de βG , o grau de efeito de sinergia (DSE) devido à presença de EG-II em preparado contendo CBH-I foi majoritariamente maior que 1 para a produção de AR_{Tot} e AR_{Insol} . Já na presença de βG , o DSE para a produção de AR_{Insol} manteve-se praticamente igual a 1, enquanto que estes valores foram maiores que 1 para a produção de AR_{Tot} , AR_{Sol} e $AR_{\beta Sol}$. Para a hidrólise dos substratos pré-tratados, a atividade ExG foi mais importante do que a atividade EnG e o pré-tratado na presença de Emim[OAc] apresentou maior suscetibilidade à hidrólise enzimática, comparado ao obtido na presença de Bmim[OAc], principalmente na presença de βG . Na hidrólise dos substratos pré-tratados também foram identificados efeitos de sinergia entre EG-I e CBH-II, sendo a sinergia na produção do AR_{Tot} principalmente gerada pela produção de AR_{Insol} . Os valores de atividade específica aparente (AEA) para a hidrólise de papel de filtro Whatman N°1 demonstraram sinergia devido à presença de EG-II em preparado enzimático contendo CBH-I e de βG em preparado contendo celulasas, ao passo que estas variáveis provocaram diminuição nos valores de AEA para a hidrólise dos substratos pré-tratados na presença de LI. Com base nos dados obtidos, foi comprovado que, para o pré-tratamento por $scCO_2/EtOH-LI$, o Bmim[OAc] apresentou-se como o melhor co-solvente, gerando um substrato de maior suscetibilidade à hidrólise enzimática devido à deslignificação e as mudanças na estrutura supramolecular da celulose.

Palavras-chave: bagaço de cana, pré-tratamento, líquido iônico, dióxido de carbono supercrítico, hidrólise enzimática, sinergia

ABSTRACT

A new pre-treatment technology of sugarcane bagasse was developed using supercritical carbon dioxide and ethanol (scCO₂/EtOH) in the presence of 1-butyl-3-methyl-imidazolium acetate (Bmim[OAc]) as a co-solvent. The experiments were carried out along 2 h varying the temperature (110 °C to 180 °C), pressure (195 Bar to 250 Bar) and amount of Bmim[OAc] in relation to the dry mass of material (0:1 to 1:1 Bmim[OAc]:bagasse). According to the results, the concentration of Bmim[OAc] and pressure of the system favour the delignification and the content of anhydrous glucose on the substrate, while the increase of temperature favours the decrease on the anhydrous xylose content on the substrate. The best results provided 41 % of delignification generating a substrate with 74 % of polysaccharides content. As a result of the delignification, the increased substrate accessibility to enzymatic hydrolysis occurred, which led to 70 % of glucans conversion and 92 % of xylans conversion after 12 h of reaction when using 10 mg g⁻¹ of Cellic CTec2[®] (Novozymes) per dry substrate. The ILs containing acetate anion showed to be easier to recovery after the pre-treatment with scCO₂/EtOH than the IL containing chloride anion, where the using of Bmim[Cl] resulted on the retaining of 25 % of initial mass of IL on the material, fact that led to the inactivation of enzymes. Furthermore, the ILs Bmim[OAc] and Emim[OAc] removed more lignin than Bmim[Cl], showing 42 %, 44 % and 36 % of delignification, respectively. Similar behaviour was obtained to the increase on the interfibrillar distance of 44 %, 49 % and 9 %, and on crystal width of 17 %, 20 % and 9 %, respectively, while statistically significant differences were not found in the values of crystallinity index (CrI_{WAXS}). The susceptibility of the substrates to the hydrolysis was investigated by assessing the ability of different enzymatic preparations on releasing total (RS_{Tot}), insoluble (RS_{Insol}) and soluble reducing sugars on the presence of gluconolactone (RS_{Sol}). Such measures were then used to express the total cellulosic, endoglucanase and exoglucanase activities, being the β-glucosidasic activity (AR_{βSol}) calculated by subtraction between RS_{Sol} and RS_{Insol}. The hydrolysis of cellulose with the purified enzymes revealed that both exoglucanases (ExG) and endoglucanases (EnG) from *Trichoderma reesei* act on the cellulose degradation in two steps, first generating RS_{Insol}, and the second by the decrease of these RS and concomitant increase on the RS_{Sol} yield. On the other hand, the experiments carried out using multi-component enzymatic preparations revealed that increasing on the EG-II amount on preparations containing CBH-I increased linearly the total reducing sugars RS_{Tot} yield, in the presence and absence of β-glucosidase (βG). In the absence of βG, the degree of synergistic effect (DSE) due to the presence of EG-II on preparation containing CBH-I was majoring higher than 1 for the RS_{Tot} and RS_{Insol} yields. However, in the presence of βG the DSE for the RS_{Insol} yield kept practically equals 1, while to the RS_{Tot} RS_{Sol} and RS_{βSol} yields were higher than 1. To the hydrolysis of pre-treated substrates, the ExG activity was more important than the EnG activity, and the pre-treated in the presence of Emim[OAc] showed higher susceptibility to the enzymatic hydrolysis, in comparison to the presence of Bmim[OAc], especially in the presence of βG. On the hydrolysis on pre-treated substrates effects of synergy between EG-I and CBH-II were also identified, being the synergy caused on RS_{Tot} yield generated mainly by RS_{Insol} yield. The values of Apparent Specific Activity (ASA) for the Whatman N°1 filter paper hydrolysis showed synergy due to the presence of EG-II on enzymatic preparation containing CBH-I and due βG on enzymatic preparation containing cellulases, while that those variables caused decrease on the ASA values for the hydrolysis of pre-treated substrates in the presence of IL. Based on the obtained data, it was proven that for the pre-treatment by scCO₂/EtOH-LI, the Bmim[OAc] showed as the best co-solvent, generating a substrate of higher susceptibility to the enzymatic hydrolysis, due to the delignification and changes on the supramolecular structure of cellulose.

Key-words: sugarcane bagasse, pretreatment, ionic liquid, supercritical carbon dioxide, enzymatic hydrolysis, synergism.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. DIAGRAMA GLOBAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO EM LIGNOCELULOSE.....19
- FIGURA 2. DIAGRAMA DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL BASEADO TECNOLOGIA DE PRÉ-TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E ETANOL NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO COMO CO-SOLVENTE.....21
- FIGURA 3. ESTRUTURA DA CELULOSE: A = CELOBIOSE; B = CELULOSE.23
- FIGURA 4. MODELO ESTRUTURAL DE HEMICELULOSE SEM (A) E COM LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO (B) (ADAPTADO DE MCDOUGALL *et al.*, 1993).....26
- FIGURA 5. FENILPROPENÓIDES PRECURSORES DA LIGNINA.27
- FIGURA 6. FRAGMENTO DE LIGNINA DE *Picea abies* (ADAPTADO DE HIGUCHI, 1985). 28
- FIGURA 7. MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO LIGNOCELULOSE: CELULOSE EM PRETO; LIGNINA EM CURVAS DE NÍVEIS AZUIS; HEMICELULOSE EM VERMELHO; PECTINA EM VERDE.....29
- FIGURA 8. EFEITOS GERAIS DO PRÉ-TRATAMENTO NA LIGNOCELULOSE.30
- FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O ACETATO DE 1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOL COM A CELULOSE (ADAPTADA DE FENG E CHENG, 2008).....38
- FIGURA 10. MODELO ESTRUTURAL DO MÓDULO DE LIGAÇÃO AO CARBOIDRATO (3.2.1.4). EM VERDE ESTÃO REPRESENTADOS OS AMINOÁCIDOS DE RESÍDUOS AROMÁTICOS (MODELO GERADO COM O SOFTWARE PYMOL®)....41
- FIGURA 11. MODELO ESTRUTURAL DE DOMÍNIO CATALÍTICO DE CEL7A (A) E CEL5A (B) COMPLEXADAS COM CELOTETROSE (MODELO GERADO COM O SOFTWARE PYMOL®).....42
- FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE POR ENZIMAS HIDROLÍTICAS E NÃO HIDROLÍTICAS (ADAPTADO DE SILVEIRA *et al.*, 2014). 43

FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO HIPOTÉTICA DO EFEITO DA AÇÃO DE ENZIMAS MONOOXIGENASES NA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE, PROMOVENDO A SUA AMORFOGÊNESE (SILVEIRA <i>et al.</i> , 2014).	45
FIGURA 14. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO SISTEMA EM ESCALA DE LABORATÓRIO PARA O PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA COM FLUIDO PRESSURIZADO.	50
FIGURA 15. MODELOS ESTRUTURAIS DOS TRÊS LÍQUIDOS IÔNICOS IMIDAZÓLICOS UTILIZADOS.	50
FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DA DISTÂNCIA INTERFIBRILAR DA CELULOSE. ...	58
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA ANALÍTICA DESENVOLVIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS.	60
FIGURA 18. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DESLIGNIFICAÇÃO: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.	72
FIGURA 19. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TEOR DE ANIDROXILOSE: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.	73
FIGURA 20. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TEOR DE ANIDROGLUCOSE: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.	74
FIGURA 21. GRÁFICOS DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS DEPENDENTES ESTUDADAS. A, DESLIGNIFICAÇÃO; B, TEOR DE ANIDROXILOSE; C, TEOR DE ANIDROGLUCOSE.	75
FIGURA 22. CURVAS DOS PERFIS CRISTALOGRAFÍCOS DOS SUBSTRATOS BC _{LEE} E PRÉ-TRATADOS COM NA PRESENÇA DE Bmim[OAc], Emim[OAc] E Bmim[Cl] GERADOS PELAS ANÁLISES DE RAIOS X DE ALTO ÂNGULO (WAXS) EM (A) E BAIXO ÂNGULO (SAXS) EM (B).	83
FIGURA 23. ELETROFORETOGRAMA SDS-PAGE DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1. PD = PADRÃO; NVZ = NOVOZYM 188.	85

- FIGURA 24. PERFIL CELULOLÍTICO DA MISTURA CELLUCLAST/NOVOZYM (1:0,30): AÇÚCAR REDUTOR EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE (Eq.Glc) (A); % DE AÇÚCARES REDUTORES (B).....87
- FIGURA 25. EFEITO DA δ -GLUCONOLACTONA SOBRE A ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AR_{Sol} PARA AS ENZIMAS PURIFICADAS (A) E SUAS MISTURAS (B).....89
- FIGURA 26. PERFIS HIDROLÍTICOS OBTIDOS COM OS MÉTODOS DA I.U.P.A.C. (A) E ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR (B).....90
- FIGURA 27. LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COMO RESULTADO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1: (A) AR_{Tot} , AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS; (B) AR_{Insol} , AÇÚCARES REDUTORES INSOLÚVEIS; (C) AR_{Sol} , AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS NA PRESENÇA DE δ -GLUCONOLACTONA; (D) $AR_{\beta Sol}$, AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS COMO RESULTADO DA ATIVIDADE DE β -GLUCOSIDASE.....92
- FIGURA 28. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 COM: A=EG-I; B=EG-II; C=CBH-I; D=CBH-II. 94
- FIGURA 29. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 COM: A = Mix A; B = Mix B; C = Mix C; D = Mix D; E = Mix E; F = Mix F.95
- FIGURA 30. EFEITO DA QUANTIDADE DE EG-II NO PREPARADO ENZIMÁTICO SOBRE A VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR TOTAL.96
- FIGURA 31. GRÁFICO DE PARETO PARA O DESIGN EXPERIMENTAL MISTO 2 A 3 NÍVEIS PARA OS VALORES DE ATIVIDADES CAPAZES DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR. A= ARS_{Tot} ; B= ARS_{EnG} ; C= ARS_{ExG} ; D= $ARS_{\beta G}$ 100
- FIGURA 32. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE POLISSACARÍDEOS NO SUBSTRATO OBTIDAS NA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR $scCO_2/EtOH-LI$ NA PRESENÇA DE Bmim[OAc] (A) E Emim[OAc] (B)..... 101
- FIGURA 33. DESEMPENHO DAS ENZIMAS EM 24 h DE HIDRÓLISE, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA DE PROTEÍNA UTILIZADA NOS ENSAIOS COM PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 (A) E COM OS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS (B)..... 104

FIGURA 34. PERFIL HIDROLÍTICO DO PREPARADO Cellic CTec2[®] OBTIDO PELA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR. 105

FIGURA 35. PERFIL HIDROLÍTICO DE Cellic CTec2[®] NA HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS.106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NÍVEIS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA EM SISTEMAS SUPERCRÍTICOS.	51
TABELA 2. CARGAS DE PROTEÍNA UTILIZADAS NOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS.	63
TABELA 3. DESENHO EXPERIMENTAL MISTO DE 2 A 3 NÍVEIS UTILIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DE EFEITOS ESTATÍSTICOS POR REGRESSÃO LINEAR MULTIPLA. 64	64
TABELA 4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	66
TABELA 5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO BAGAÇO DE CANA.....	67
TABELA 6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS LIVRE DE EXTRAÍVEIS E PRÉ-TRATADOS (DADOS EXPRESSOS EM PERCENTAGEM DE BASE SECA DE CADA MATERIAL).....	69
TABELA 7. PARÂMETROS DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS MATEMÁTICOS.	70
TABELA 8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS RESPECTIVAS RESPOSTAS.....	70
TABELA 9. RECUPERAÇÃO MÁSSICA OBTIDA PARA A FRAÇÃO INSOLÚVEL DO SUBSTRATO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO NA PRESENÇA DE ETANOL E DE LÍQUIDO IÔNICO COMO CO-SOLVENTE. 78	78
TABELA 10. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS SUBSTRATOS LIVRE DE EXTRAÍVEIS E PRÉ-TRATADOS COM DIFERENTES LÍQUIDOS IÔNICOS.....	81
TABELA 11. VALORES ENCONTRADOS PARA AS PROPRIEDADES CRISTALOGRAFICAS DA CELULOSE PRESENTE NOS MATERIAIS BC _{LEE} E PRÉ-TRATADOS NA PRESENÇA DE Bmim[OAc], Emim[OAc] e Bmim[Cl].	84
TABELA 12. GRAU DE EFEITO SINÉRGICO (DSE) PARA A PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N° 1.	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNS – Ácido 3,5-dinitro-salicílico
AEA – Atividade Específica Aparente
AFEX – Ammoia Fiber Explosion
AnAra – Anidroarabinose
AnGal – Anidrogactose
AnGlu – Anidroglucose
ANOVA – Análise de Variância
AnXyl – Anidroxilose
AR – Açúcar Redutor
AR_{Insol} – Açúcar Redutor Insolúvel
AR_{Sol} – Açúcar Redutor Solúvel na Presença de Glucono Lactona como Inibidor
AR_{Sol} – Açúcar Redutor Solúvel
AR_{Tot} – Açúcar Redutor Total
AR _{β Sol} - Açúcar Redutor Solúvel Devido à Ação de β -glucosidases
ARS – Activity Able to Release Reducing Sugars
ARS_{Tot} – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor
ARS_{EnG} – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor de Endoglucanase
ARS_{ExG} – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor de Exoglucanase
ARS _{β G} – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor de β -glucosidase
BC_{LEE} – Bagaço de Cana Livre de Extraíveis
Bmim[Cl] – Cloreto de 1-Butil-3-Metil-Imidazol
Bmim[OAc] – Acetato de 1-Butil-3-Metil-Imidazol
CBH – Celobiohidrolase
CBM – Carbohydrate Binding Module
CBU – Unidade de Atividade Enzimática Celobiásica
CF – Co-Fermentação
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC – Carboximetil celulose
CMCase – Atividade Enzimática contra Carboximetilcelulase
Crl – Crystallinity Index
DP – Degree of Polymerization
DSE – Degree of Synergistic Effect
EG – Endoglucanase
Emim[OAc] – Acetato de 1-Etil-3-Metil-Imidazol
EnG – Endoglucanase

ExG – Exoglucanase
FPA – Filter Paper Activity
FPU – Filter Paper Unit
 F_{tab} – Valor Tabelado do índice da Distribuição de Fischer-Snedecor
GH – Glycosyl Hydrolase
GLT – δ -gluconolactona
hkl – reflexos siméticos nas dimensões h, k e l
I.U.P.A.C. – Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
LI – Líquido Iônico
LIA – Lignina Insolúvel em Ácido
LMA – Largura na Altura Máxima
LPMO – Lytic Polysaccharide Monooxygenases
LSA – Lignina Solúvel em Ácido
pH – Potencial Hidrogeniônico
 R_M – Rendimento Mássico
SAXS – Small-Angle X-ray Scattering
scCO₂ – Dióxido de Carbono Supercrítico
scCO₂/EtOH-LI – Dióxido de Carbono Supercrítico na presença de Etanol com Líquido Iônico como co-solvente
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate
SSCF – Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas
SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas
UI – Unidade Internacional
UV/Vis – Ultravioleta na Região do Visível
UV_{Abs} – Absorbância de Ultravioleta
W1FP – Whatman N°1 Filter Paper
WAXS – Wide-Angle X-ray Scattering
 β G – β -glucosidase

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. ASPECTOS QUÍMICOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	22
2.2. PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	29
2.2.1. <i>Métodos convencionais de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos</i>	30
2.2.2. <i>Pré-tratamento com fluido supercrítico</i>	35
2.2.3. <i>Pré-tratamento com líquidos iônicos</i>	37
2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULOSE PRÉ-TRATADA.....	40
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GERAL.....	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. METODOLOGIA	49
4.1. MATERIAL.....	49
4.2. PREPARO DE SUBSTRATOS EM SISTEMA SUPERCRÍTICO.....	49
4.2.1. <i>Estudo preliminar de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico na presença de etanol e de líquido iônico como co-solvente</i>	51
4.2.2. <i>Análise do efeito do cátion e do ânion do líquido iônico no pré-tratamento</i>	52
4.2.3. <i>Determinação da recuperação de líquido iônico</i>	52
4.3. ANÁLISE QUÍMICA DE LIGNOCELULOSE.....	53
4.3.1. <i>Determinação do teor de cinzas</i>	53
4.3.2. <i>Extraíveis</i>	54
4.3.3. <i>Análise química pelo método da lignina de Klason</i>	54
4.5. ANÁLISES CRISTALOGRÁFICAS VIA DIFRATOMETRIA DE RAIOS X.....	55
4.5.1. <i>Determinação do índice de cristalinidade por espalhamento de Raio X com ângulo elevado</i>	55
4.5.2. <i>Análise cristalográfica via espalhamento de Raios X com ângulo baixo</i>	57
4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS.....	58
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....	58
4.8. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA INVESTIGAÇÃO DE SINERGIA ENTRE AS ENZIMAS DO COMPLEXO CELULÁSICO.....	59
4.9. ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE: SINERGIA E MODO DE AÇÃO.....	61
4.9.1. <i>Hidrólise de papel de filtro Whatman N°1</i>	62

4.9.2. Hidrólise em bagaço de cana pré-tratado por dióxido de carbono supercrítico na presença de etanol e de líquido iônico como co-solvente.....	64
4.9.3. Comparação das suscetibilidades dos materiais lignificados e deslignificados à hidrólise	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS IN NATURA E LIVRE DE EXTRAÍVEIS	66
5.2. PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E ETANOL NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO COMO CO-SOLVENTE	68
5.3. ANÁLISE DO EFEITO DO CÁTION E DO ÂNION DO LÍQUIDO IÔNICO NO PRÉ-TRATAMENTO	79
5.4. ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE: SINERGIA E MODO DE AÇÃO	85
5.4.1. Desenvolvimento de metodologia alternativa para investigação de modo de ação do complexo celulásico	86
5.4.2. Hidrólise em papel filtro Whatman N°1	93
5.4.3. Hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por $scCO_2/EtOH-LI$	101
5.4.4. Comparação das suscetibilidades dos substratos lignificados e deslignificados	103
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol pode ser obtido a partir de diferentes matérias primas e por diferentes tecnologias de conversão, classificando o produto como de primeira (1G) ou de segunda geração (2G). Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação da sacarose presente, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar, as tecnologias de segunda geração utilizam resíduos agrícolas e agroindustriais (materiais lignocelulósicos) para este mesmo fim (MOSIER *et al.* 2005; RAMOS, 2003). Neste caso, o processo fermentativo é baseado nos carboidratos liberados da lignocelulose por hidrólise da celulose e das hemiceluloses, fato que oferece barreiras tecnológicas que ainda vêm sendo estudadas por vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Exemplos desta atividade estão associados à utilização de resíduos agrícolas, agroindustriais e agroflorestais para produção de etanol celulósico, como é o caso da palha de milho (HOLTZAPPLE e KAAR 2000), sabugo de milho (HATANO *et al.*, 2013), palha de arroz (HSU *et al.*, 2010), serragem de pinus (PARK *et al.*, 2010) e de eucalipto (MCINTOSH *et al.*, 2012), casca de arroz (GHOSH, 2006), bagaço de cana de açúcar (MUTHUKUMAR, 2011) e resíduos de algodão (SHARMA-SHIVAPPA, 2009).

Sabe-se que o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, apresentando, para o biênio 2012/2013, a produção de 588,5 milhões de toneladas com 23,2 milhões de litros de etanol e 38,2 milhões de toneladas de açúcar, caracterizando um aproveitamento mássico de 9,0% da biomassa da cana. Esta atividade promove o acúmulo de 69,8 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar. Assim, o aproveitamento desta biomassa para a produção de biocombustíveis e insumos químicos tornou-se uma necessidade premente para a sociedade moderna.

A produção de etanol celulósico requer a realização de cinco etapas principais: (1) pré-condicionamento da matéria prima; (2) pré-tratamento da biomassa, que visa aumentar a acessibilidade dos carboidratos à bioconversão; (3) hidrólise enzimática, que converte os carboidratos em açúcares fermentescíveis; (4) fermentação, que é responsável pela produção de etanol; e, finalmente, (5) a recuperação do etanol por destilação. Visando atingir maior viabilidade de processo através da redução de seu custo operacional, tais etapas podem ainda ser realizadas de forma integrada (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007; RAMOS, 2003). Neste sentido, três possíveis estratégias de integração têm sido amplamente investigadas nestas últimas décadas: a co-fermentação de pentoses e hexoses (CF); a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); e a sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF), conforme apresentado na FIGURA 1.

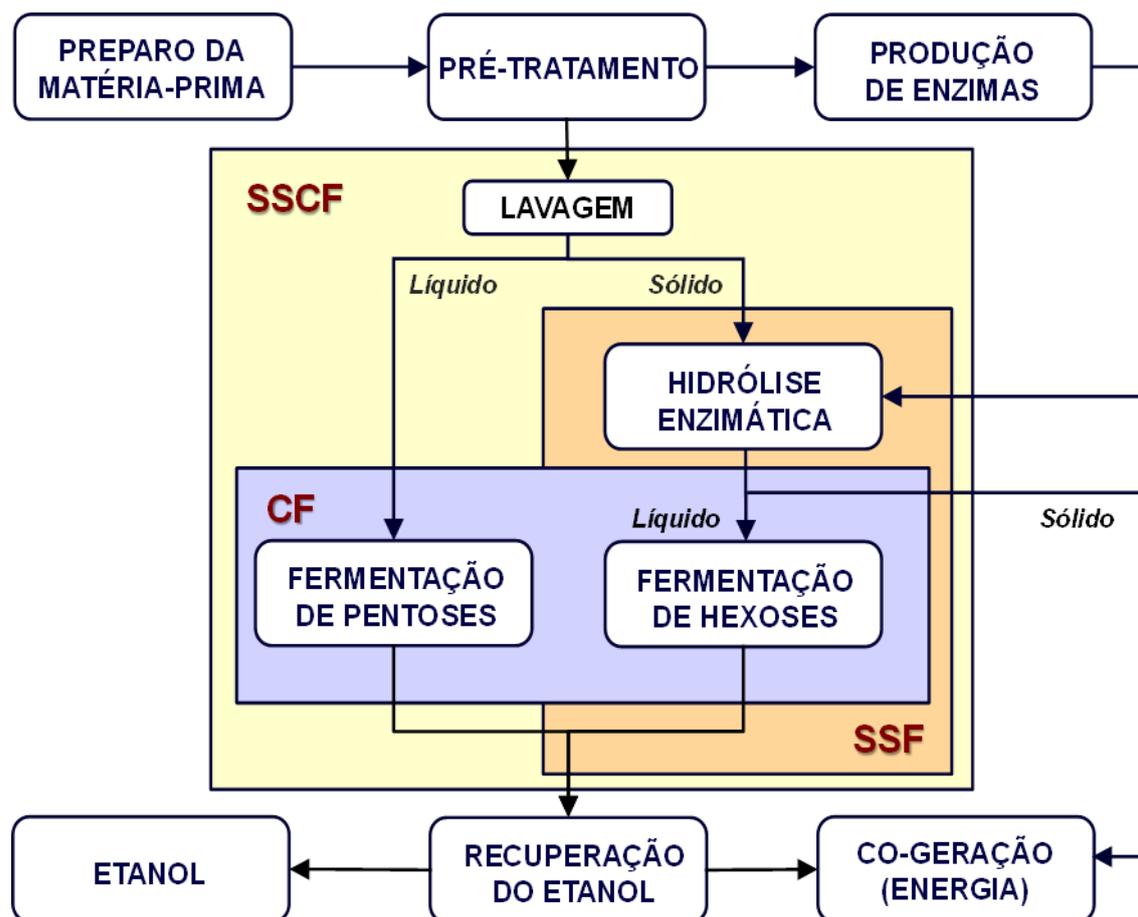


FIGURA 1. DIAGRAMA GLOBAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO EM LIGNOCELULOSE.

Devido à resistência natural dos materiais lignocelulósicos à bioconversão, a etapa de pré-tratamento é essencial para promover o fracionamento e aumentar a acessibilidade química dos principais componentes da parede celular e, por ser a etapa que antecede os processos biológicos de hidrólise enzimática e de fermentação, é considerada a de maior importância para o processo (SADDLER *et al.*, 2007). Líquidos iônicos (LIs) têm sido propostos como solventes verdes promissores para o fracionamento de lignocelulose, pois são eficazes na dissolução destes materiais (TADESSE e LUQUE 2011). O pré-tratamento de biomassa baseado na sua dissolução em LI, seguido da precipitação dos polissacarídeos em meio aquoso e, posterior filtração para recuperação do LI, permite a remoção parcial da lignina e um aumento substancial da acessibilidade do substrato à bioconversão. No entanto, apesar de eficiente na geração de substratos com alto teor de polissacarídeos, processos baseados na regeneração do substrato consomem grandes quantidades de LI e água, tornando a recuperação do LI um processo oneroso. Além disso, outra vantagem deste processo são

a recuperação da lignina praticamente inalterada, oferecendo assim uma grande perspectiva para sua aplicação na indústria como fonte de produção de insumos químicos e de novos materiais, como resinas fenólicas (TURUNEN *et al.*, 2003), resina epóxi (SIMIONESCU *et al.*, 1993), adesivos (LUND *et al.*, 2000) e poliolefinas (CAZACU *et al.*, 2004).

Por outro lado, fluidos supercríticos também têm sido aplicados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos como é o caso do dióxido de carbono supercrítico (scCO₂). No entanto, apesar apresentarem vantagens como fácil recuperação e reuso, gerar substratos com baixo teor de umidade, alta compressibilidade e densidade próxima à de líquidos, os substratos gerados por pré-tratamento empregando apenas scCO₂ apresentam baixa suscetibilidade à hidrólise enzimática quando comparados aos substratos pré-tratados por regeneração de celulose com LI. Neste caso, NARAYANASWAMY *et al.* (2011) constataram que para o pré-tratamento de “*switchgrass*” (gramínea nativa das pradarias norte-americanas que vem sendo estudada como fonte para a produção de etanol celulósico) este processo não foi efetivo, resultando em apenas 30 % de produção de glucose após a hidrólise de palha de milho.

Apesar de eficientes no aumento da suscetibilidade da biomassa à hidrólise e na recuperação de lignina para futuras aplicações em química fina, os processos de pré-tratamento à base de LI são onerosos devido ao alto custo destes solventes. Por esta razão, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do pré-tratamento com fluidos pressurizados (possivelmente supercríticos) sobre a deslignificação e suscetibilidade à hidrólise enzimática do bagaço de cana, empregando etanol e LI como co-solventes (scCO₂/EtOH-LI). O material *in natura* foi inicialmente submetido a uma extração empregando etanol 95% para que o pré-tratamento fosse realizado utilizando um substrato livre de extrato etanólico (BC_{LEE}). Com isso, buscou-se desenvolver uma nova metodologia de pré-tratamento de biomassa, conforme o esquema da Figura 2, gerando um material celulósico com baixo teor de umidade e alta susceptibilidade à hidrólise, empregando baixas concentrações de enzima. Buscou-se igualmente estudar a sinergia existente entre os componentes da preparação enzimática empregada, para se avaliar as premissas que nortearam a otimização do processo de sacarificação.

O potencial de sacarificação dos substratos foi determinado utilizando um dos produtos da família Cellic (Novozymes®), nomeadamente a preparação Cellic CTec 2, a qual apresenta majoritariamente atividade celulolítica.

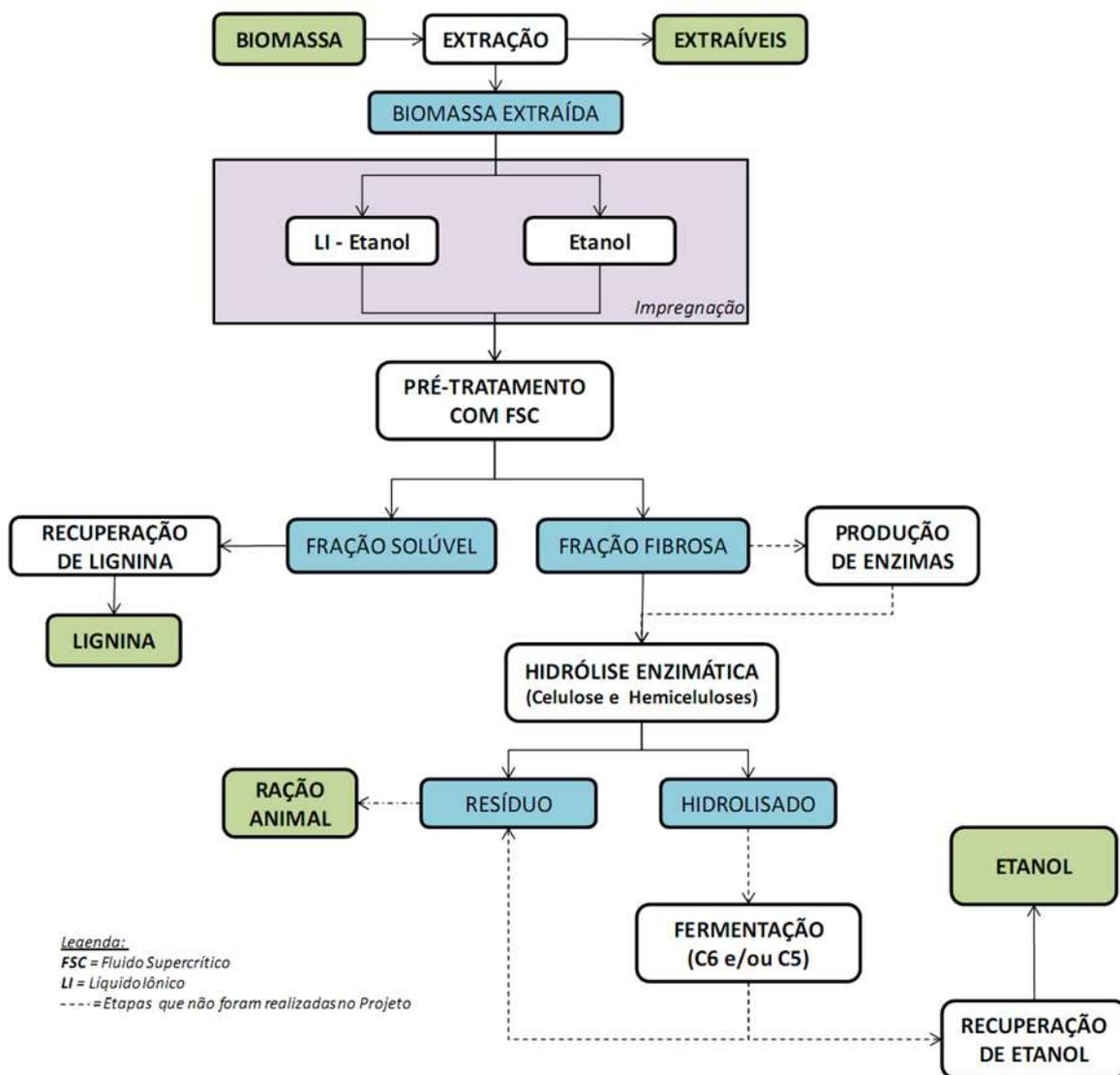


FIGURA 2. DIAGRAMA DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL BASEADO TECNOLOGIA DE PRÉ-TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E ETANOL NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO COMO CO-SOLVENTE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos químicos de materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, hemiceluloses, lignina e pequenas quantidades de outros materiais como pectinas, proteínas, cinzas, ceras e gorduras, e outros componentes de baixa massa molar (WAYMAN e PAREKH, 1990). Como resultado da íntima associação que existe entre seus três componentes poliméricos majoritários, juntamente à interveniência dos extrativos e de outros componentes minoritários, a caracterização da composição química da fitobiomassa constitui uma difícil tarefa experimental que, muitas vezes, exige a utilização de mais de um tipo de metodologia analítica, quer puramente química (como em métodos de extração seletiva para preparação de alfa-celulose e holocelulose), quer cromatográfica ou espectroscópica (RAMOS, 2003).

Glucanas como a celulose representam em torno de 40 % a 50 % em massa do material seco e ocupam 15 % do volume de toda biomassa produzida no planeta (PÉREZ e MAZEAU, 2005). A celulose é um homopolímero formado por resíduos de anidro-D-glucopiranosose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) (RAMOS, 2003). Por se tratar de um polímero, muitas de suas propriedades dependem do tamanho de sua cadeia, ou do grau de polimerização (DP, do inglês *degree of polymerization*), que representa o número de unidades de anidroglicose que fazem parte de uma unidade molecular do polímero. Celulose de polpa de madeira apresenta tipicamente entre 300 e 1700 unidades de anidroglicose, ao passo que algodão e outras fibras vegetais, bem como celulose bacteriana apresentam entre 800 e 10000 unidades (KLEMM *et al.*, 2005). Além disso, é importante mencionar que, para cada cadeia de celulose, existe uma extremidade redutora e outra não redutora. Devido à orientação equatorial da hidroxila anomérica e rede de ligações de hidrogênio intracadeia e intercadeia envolvendo o par não ligante do oxigênio do anel e as hidroxilas dos carbonos C-3 e C-6 de diferentes unidades de anidroglicose, esta β -(1 \rightarrow 4)-glucopiranosose apresenta disposição linear cuja unidade conformacional é a celobiose (FENGEL e WEGNER, 1989). A FIGURA 3 apresenta a estrutura da celobiose (A) e arranjos de ligações de hidrogênio entre cadeias de celulose (B).

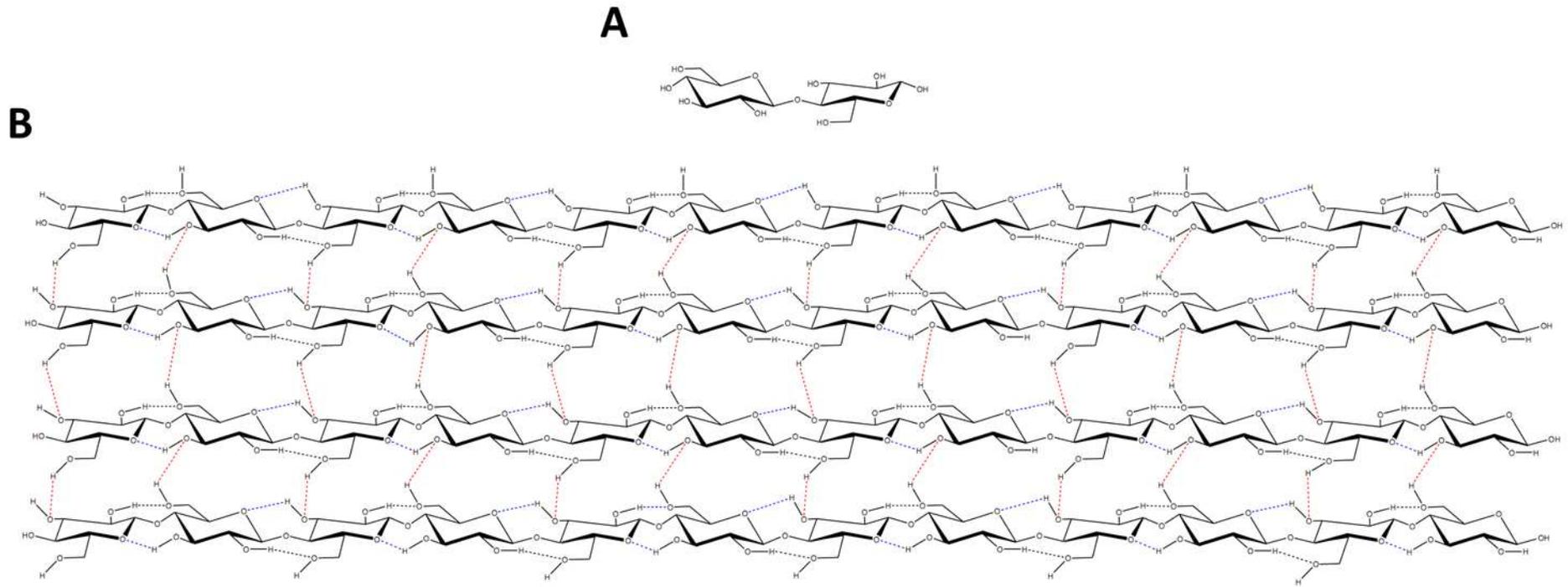


FIGURA 3. ESTRUTURA DA CELULOSE: A = CELOBIOSE; B = CELULOSE.

Na celulose, as regiões de maior organização molecular em relação ao arranjo de interações por ligação de hidrogênio são denominadas regiões cristalinas, e intermediadas por regiões menos ordenadas ou de menor organização supramolecular, conhecidas como regiões amorfas. A celulose é um polímero natural difícil de hidrolisar devido ao alto grau de empacotamento ou associação química que existe entre suas cadeias (MATTHEWS *et al.*, 2006).

A análise da celulose por cristalografia de Raios X demonstra que as regiões mencionadas acima diferem em sua organização supramolecular. Na região cristalina, as cadeias de celulose se arranjam em celulose do tipo I_α e I_β (SUGIYAMA *et al.*, 1991). Neste caso, a celulose I_α (majoritária em algas e bactérias) apresenta as cadeias alinhadas uniformemente umas às outras (arranjo triclinico), ao passo que na celulose I_β (majoritária em madeiras), as cadeias estão dispostas alternadamente (arranjo monoclinico). Já a celulose II é usualmente obtida da celulose I por mercerização ou regeneração (O'SULLIVAN 1997). É importante mencionar que, na celulose I, as cadeias de celulose se alinham lado a lado por ligações de hidrogênio em folhas planas com disposição paralela e mesma orientação em relação ao terminal redutor, gerando estruturas mais compactas com menor espaçamento intercadeia (NISHIYAMA *et al.*, 2002; NISHIYAMA *et al.*, 2003). Por outro lado, na celulose II o alinhamento das cadeias é antiparalelo e as folhas formadas apresentam menor compactação (LANGAN *et al.*, 1999).

As hemiceluloses são majoritariamente constituídas por heteropolissacarídeos ramificados cujas cadeias encontram-se fortemente associadas às regiões cristalinas da celulose por ligações de hidrogênio, bem como por forças de van der Waals. Além disso, estes polissacarídeos apresentam ligações covalentes com unidades de ácido ferúlico ou ácido coumárico. Tais heteropolissacarídeos, por hidrólise ácida, liberam diferentes monossacarídeos tais como: D-manose, D-galactose, D-xilose, D-glucose, ácido D-glucurônico, L-arabinose, ácido D-4-O-metilglucurônico, grupamento acetil, dentre outros (RAMOS, 2003).

As xilanas são componentes majoritários das hemiceluloses das dicotiledôneas (angiospermas), representando, nestes casos, cerca de 20% em massa de material seco (SINGH *et al.*, 2003). No entanto, as xilanas de monocotiledôneas (gimnospermas) constituem apenas 2% em massa do material seco (PÉREZ e MAZEAU, 2005) e geralmente se apresentam como polissacarídeos heterogêneos formados por unidades de anidro-D-xilopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4), podendo apresentar ramificações com grupamentos O-acetil, α -L-arabinofuranosil, α -D-glucuronil e α -D-4-O-metilglucuronil (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Portanto, as hemiceluloses são

heteropolissacarídeos que não apresentam a mesma organização estrutural que a celulose.

A FIGURA 4 apresenta um modelo de hemicelulose de gramínea, com duas cadeias principais de arabino-feruloil-xilana que se encontram unidas por ligação C-C do tipo 5-5' entre unidades de ácido ferúlico. Esta ligação dá origem à ponte di-ferúlica, em que as unidades de ácido ferúlico estão conectadas a duas unidades de anidroarabinose. (SOUZA *et al.*, 2012). Neste caso, as FIGURAS 4A e B apresentam os modelos estruturais para o fragmento de arabino-feruloil-xilana sem e com a presença de ligações de hidrogênio, respectivamente, mostrando a possível organização estrutural que um modelo de hemicelulose de gramínea pode apresentar. Nas folhosas, uma a cada 10 unidades de D-xilopiranosose é substituída no carbono 2 por grupamentos O-acetil (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993).

Devido à sua heterogeneidade estrutural e ao fato de que na parede celular as hemiceluloses encontram-se entre a lignina e a celulose, estes heteropolissacarídeos podem ocupar diferentes espaços, de forma a apresentar as cadeias mais próximas uma das outras, gerando, neste caso, a ocorrência de ligações de hidrogênio.

Além das hemiceluloses e da celulose, outros polissacarídeos fazem parte da estrutura da parede celular vegetal, dentre os quais merecem destaque a pectina, composta majoritariamente por unidades de ácido- α -D-galacturônico, e por açúcares neutros como a L-ramnose (donde a nomenclatura ramnogalacturonanas). Em geral, os materiais pécticos contêm mais de 50% dos grupos carboxílicos encontrados na parede celular (POPA e SPIRIDON, 2005).

A lignina é definida como uma matriz amorfa não polissacarídica, cuja biossíntese resulta da condensação de várias formas ressonantes de radicais gerados a partir da oxidação de derivados do álcool *p*-hidroxi-cinâmico com vários graus de metoxilação. A lignina é a macromolécula mais abundante na natureza após a celulose, chegando a 20-30% da biomassa lignocelulósica produzida no planeta (FENGEL e WEGENER, 1989; MORAIS *et al.*, 2005). Sua estrutura, altamente hidrofóbica e complexa, é formada principalmente por unidades das seguintes estruturas fenilpropenóides: 4-(3-hidroxi-prop-1-enil)-fenol (álcool cumarílico, precursor das unidades *p*-hidróxi-fenílicas); 4-(3-hidroxi-prop-1-enil)-2-metoxifenol (álcool coniferílico, precursor das unidades guaiacílicas); 4-(3-hidroxi-prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol (álcool sinapílico, precursor das unidades siringílicas). Os respectivos modelos estruturais destes compostos são apresentadas na FIGURA 5.

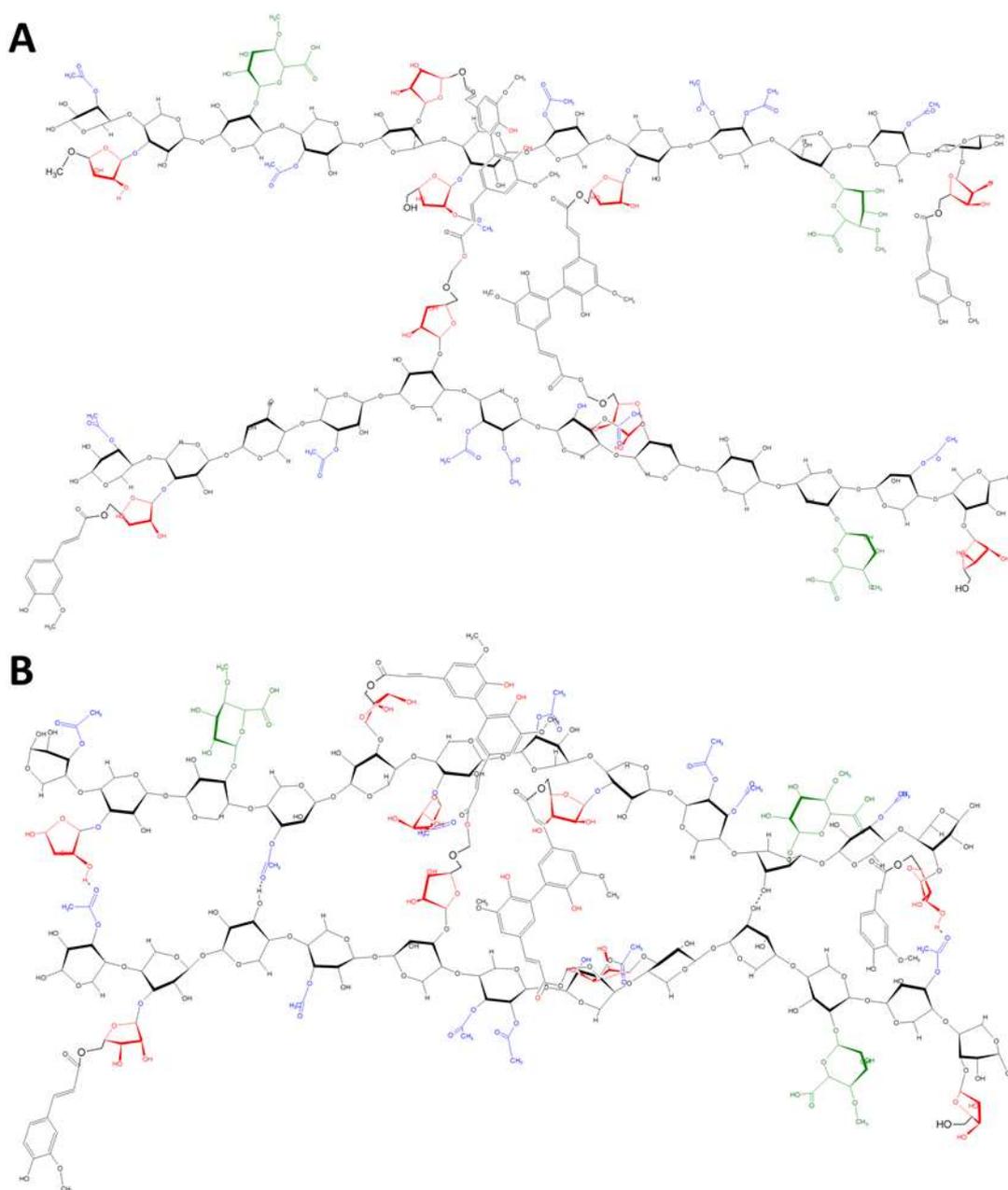


FIGURA 4. MODELO ESTRUTURAL DE HEMICELULOSE SEM (A) E COM LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO (B) (ADAPTADO DE MCDUGALL *et al.*, 1993).

As ligações predominantes na lignina são do tipo β -O-4 (mais que 50%) e β -1, embora isto dependa fortemente de sua origem (LEE, 1997). Ao contrário da celulose e das hemiceluloses, as unidades monoméricas constituintes da lignina não são ordenadas, encontrando-se entrelaçadas por diferentes ligações carbono-carbono entre as cadeias alifáticas C3 (β - β' , α - α' , α - β'), entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6') e entre carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações éter envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -O-4', α -O-4') (HIGUCHI, 1985). Um

modelo estrutural de fragmento de lignina de *Picea abies* (conífera da família pináceas) é apresentado FIGURA 6.

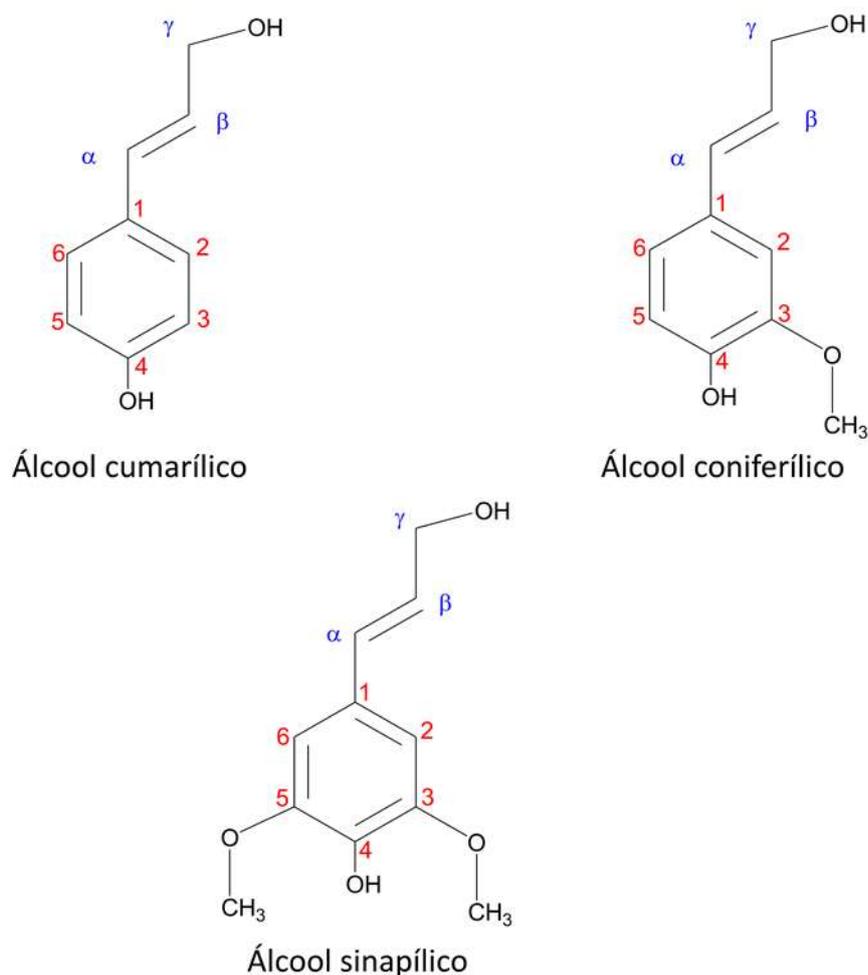


FIGURA 5. FENILPROPENÓIDES PRECURSORES DA LIGNINA.

Finalmente, o teor de extrativos da biomassa vegetal corresponde de 3 % a 10% em folhosas, estando esse valor em torno de 5 % a 8% para coníferas. Esses constituintes são frequentemente responsáveis por determinadas características da planta, como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e propriedades abrasivas, que são atribuídas à presença de cinzas que podem ser naturalmente do material ou pela contaminação pelo solo (D'ALMEIDA, 1988). É comum a denominação de resina para uma determinada classe de extrativos. Deste modo, os seguintes compostos podem ser encontrados em resinas de madeiras: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides e outros aromáticos. Além dessas substâncias, outros compostos orgânicos podem também estar presentes nos extrativos, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de baixa massa molar.

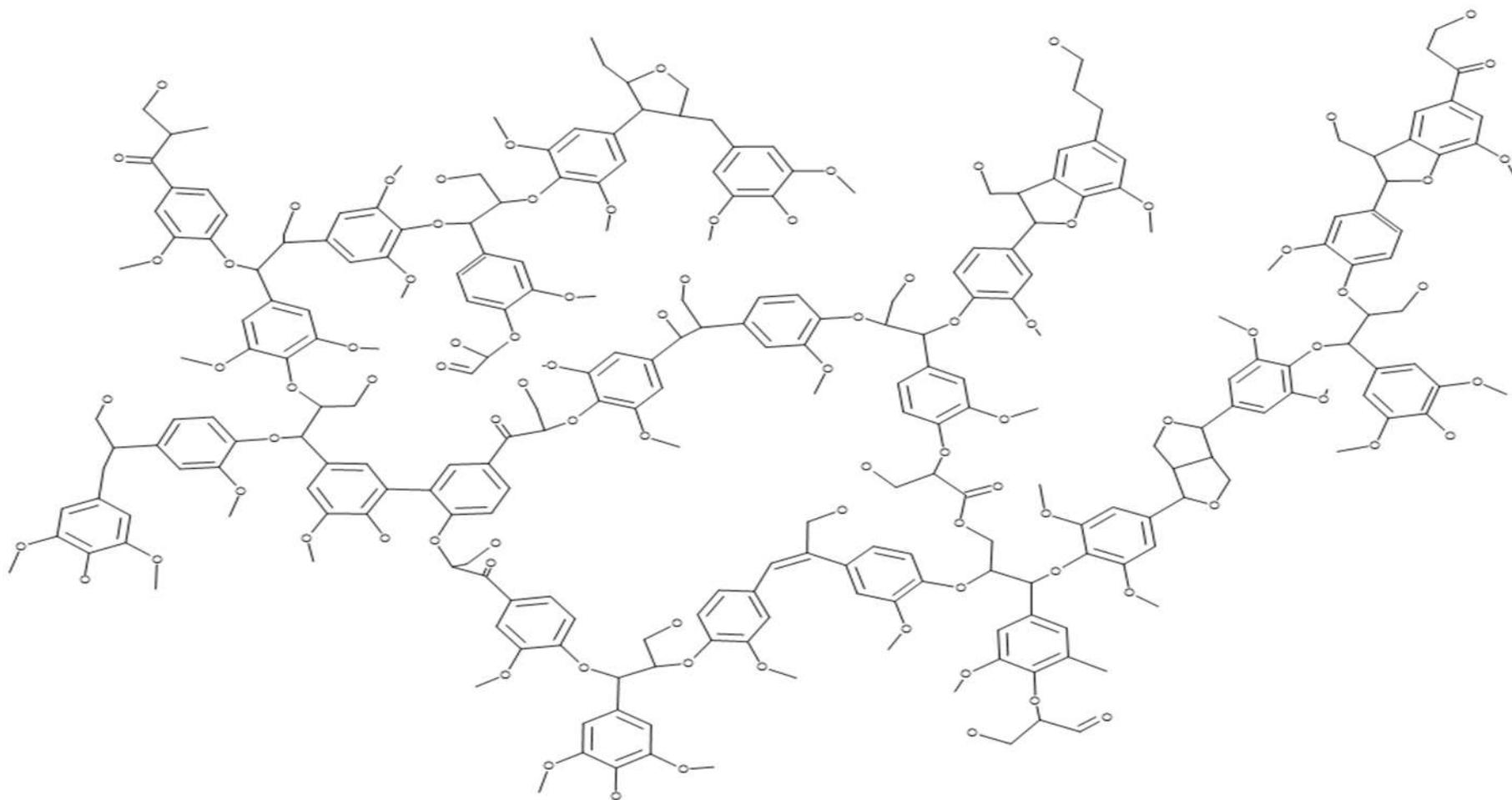


FIGURA 6. FRAGMENTO DE LIGNINA DE *Picea abies* (ADAPTADO DE HIGUCHI, 1985).

A associação entre os componentes celulose, hemiceluloses, lignina outros componentes minoritários constitui o complexo chamado de lignocelulose, a FIGURA 7 apresenta um modelo estrutural de lignocelulose, considerando os modelos estruturais dos componentes macromoleculares apresentados individualmente nesta sessão. O alto grau de associação molecular dificulta a utilização destes materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os torne suscetíveis à conversão em biocombustíveis e insumos para a indústria química (CUNHA e SILVA, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2006; RAMOS, 2003).

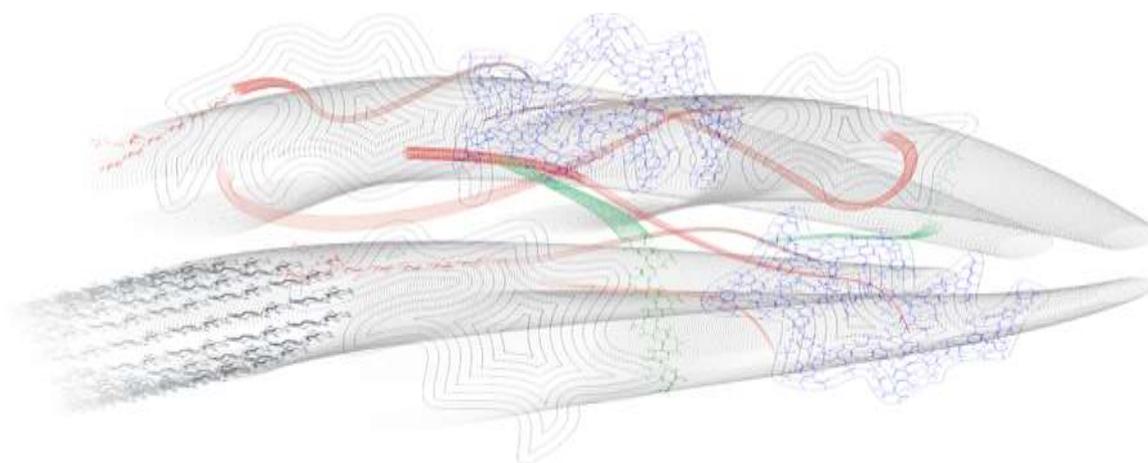


FIGURA 7. MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO LIGNOCELULOSE: CELULOSE EM PRETO; LIGNINA EM CURVAS DE NÍVEIS AZUIS; HEMICELULOSE EM VERMELHO; PECTINA EM VERDE.

2.2. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A conversão de biomassa lignocelulósica em etanol combustível envolve inicialmente a desorganização do material via processos de pré-tratamento (FIGURA 8), seguidos da hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses em açúcares que devem ser, então, adequadamente fermentados ao produto final. Contudo, é reconhecido que o desempenho enzimático durante a hidrólise é reduzido pela interação das enzimas com lignina ou com complexos lignina-carboidrato (BERLIN *et al.*, 2006).

Vários processos de pré-tratamento têm sido propostos para alterar ou remover os impedimentos estruturais que limitam a hidrólise de materiais lignocelulósicos, buscando, com isto, aumentar os rendimentos de hidrólise enzimática e, assim, a produção de açúcares passíveis de fermentação a etanol e outros produtos (MOSIER *et al.*, 2005). Esta seção aborda os métodos mais tradicionais de pré-tratamento, incluindo a

possibilidade da utilização de sistemas pressurizados (e.g. fluidos supercríticos) e líquidos iônicos.

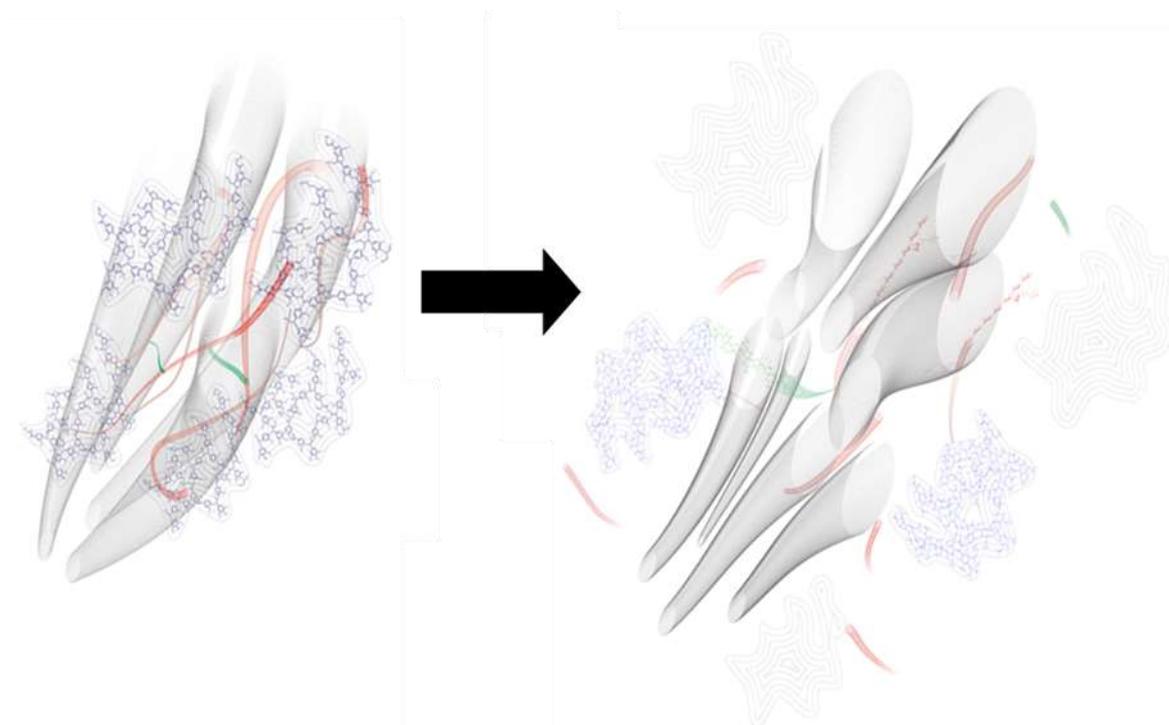


FIGURA 8. EFEITOS GERAIS DO PRÉ-TRATAMENTO NA LIGNOCELULOSE.

2.2.1. Métodos convencionais de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Na literatura, pré-tratamentos de diversas características visam o aumento da desordem estrutural da lignocelulose, facilitando a acessibilidade desta à produção de combustíveis renováveis. Dentre estes processos, podem ser destacados os que utilizam hidrólise ácida (HSU *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 1999; VÁZQUEZ *et al.*, 2004, 2006;), reagentes alcalinos (CURRELI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2009), explosão a vapor (MARTIN *et al.*, 1995; RAMOS, 2003; SUN *et al.*, 2009; ZACCHI e GALBE, 2007), oxidação úmida (MARTÍN *et al.*, 2007; SCHMIDT e THOMSEN 1998), amônia líquida (BALAN *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2010a), água quente (MARTÍN e AGUILERA, 1988; LYND *et al.*; 2002), moagem (ALVO e BELKACEMI, 1997; INOUE *et al.*, 2009;), solvente orgânico (ARAQUE *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2008) e pré-tratamentos biológicos (CAMASSOLA e DILLON, 2009; YU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

Processos ideais de pré-tratamento para um determinado tipo de biomassa devem buscar o aumento da acessibilidade do substrato às enzimas, proporcionar diminuição na quantidade de enzima necessária à sacarificação, evitar a perda de monossacarídeos nos hidrolisados e minimizar a formação de inibidores das etapas subsequentes de hidrólise e fermentação (RAMOS, 2003; SADDLER *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

Cada tipo de pré-tratamento apresenta peculiaridades quanto à remoção de lignina e carboidratos, o que depende também das propriedades físicas e químicas do material de origem.

Pré-tratamentos que utilizam moagem ou trituração buscam a diminuição do tamanho das partículas, aumentando assim a área superficial e a acessibilidade do substrato ao processo de hidrólise (HENDRIKS e ZEEMAN, 2008). Uma das vantagens dos processos baseados em moagem é que não promovem a desidratação de carboidratos, que em processos termoquímicos dão origem a estruturas furânicas, principalmente se realizados via catálise ácida (ALVO e BELKACEMI, 1997). No entanto, o processo é muito oneroso por consumir muita energia e o sucesso na etapa de sacarificação é muitas vezes limitado pela manutenção de fragmentos que ainda mantêm a estrutura coesa da parede celular.

O emprego de processos químicos de caráter básico (e.g. alcalinos) também tem sido proposto como alternativa para o processamento da lignocelulose. No entanto, a viabilidade deste pré-tratamento depende diretamente da quantidade e da reatividade da lignina presente no substrato. Uma das vantagens deste pré-tratamento está no fato de ser mais seletivo, permitindo uma maior conservação da celulose e das hemiceluloses quando comparado à hidrólise ácida (LI *et al.*, 2010a) e podendo, inclusive, ser realizado em temperatura ambiente (KUMAR *et al.*, 2009). O emprego de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) provoca o inchamento e subsequente aumento da área superficial da celulose, diminuindo a sua cristalinidade e aumentando a sua porosidade (TAHERZADEH e KARIMI 2008). Como principais desvantagens do pré-tratamento alcalino podem ocorrer perdas de açúcares fermentescíveis principalmente oriundos da degradação da celulose, além de solubilizar componentes derivados da lignina, os quais podem atuar como inibidores para a fermentação (GOSSETT *et al.*, 1982). No tratamento alcalino de folhosas, pode ocorrer o aumento da digestibilidade da celulose de 14 para 55 % pela redução de 20 % no teor de lignina (MILLET *et al.*, 1976). Além do NaOH, o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) também pode ser utilizado no pré-tratamento alcalino, como foi demonstrado para o processamento de palha de milho a 85-150°C por 6-16 semanas (KIM e HOLTZAPPLE, 2006). Recentemente, RABELO *et al.* (2011) propuseram o pré-tratamento de bagaço de cana com peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂NaOH) e obtiveram resultados superiores ao pré-tratamento com hidróxido de cálcio, gerando, após a hidrólise com 3,5 unidades de atividade enzimática de papel filtro (FPU, do inglês *Filter Paper Units*) e 1,0 unidade de atividade enzimática contra celobiose (CBU) por g de substrato, um total de 691 mg g⁻¹ de glucose para o bagaço pré-tratado por 1 h a 25 °C na presença de 7,35 % (v/v) de H₂O₂, em pH 11,5. No entanto, apesar de promissores,

estes resultados de hidrólise foram obtidos utilizando apenas 0,33 g de substrato para 100 ml de volume de reação, o que resulta em melhor desempenho enzimático.

Diferentemente da hidrólise alcalina, pré-tratamentos ácidos têm por objetivo a solubilização das hemiceluloses para aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose. Pré-tratamentos ácidos podem ser realizados em meio diluído ou concentrado. No entanto, a utilização de ácido concentrado é menos atraente devido ao maior consumo de catalisador e à necessidade do emprego de etapas de neutralização, não apenas para a realização da hidrólise enzimática, mas também para a recuperação do catalisador. Outras desvantagens relacionadas ao pré-tratamento com ácido concentrado são o alto custo operacional e a possível corrosão de equipamentos (WYMAN, 1996). Logo, o pré-tratamento com ácido diluído torna-se a melhor escolha para pré-tratamento por hidrólise ácida, o qual tem sido estudado no processamento de vários materiais lignocelulósicos (CARA *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2010).

Diferentes ácidos, como os ácidos clorídrico (HCl) (ELSHAFEI *et al.*, 1991) e fosfórico (H₃PO₄) (INGRAM *et al.*, 2010), podem ser aplicados para a hidrólise com ácido diluído. No entanto, o sistema mais estudado é o do ácido sulfúrico (H₂SO₄). O emprego de ácido sulfúrico diluído (0,75 % v/v) a 121°C por 1 h proporcionou rendimentos de sacarificação de 74 % em relação ao conteúdo total de carboidratos para a palha de trigo (SAHA *et al.*, 2005). A biomassa da oliveira também apresentou rendimento na sacarificação de 76,5%, quando pré-tratada com H₂SO₄ a 210 °C por 10 min (CARA *et al.*, 2008).

Ácidos orgânicos também estão sendo investigados como catalisadores para o pré-tratamento, como os ácidos fumárico ou maléico. Ácidos orgânicos com maiores valores de pK_a podem apresentar seletividade no pré-tratamento via remoção/solubilização das hemiceluloses sem gerar produtos de degradação. Comparados ao H₂SO₄ diluído, estes ácidos podem pré-tratar a palha de trigo com boa eficiência e com menor formação de furfurais. No entanto, o ácido fumárico demonstrou ser menos efetivo para o pré-tratamento do que o ácido maléico, possivelmente devido ao fato de que o ácido fumárico apresenta-se na forma *trans* enquanto que o maléico é a forma *cis* do ácido but-2-en-1,4-dióico, o que resulta nas diferenças de pK_a destes isômeros, sendo 3,01 e 4,44 para o isômero *trans* e 1,92 e 6,27 para o isômero *cis* (KOOSTSTRA *et al.*, 2009).

Existem ainda métodos de pré-tratamentos que utilizam solventes orgânicos, os quais visam principalmente a remoção de lignina resultando em aumento da área de superfície e volume de poros do substrato. A polpação com solvente orgânico (*polpação organosolv*) tem recebido atenção desde a década de 1970 como uma alternativa de evitar a poluição de ar e água (ZHANG, *et al.*, 2009) e, ao longo do tempo, vários autores

também têm aplicado esta tecnologia para o pré-tratamento de biomassa empregando metanol (CHUM *et al.*, 1988), etanol (TERAMOTO *et al.*, 2008), acetona (ARAQUE *et al.*, 2008) e glicerol aquoso (CHEN e SUN 2008a e b). Neste último caso, foi demonstrado que o emprego de glicerol no pré-tratamento de palha de trigo provoca queda no tamanho das partículas da biomassa, aumentando sua área superficial de contato (CHEN e SUN, 2008a). O pré-tratamento com glicerol, na proporção líquido-sólido de 20 g g⁻¹ a 220°C por 3 h, permitiu a remoção de 70% das hemiceluloses da palha de trigo com 90% de rendimento na hidrólise enzimática após 48 h de reação (CHEN e SUN, 2008b).

Apesar de os solventes orgânicos serem geralmente mais fáceis de recuperar do que água, esta tecnologia de pré-tratamento é atualmente economicamente inviável, devido à necessidade de lavar o substrato com solvente orgânico antes de lavar com água, para evitar a reprecipitação da lignina dissolvida. Além disso, por serem caros, faz-se necessária a recuperação máxima do solvente, resultando em alto consumo energético. Estes processos precisam ser realizados sob controle rígido e eficiente para evitar o vazamento de solventes evitando a ocorrência de intoxicação ou incêndios (ZHAO *et al.*, 2009). Por outro lado, os solventes apresentam como vantagem a possibilidade de recuperação da lignina sem muitas modificações químicas, o que, se explorada adequadamente pode contribuir para a viabilidade econômica do processo (ALVIRA *et al.*, 2010). Tal possibilidade estaria de acordo com o conceito de biorrefinaria, o qual considera o uso de todos os componentes da biomassa em co-produtos de alto valor agregado (ZHAO *et al.*, 2009).

Em contrapartida ao uso de solventes orgânicos, existem processos que empregam água quente como meio para o fracionamento da biomassa. Este pré-tratamento, denominado hidrotérmólise, não requer descompressão rápida e não utiliza catalisadores químicos externos. A temperatura deste pré-tratamento varia entre 160 a 240°C, com aplicação de alta pressão para manter a água no estado líquido e remover as hemiceluloses e parte da lignina, aumentando assim a acessibilidade da celulose. Logo após o processo de hidrotérmólise, são recuperadas duas frações, uma sólida enriquecida em celulose, e uma líquida, rica em açúcares derivados das hemiceluloses (MOSIER *et al.*, 2005). Como vantagens, este processo apresenta baixo custo operacional, pouco potencial de corrosão de equipamentos, e devido ao alto conteúdo de água, os produtos oriundos das hemiceluloses ou da lignina estão presentes em menores concentrações, diminuindo o risco de formação de compostos de degradação (como furfural), da ocorrência de modificações químicas de compostos lignínicos e gera boa recuperação de lignina e hemicelulose (HENDRIKS e ZEEMAN, 2008).

O pré-tratamento com água quente foi capaz de remover até 80% das hemiceluloses presentes na palha de milho (MOSIER *et al.*, 2005) e também se mostrou

eficiente para a palha de trigo (PÉREZ *et al.*, 2008) e para o bagaço de cana-de-açúcar (LYND *et al.*, 2002), reduzindo a formação de inibidores, tais como furfural e hidroximetilfurfural, quando realizado na faixa de pH entre 4 e 7. Sabe-se que a formação de furfural é devida a reações de desidratação de pentoses, enquanto que a formação de hidroximetilfurfural ocorre pela desidratação de hexoses (FENGEL e WEGENER, 1989).

O processo de explosão a vapor pode ser considerado o mais estudado dentre os pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica (NGUYEN *et al.*, 1996; SADDLER e GREGG, 1996), existindo, desde as últimas décadas, um número significativo de plantas-piloto espalhadas pelo mundo (CHEN *et al.*, 2013). A explosão a vapor consiste no pré-tratamento da biomassa a altas temperaturas e pressões, seguido de uma expansão abrupta do conteúdo do reator à pressão atmosférica. Durante este processo, as hemiceluloses da biomassa são parcialmente hidrolisadas e recuperadas na forma de um hidrolisado hidrossolúvel, rendendo o material lignocelulósico altamente acessível ao ataque de enzimas e reagentes químicos. Além disso, dependendo da severidade do processo, o componente lignínico pode sofrer desde hidrólise parcial até reações de condensação, gerando, neste último caso, estruturas complexas (huminas) de alta hidrofobicidade e baixa solubilidade em sistemas aquosos (SHEVCHENKO *et al.*, 1999; SUN, 2002).

Em geral, as condições de pré-tratamento a vapor devem ser otimizadas para cada tipo de material lignocelulósico. Nestes processos, é possível variar parâmetros como tempo, umidade, temperatura e pressão, sendo que quanto menores forem os valores de temperatura e pressão, maior o tempo necessário para atingir resultados interessantes (LAWTHER, 1996). Por outro lado, substâncias de vários tipos já foram empregadas como catalisadores auxiliares em processos de explosão a vapor, como dióxido de enxofre (SO₂) (ZACCHI *et al.*, 1995), dióxido de carbono (CO₂) (DALE e MOREIRA, 1982), H₂SO₄ (EMMEL *et al.*, 2003, ZACCHI *et al.*, 2007) e ácido fosfórico (AGUIAR *et al.*, 2013). A ação catalítica geralmente reduz o tempo e a temperatura necessários para garantir um bom desempenho ao processo. Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para otimizá-lo, já que, sob condições mais drásticas, a perda de rendimento e a geração de inibidores das etapas subsequentes aumentam, enquanto que, em condições mais suaves, o desempenho do substrato na etapa de hidrólise enzimática é parcialmente comprometido (OLSSON *et al.*, 2005).

O processo com amônia líquida (*Ammonia Fiber Explosion*, AFEX) corresponde a uma versão alcalina (em meio básico) da explosão a vapor e, desta forma, atua de maneira diferente, provocando a diminuição da cristalinidade da celulose e preservando a estrutura das hemiceluloses (OLSSON *et al.*, 2005). Por exemplo, o pré-tratamento de resíduo de destilaria seco (DDGS, do inglês *Dried Distillers Grains with Solubles*), na

faixa de 70 a 90°C por 20 a 30 min, permite que 90% da celulose sejam hidrolisados em 24 h utilizando enzimas comerciais (KIM *et al.*, 2008).

A explosão a vapor na presença de CO₂ é mais uma alternativa para se aproximar das condições ideais para remover os componentes que dificultam a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (ALVIRA *et al.*, 2010). Neste processo, é possível trabalhar em temperaturas menores, quando comparadas com os processos convencionais de explosão a vapor, o que proporciona maiores rendimentos, menores custos, maior sustentabilidade ambiental e maior segurança do que processos análogos como o AFEX (KUMAR *et al.*, 2009). Baseado na hipótese de que o CO₂ forma ácido carbônico (H₂CO₃) quando entra em contato com a umidade presente no material lignocelulósico, sua presença no processo de explosão a vapor deve proporcionar substratos mais homogêneos e de maior acessibilidade. Assim, este ácido, juntamente com outros ácidos formados ao longo do processo (como os ácidos acético e fórmico), conferiria eficiência ao processo sem maiores perdas dos carboidratos por desidratação a furfural e hidroximetilfurfural. Além disso, as moléculas de CO₂ são menores que as moléculas da água e de amônia, o que permite uma impregnação mais eficiente do material lignocelulósico (KUMAR *et al.*, 2009). Por exemplo, DALE e MOREIRA (1982) utilizaram o processo no pré-tratamento de alfafa com 4 kg de CO₂/kg de fibra e 56,2 bar de pressão, promovendo a conversão de 75% da glucose teórica com apenas 24 h de hidrólise enzimática.

Deve-se destacar ainda os processos biológicos, que utilizam micro-organismos que degradam lignina e hemiceluloses presentes na biomassa, facilitando assim o posterior acesso da celulose à hidrólise (SÁNCHEZ, 2009). Micro-organismos como *Phanerochaete cryosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoletus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus*, têm apresentado eficiência na degradação de lignina de materiais lignocelulósicos (KUMAR *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2008). No pré-tratamento da angiosperma *Salix babylonica* por 30 a 120 dias, a remoção de lignina foi de 26 a 45,6%, enquanto que a remoção das hemiceluloses foi 31,0 a 50,8%. Para a conífera *Cunninghamia lanceolata*, sob as mesmas condições, as perdas foram de 23,3 a 39,8% para lignina e de 21,6 a 31,4% para hemiceluloses, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, os pré-tratamentos biológicos, além de serem muito lentos, exigem uma série de etapas de lavagens para garantir um bom desempenho na hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

2.2.2. Pré-tratamento com fluido supercrítico

Um fluido supercrítico pode ser definido como um solvente que se encontra em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico (BUNKER, 2002), em que as

fases líquida e gasosa estejam indistinguíveis, apresentando, assim, pode difundir através de sólidos como um gás e dissolver materiais como um líquido (PASQUINI *et al.*, 2005). Assim, em condições supercríticas, os fluidos apresentam propriedades semelhantes às de líquidos (densidade) e gases (compressibilidade), o que lhes confere propriedades termodinâmicas peculiares, que podem ser utilizadas para a produção de compostos de interesse tecnológico e industrial. O CO₂ é não tóxico, apresenta alta capacidade de difusão, é inerte, tem baixa viscosidade e é naturalmente abundante, além de ser gasoso na temperatura ambiente (SIHVONEN *et al.*, 1999) e de apresentar ponto crítico relativamente fácil de ser alcançado (31,1 °C e 73,8 Bar) (ARAÚJO *et al.*, 2012). Portanto, o CO₂ supercrítico (scCO₂) apresenta propriedades benéficas quando comparadas às propriedades dos solventes convencionais, tais como baixa temperatura de operação e facilidade de remoção e recuperação (MAZZER *et al.*, 2012).

O uso de CO₂ em condições supercríticas (scCO₂) para a deslignificação da fitobiomassa foi iniciado na década de 1980 (LI, 1988). Sabe-se que a utilização de scCO₂ promove uma melhor impregnação da madeira, como consequência da alta mobilidade de ambos, fluido e soluto, através dos tecidos que a constituem (SMITH, 1993).

O scCO₂ também foi aplicado no pré-tratamento de biomassa de *Populus tremula* (angiosperma) e de *Pinus palustris* (gimnosperma), demonstrando que o processo pode levar a resultados expressivos no que se refere à hidrólise enzimática da celulose presente nestes materiais. Quando amostras apresentando 73 % de umidade (m/m) foram pré-tratadas com scCO₂ sob 213,74 bar de pressão e 165°C por 30 min, os rendimentos nas etapas de hidrólise enzimática foram de 84,7 e 27,3 %, para *P. tremula* e *P. palustris* respectivamente (KIM e HONG 2001). Neste caso, os autores atribuíram esta diferença devido ao fato de que a lignina de *P. palustris* é uma lignina guaiacólica (apenas uma posição meta no anel aromático metoxilada) ao passo que a lignina de *P. tremula* é majoritariamente siringólica (as duas posições meta no anel aromático metoxiladas), facilitando a remoção pelo processo empregando scCO₂.

Assim como o uso de solventes orgânicos, uma das vantagens de utilizar scCO₂ como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos está na possibilidade de recuperar a lignina com pureza considerável, principalmente mediante o uso de um co-solvente adequado (ALVIRA *et al.*, 2010). Por exemplo, o uso de 1-butanol como co-solvente possibilitou a obtenção de rendimentos de deslignificação de até 94,5%. No entanto, este resultado foi obtido pelo pré-tratamento empregando 60 % de 1-butanol em relação à fração líquida, por 105 min, a 190°C e 70 bar, que levou a degradação parcial dos polissacarídeos da biomassa (PASQUINI *et al.*, 2005).

Recentemente, LUTERBACHER *et al.* (2012) demonstraram que o pré-tratamento de folhosas e de switchgrass, empregando um sistema bifásico de H₂O/CO₂ em alta pressão (200 ± 10 bar), promoveu a conversão enzimática de 83 % e 80 % para mistura de folhosas e para “switchgrass”, respectivamente. O processo empregado consistiu de dois estágios de temperatura: o primeiro a 210°C, realizado por 16 min para a folhosa e por 1 min para “switchgrass”, e o segundo a 160°C, cuja duração foi de 60 min para ambos.

Além destas iniciativas de pré-tratamento, sistemas supercríticos também têm sido aplicados na liquefação de biomassa (RAMSURN e GUPTA, 2012). Neste caso, um novo processo foi proposto em duas etapas: a primeira a 200°C em água ácida subcrítica para liquefazer as hemiceluloses, na qual se evitam reações de repolimerização que podem levar à carbonização, e a segunda a 380°C em água supercrítica na presença de hidróxido de cálcio, para aumentar a solubilização da lignina juntamente com o aumento da liquefação da porção polissacarídica.

2.2.3. Pré-tratamento com líquidos iônicos

Além da aplicação de fluidos pressurizados como tecnologia “verde”, líquidos iônicos (LIs) também têm sido empregados como alternativa para o pré-tratamento de diferentes tipos de fitobiomassa. Os exemplos mais comuns de LIs incluem sais com cátions orgânicos tais como alquilimidazóis, alquilpiridinos, tetra-alquilamônio e tetra-fosfônio, e ânions como hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, nitrato, metanossulfonatos, trifluorometanol sulfonato, e bi-(trifluorometanosulfonil)-imida (TADESSE e LUQUE 2011). Dentre estas classes, os mais utilizados para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos são os alquilimidazóis, pois conseguem gerar uma celulose mais amorfa que, após dissolução, aumenta consideravelmente a sua acessibilidade aos biocatalisadores. Sabe-se também que a regeneração de celulose em acetato de 1-etil-3-metil-imidazol resulta na transição parcial da celulose tipo I para celulose tipo II (CHENG *et al.*, 2011). A grande eficiência dos processos de pré-tratamento de biomassa baseados na regeneração da celulose por dissolução em LI se deve ao fato de que estes materiais são solventes de alta força iônica, proporcionando, por exemplo, que o ânion possa interagir mais fortemente com a celulose através de ligações de hidrogênio. Uma representação de como ocorre a interação entre o líquido iônico com as hidroxilas da celulose é apresentada na FIGURA 9.

LIs têm sido aplicados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos de diferentes tipos como as biomassas de palma (TAN, 2011), palha de arroz (NGUYEN *et al.*, 2010), sabugo de milho (LI *et al.*, 2010c), palha de trigo (LI *et al.*, 2009), painço amarelo (LI *et al.*, 2010a) e bagaço de cana (DA SILVA *et al.*, 2011, 2013).

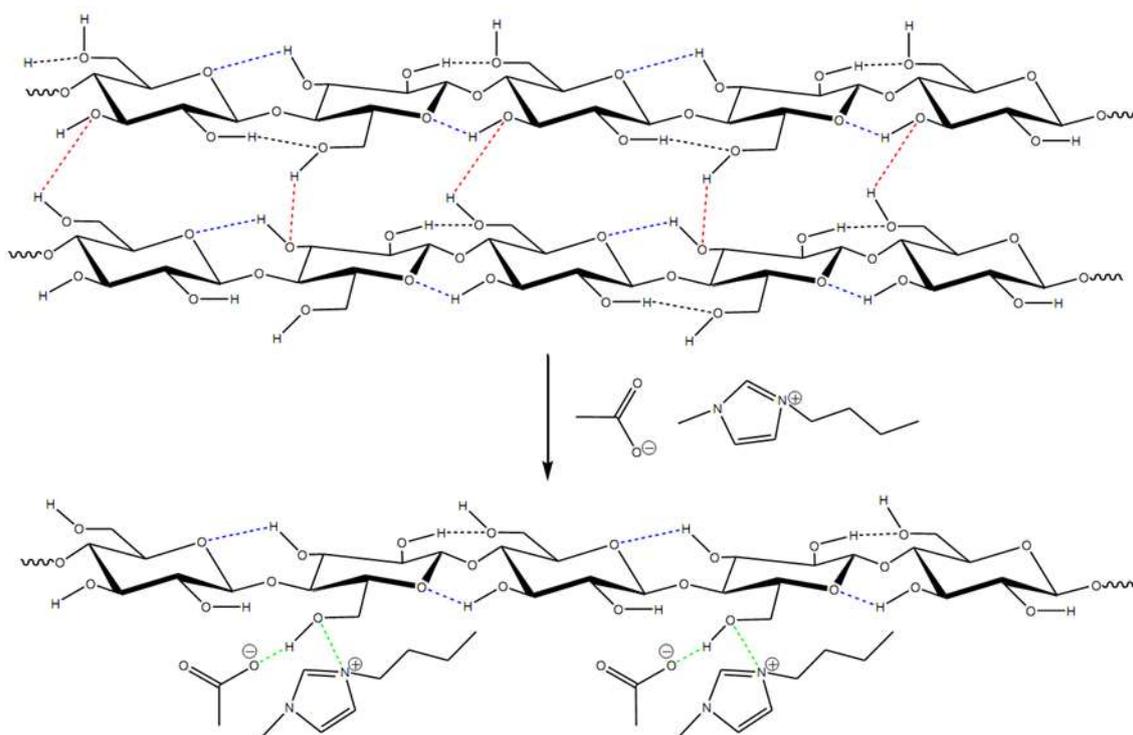


FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O ACETATO DE 1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOL COM A CELULOSE (ADAPTADA DE FENG E CHENG, 2008).

No pré-tratamento de palha de trigo (4 % m/m) utilizando fosfato de 1-etil-3-metilimidazol a 130°C por 30 min, houve um aumento na acessibilidade da celulose que resultou em 54,8 % de hidrólise em apenas 12 h de reação (LI *et al.*, 2009). Já o pré-tratamento de palha de arroz com amônia na presença de acetato de 1-etil-3-metilimidazol resultou na recuperação de 82 % da celulose com 97 % de rendimento na sacarificação enzimática (NGUYEN *et al.*, 2010). Além disso, neste último caso, o LI foi reciclado com sucesso por até 20 vezes, apresentando no último ciclo uma recuperação de 74 % da celulose com 78 % de rendimento em sua sacarificação enzimática.

A utilização de LI como agente no pré-tratamento de biomassa possibilita o dimensionamento de dois tipos de processo, nos quais as etapas de pré-tratamento e sacarificação podem ser realizadas separadas (DADI *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2009) ou simultaneamente (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010). Um estudo comparativo sobre estes processos foi realizado utilizando dimetilfosfito de 1-etil-3-metilimidazol no pré-tratamento de sabugo de milho (LI *et al.*, 2010c), apresentando como melhor resultado 70% de conversão dos açúcares na sacarificação *in situ* com apenas 24 h de reação.

Recentemente, foi apresentada uma comparação entre a eficiência do pré-tratamento de painço amarelo com ácido diluído e com o LI acetato de 1-etil-3-metilimidazol (Emim[OAc]). O pré-tratamento ácido foi realizado impregnando 3 % (m/m) de

painço amarelo com 1,2 % (m/m) de ácido sulfúrico durante 4 h na temperatura ambiente com uma etapa final de 20 min a 160 °C. Diferentemente, o pré-tratamento com LI foi realizado por dissolução da biomassa em uma consistência de 3 % (m/m) em LI por 3 h a 160 °C. Os resultados demonstraram que a celulose regenerada com LI apresenta maior área superficial, menor cristalinidade e menor teor de lignina em relação à celulose oriunda do pré-tratamento ácido, resultando em 96 % de conversão de glucanas após 24 h de hidrólise enzimática (LI *et al.*, 2010b).

Diferentes LIs à base de cátions imidazólicos foram também aplicados no pré-tratamento de bagaço de cana, empregando uma relação de 20:1 em relação à massa de biomassa seca (DA SILVA *et al.*, 2011). Neste caso, o substrato foi submetido à agitação na faixa de temperatura de 60 a 120°C, variando também o tempo de reação de 5 a 120 min. Os melhores resultados indicaram que mais de 95% de anidrogucose e 74% de anidroxilose foram liberados após 72 h de hidrólise enzimática, empregando tempos de pré-tratamento de 30 e 60 min. Além disso, os LIs mais eficientes foram o Emim[OAc] e o dimetil-fosfato de 1,3-dimetil-imidazol.

Uma vez que os processos de dissolução de lignocelulose empregando LIs demandam grandes quantidades destes solventes, diferentes alternativas vêm sendo propostas para mitigar o seu consumo em processos de pré-tratamento de biomassa. MONIRUZZAMAN e ONO (2013) propuseram recentemente a aplicação de lacases como agentes deslignificantes na presença de LI. O processo empregado nesta nova tecnologia de pré-tratamento consiste em realizar a dissolução da biomassa com LI, na consistência de 10 % (m/m peso seco) por 60 min a 80°C, seguida de uma degradação enzimática com a adição de lacase durante 24 h a 50°C.

Com o objetivo de facilitar a interação do LI com o substrato, DA SILVA *et al.* (2013) utilizaram um processo de extrusão com rosca dupla no pré-tratamento de bagaço de cana com Emim[OAc] na presença de 25 e 50 % (m/m) de substrato por 15 min a 140°C. Esta alternativa permitiu a recuperação de 90 e 76,4 % de glucose, respectivamente, após 24 h de hidrólise enzimática empregando com 2,5 % de substrato. Apesar de extremamente promissora, é importante mencionar que a hidrólise enzimática foi realizada utilizando carga enzimática relativamente alta, contendo: 15 FPU, 106 BGU, 1012,7 unidades de atividade em carboximetil celulose (CMCase), 814,8 unidades internacionais (UI) de xilanase, 4,9 UI de β -xilosidase e 40,3 UI de α -L-arabinofuranosidase por grama de biomassa.

Até o momento, não foram encontrados artigos que descrevam o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos empregando LI como co-solvente na presença de etanol e $scCO_2$. Além disso, de acordo com os métodos de pré-tratamento descritos até então, o aumento da acessibilidade da celulose à sacarificação enzimática exige grandes

quantidades de LI para dissolução da biomassa, tornando o processo economicamente pouco atrativo.

2.3. Hidrólise enzimática de lignocelulose pré-tratada

Após a realização do pré-tratamento visando a produção de um substrato mais desorganizado em relação à sua estrutura química, a hidrólise enzimática dos polissacarídeos presentes no material (principalmente a celulose) deve ser realizada. Portanto, a interação das enzimas com o substrato, seja este um substrato modelo ou gerado por um processo de pré-tratamento, deve ser estudada criteriosamente.

Apesar de décadas já terem sido dedicadas ao estudo da hidrólise enzimática de celulose e hemiceluloses, ainda não estão totalmente compreendidas as propriedades do substrato que atribuem maior eficiência à hidrólise nas condições operacionais necessárias ao seu uso para a produção de etanol em alto rendimento. Algumas das propriedades mais influentes do substrato incluem a acessibilidade deste frente às enzimas, o grau de cristalinidade (Crl, do inglês *Crystallinity Index*), o DP e a distribuição da lignina no substrato (PALONEN *et al.*, 2004; RAMOS, 2003; RAMOS e SADDLER, 1994).

A hidrólise enzimática da celulose é naturalmente realizada pela ação em sinergia das enzimas que compreendem o complexo celulolítico: as endo- β -1 \rightarrow 4-glucanases, as exo- β -1 \rightarrow 4-glucanases ou celobioidrolases, e as β -1 \rightarrow 4-glucosidases (HIMMEL *et al.*, 2001). No entanto, para a hidrólise dos demais polissacarídeos, são necessárias outras enzimas auxiliares como xilanases, pectinases e feruloil esterase (DECKER *et al.*, 2009).

A celulose encontra-se em estado sólido, portanto, processos de adsorção e dessorção devem ocorrer para que as celulasas possam atuar. Como resultado desta necessidade de adsorção, tanto as endo- β -1 \rightarrow 4-glucanases quanto as exo- β -1 \rightarrow 4-glucanases podem apresentar em sua estrutura um peptídeo majoritariamente não hidrolítico chamado Módulo de Ligação a Carboidrato (CBM do inglês *Carbohydrate Binding Module*) (BORASTON, 1997). Os CBMs apresentam aminoácidos que se dispõem de maneira planar às cadeias de celulose, facilitando a sua interação com o substrato conforme apresentado em verde na FIGURA 10 para o modelo estrutural do CBM de *Erwinia chrysanthemi* (3.2.1.4) (BRUN *et al.*, 1997). Neste caso, as interações com a celulose ocorreriam por ligações de hidrogênio através da hidroxila fenólica da tirosina e por interações de van der Waals com as moléculas de triptofano (RABINOVICH, 2002; TEERI, 1997). Apesar disso, de acordo com VÁRNAI *et al.* (2013), mais de 60% das celulasas do *Trichoderma reesei* não tem CBM.

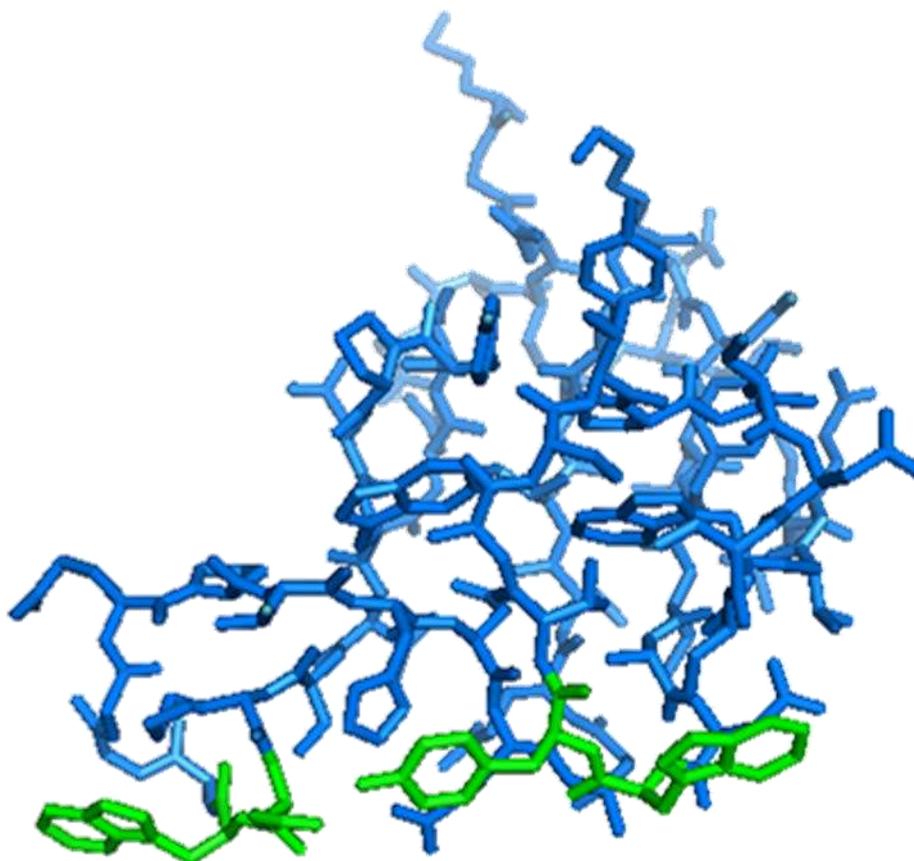


FIGURA 10. MODELO ESTRUTURAL DO MÓDULO DE LIGAÇÃO AO CARBOIDRATO (3.2.1.4). EM VERDE ESTÃO REPRESENTADOS OS AMINOÁCIDOS DE RESÍDUOS AROMÁTICOS (MODELO GERADO COM O SOFTWARE PYMOL®).

Estruturalmente, um aspecto importante que está relacionado ao modo de ação das celulasas é a diferença que existe entre os sítios catalíticos de EnGs e ExGs. A FIGURA 11 apresenta os modelos estruturais de dois domínios catalíticos complexados com celotetrose, que permite visualizar a diferença estrutural entre EnGs, que possui sítio catalítico na forma de fenda, e ExGs, que possuem sítio catalítico na forma de túnel. Neste caso são apresentados os domínios catalíticos da Cel5A de *Thermobifida fusca*, (BERGLUND *et al.*, 2007) e da Cel7A de *Talaromyces emersonii* (QIN *et al.*, 2010), Assim, EnGs são capazes de promover a quebra de ligações glicosídicas ao longo da cadeia celulósica, atuando principalmente nas regiões não cristalinas (RABINOVICH *et al.*, 2002). Esta reação conduz à formação de duas novas extremidades da cadeia, desencadeando a relação de sinergia endo-exo. Por outro lado, ExGs necessitam que a cadeia de celulose penetre no túnel catalítico para que sua atividade catalítica ocorra, liberando majoritariamente celobiose como produto. Uma vez capturada pelas ExGs, a

cadeia de celulose é forçada a descolar/desacoplar da superfície e a sua solubilização gradual se inicia progressivamente pela ação destas enzimas.

O complexo celulásico pode ser produzido por vários micro-organismos e, dentre estes, o mais importante é o de *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*), um fungo filamentoso e mesofílico que produz um complexo enzimático completo, contendo pelo menos quatro endoglucanases (*TrCel5A/EG-II*, *TrCel12A/EG-III*, *TrCel7B/EG-I* e *TrCel45A/EG-V*), duas exoglucanases (*TrCel7A/CBH-I*, *TrCel6A/CBH-II*) e várias β -glucosidases (β G) (FOREMAN *et al.*, 2013).

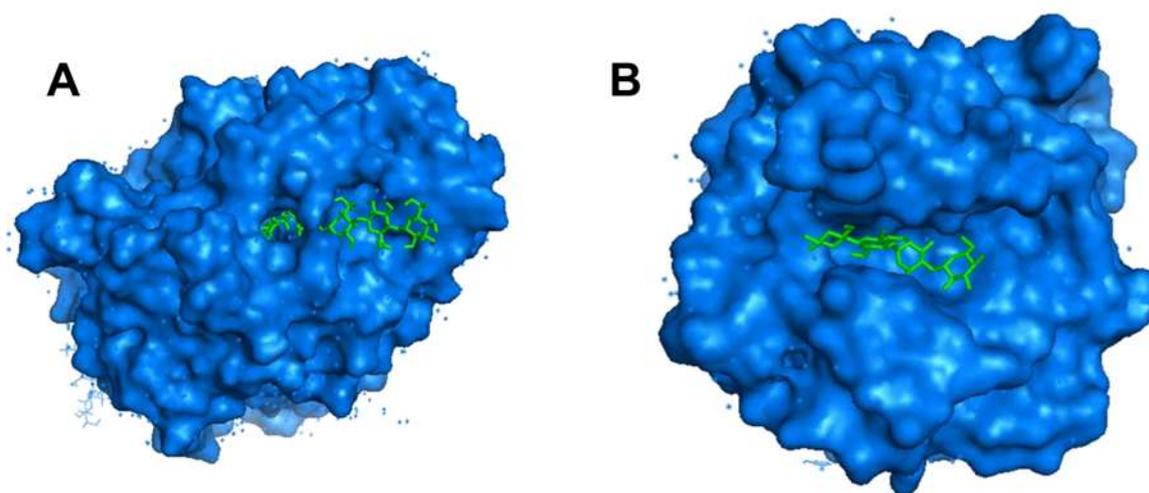


FIGURA 11. MODELO ESTRUTURAL DE DOMÍNIO CATALÍTICO DE CEL7A (A) E CEL5A (B) COMPLEXADAS COM CELOTETROSE (MODELO GERADO COM O SOFTWARE PYMOL[®]).

Wood e McCrae (1979) descreveram que a hidrólise enzimática da celulose ocorre inicialmente pela formação de terminais (redutores e não redutores) ao longo da cadeia de celulose devido, majoritariamente, à ação das EnGs. Assim, as ExGs podem atuar nestes terminais, sendo que a CBH-I atua nos terminais redutores, enquanto que a CBH-II atua nos terminais não redutores. Finalmente, celobiose e outros oligômeros de baixa massa molecular são convertidos em glicose por ação das β G (TEERI, 1997). Esta ação sequencial das 3 enzimas evidencia a sinergia existente entre as principais enzimas do complexo celulolítico. A FIGURA 12 apresenta um modelo de hidrólise enzimática da celulose.

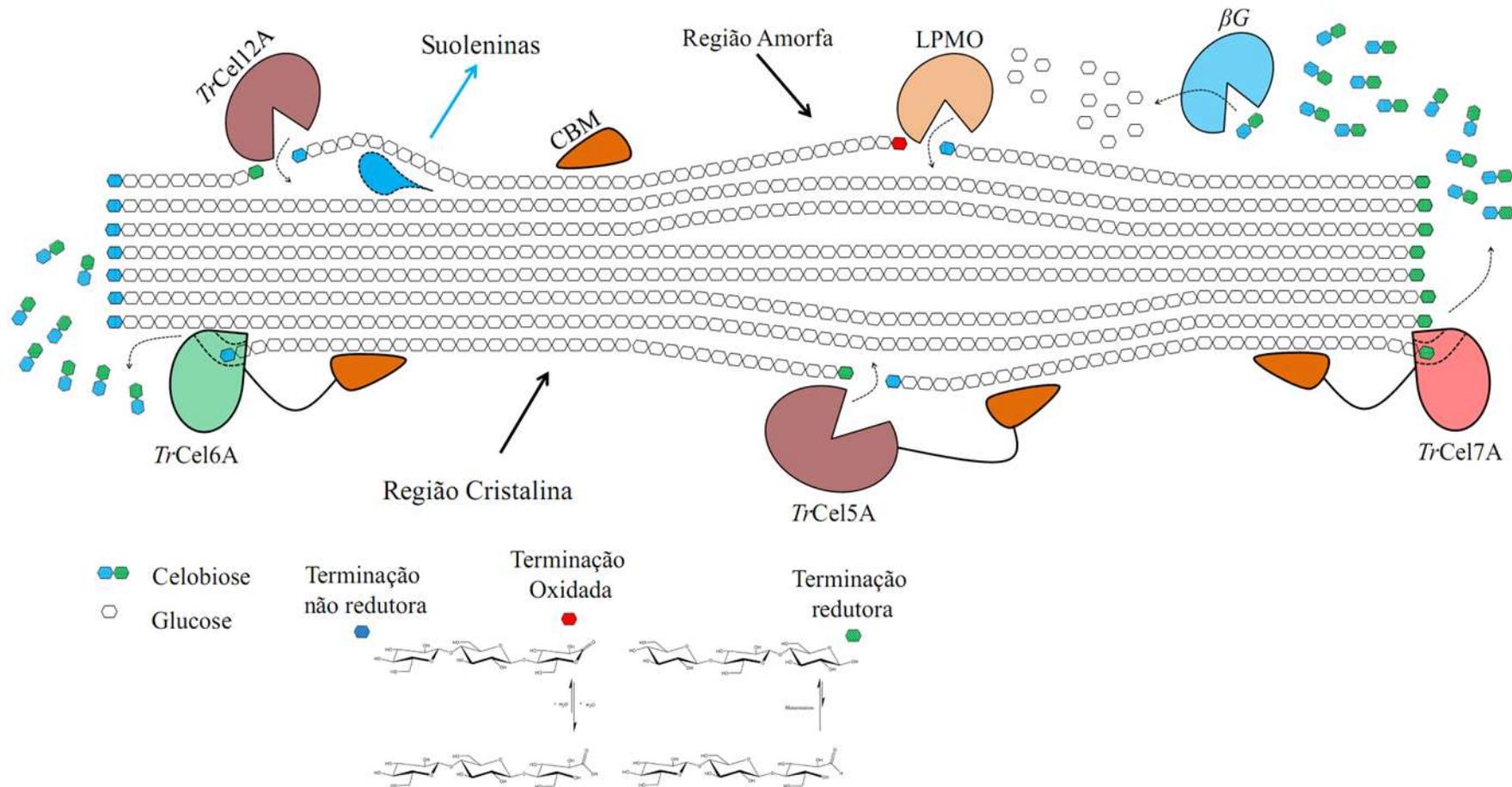


FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE POR ENZIMAS HIDROLÍTICAS E NÃO HIDROLÍTICAS (ADAPTADO DE SILVEIRA *et al.*, 2014).

Outros sistemas celulásicos têm sido investigados no seu desempenho para hidrolisar substratos celulósicos, tais como o proteoma de *Neurospora crassa* (PHILLIPS *et al.*, 2011), as celulasas de *Penicillium* (MARJAMAA *et al.* 2013), a Cel7A de diferentes espécies de fungos termofílicos (VOUTILAINEN *et al.*, 2008) e várias EnGs das famílias de glicosil hidrolases (GH) 5, 6, 7, 9, 12 e 45 (VLASENKO *et al.*, 2010), entre outros.

Enzimas celulolíticas representam uma das classes enzimáticas mais importantes para o desenvolvimento de biorrefinarias. No entanto, proteínas auxiliares também têm sido identificadas como importantes ferramentas para alcançar altas taxas de conversão na sacarificação de celulose (ARANTES e SADDLER, 2010; EKWE *et al.*, 2013), tais como expansinas, suoleninas e monooxigenases polissacarolíticas (do inglês *Lytic Polysaccharide Monooxygenases* - LPMO).

Proteínas de ligação à celulose podem promover a desaglomeração das cadeias de regiões cristalinas causando amorfogênese no substrato, e este parece ser um passo fundamental para que a hidrólise atinja altas conversões (DIN *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 2010). Suoleninas e expansinas podem quebrar as interações que mantêm a estrutura supramolecular da celulose sem promover a hidrólise. Em geral, o tratamento com suolenina leva a uma diminuição no tamanho e cristalinidade das partículas do substrato, aumentando a área disponível para a adsorção das celulasas e levando a altas taxas de hidrólise de celulose (JÄGER *et al.* 2011).

Em 2005, VAAJE-KOLSTAD e colaboradores (2005) identificaram uma nova bactéria capaz de secretar um domínio de ligação à quitina (CBP do inglês *Chitin Binding Protein*) denominado de CBP21, que foi capaz de quebrar as cadeias do polissacarídeo, enquanto aumentava a acessibilidade do substrato às enzimas quitinolíticas. Com base nisto, CBP21 foi classificada como um módulo de ligação a carboidrato da família 33 (CANTAREL *et al.*, 2009). Esses e outros autores também demonstraram que a CBP21 é capaz de aumentar a acessibilidade de celulose frente à enzimas celulolíticas (EIJSINK *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2010; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2005).

Recentemente, um novo tipo de monooxigenase LPMO foi descoberto e classificado como uma glicosil hidrolase da família 61 (GH61) (HARRIS *et al.*, 2010; QUINLAN *et al.*, 2011). Similarmente à CBP21, esta enzima catalisa a clivagem oxidativa de polissacarídeos, gerando novas extremidades de cadeia, enquanto modifica a distribuição de carga na superfície do substrato celulósico. A atividade destas enzimas oxidativas depende da presença cofatores como íons de metais bivalentes e de um doador de elétrons. Estes e outros autores mostraram que as enzimas oxidativas aumentam a taxa de conversão de materiais celulósicos por hidrólise enzimática. A FIGURA 13 mostra uma hipótese para a ação de LPMO. As extremidades da cadeia de celulose oxidada são parcialmente convertidas em ácido aldônico (CANNELLA *et al.*,

2012) e esta estrutura aberta altamente solvatada força a cadeia a se descolar da superfície, conduzindo a uma desagregação gradual da estrutura da celulose e a um aumento na disponibilidade de novos locais de reação para ambas ExG e EnG.

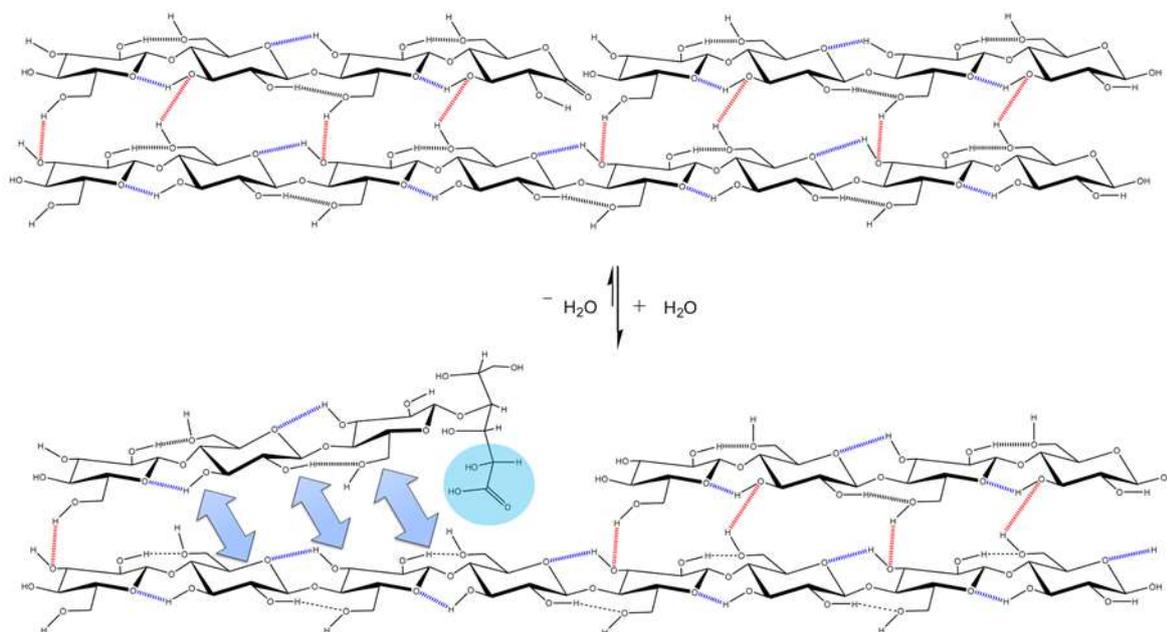


FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO HIPOTÉTICA DO EFEITO DA AÇÃO DE ENZIMAS MONOOXIGENASES NA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE, PROMOVEDO A SUA AMORFOGÊNESE (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Diferentes fatores relacionados ao substrato podem afetar a sinergia entre as enzimas do complexo celulásico durante a hidrólise enzimática, entre eles, mudanças no grau de polimerização e na quantidade de celulose disponível para conversão. Portanto, o grau de efeito sinérgico (DSE do inglês *Degree of Synergistic Effect*) entre as enzimas do complexo celulásico tem sido investigado em relação à diferentes propriedades do substrato (BOISSET *et al.*, 2001; MEDVE *et al.*, 1998; VALJAMÄE *et al.*, 1999). Para alcançar altos valores de conversão em reações de hidrólise da celulose com misturas celulolíticas completas, apenas uma pequena quantidade de EnG é necessária (BOISSET *et al.*, 2001; GUPTA e LEE 2009; HENRISSAT *et al.*, 1985), certamente devido à ação de sinergia entre EnG, ExG e β G (IRWIN *et al.*, 1993; VALJAMÄE *et al.*, 1999). No entanto, apesar do fato destas propriedades terem influência direta sobre a velocidade da reação de hidrólise, o modo de desconstrução enzimática da celulose não sofre alteração. Enquanto que baixos valores de DSE têm sido relatados para substratos de alta cristalinidade (CHUNDAWAT *et al.*, 2011), um efeito contrário tem sido observado para substratos de cristalinidade intermediária como papel filtro Whatman N°1 (W1FP do

inglês Whatman N°1 Filter Paper) (MEDVE *et al.*, 1998; SAMEJIMA *et al.*, 1997; VALJAMÄE *et al.*, 1999).

Além da sinergia existente entre as enzimas do complexo celulolítico, enzimas que degradam hemiceluloses e lignina também exercem alguma sinergia durante a degradação de materiais lignocelulósicos, principalmente entre celulasas e hemicelulasas (VÁRNAI *et al.*, 2011).

Neste caso, estas enzimas auxiliares aumentam a acessibilidade da celulose às enzimas que atuam na sua degradação. Dentre os exemplos mais relevantes sobre o assunto, deve-se destacar os relatos sobre sinergia entre endoxilanasas e celulasas de *Termobifida fusca*, que proporcionou aumento de conversão de aproximadamente 2,4 vezes na conversão de palha de trigo (MORAIS *et al.*, 2010), bem como entre xilanasas e celulasas de *T. reesei* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, apresentando aumentos de 6,6 %, 8,8 %, e 9,5 % nos valores de conversão, quando 20 % das celulasas empregadas foram substituídas por xilanasas (LI *et al.*, 2014).

Além disso, deve-se mencionar a sinergia presente na ação auxiliar de enzimas que degradam hemiceluloses, como endo-mananase e endo-xilosidase (BEUKES e PLETSCHE, 2011) e com arabinofuranosidase, endo-mananase e endo-xilosidase (BEUKES e PLETSCHE, 2010), ambos na hidrólise de bagaço de cana, bem como entre exoglucanase, endo-xilanase, ácido ferúlico esterase e acetil xilana esterase na hidrólise de palha de milho pré-tratada por hidrotermólise a 200 °C por 16 min, utilizando 2,5 % (m/m, base seca) de substrato (SELIG *et al.*, 2008).

Para investigar a sinergia existente entre as enzimas do complexo celulolítico, é importante determinar a atividade do preparado enzimático. Neste caso, quando se trata de preparados multi-enzimáticos, a caracterização individual da atividade exercida por cada componente é ainda mais laboriosa. Atualmente, a determinação das principais atividades enzimáticas envolvidas na degradação da celulose é realizada de acordo com a proposta da União Internacional de Química Pura e Aplicada (I.U.P.A.C., do inglês (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)) (GHOSE, 1987). Este procedimento está baseado no uso de diferentes substratos para a determinação individual das atividades enzimáticas envolvidas na hidrólise da celulose, fator este que limita a comparação direta entre as atividades.

O método de GHOSE (1987) define uma Unidade de Papel de Filtro (FPU) como aquela decorrente de uma diluição de enzima que pode liberar 2 mg de açúcar redutor total (AR_{Tot}) após 60 min de hidrólise de 50 mg de papel filtro em 1,5 mL de reação, ou $1,33 \text{ mg mL}^{-1}$ de AR_{Tot} ($11,11 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$), que corresponde à hidrólise de 4% da massa do substrato. No entanto, esta premissa foi sugerida supondo que ocorre inibição

competitiva das celulasas pelos principais produtos de reação, celobiose e glucose, o que foi baseado em estudos realizados empregando preparados enzimáticos oriundos do *T. reesei*. No entanto, estes parâmetros são falhos para a caracterização de preparados enzimáticos oriundos de outras fontes, pois este ponto de inibição nem sempre é o mesmo para diferentes preparados enzimáticos, além de também poder depender das condições experimentais. Portanto, por mais que celulasas sejam hidrolases e que apresentem um comportamento logarítmico em relação ao fator de diluição, não basta encontrar a concentração enzimática que produz $1,33 \text{ mg mL}^{-1}$ de AR, pois seria necessário encontrar o ponto de inibição de cada preparado enzimático em específico.

Diferentes tentativas de melhorar as metodologias para a determinação de atividades celulolíticas têm sido propostas, tais como o uso de sensor amperométrico para a detecção de atividade de celobiose desidrogenase (HILDEN *et al.*, 2001), a automatização do método de determinação de FPU (DECKER *et al.*, 2003), o emprego de microfibrilas fluorescentes (HERLBERT *et al.*, 2003), o uso de cristais de quartzo microbalanceados (quartz crystal microbalance (QCM)) (HU *et al.*, 2009) e a análise colorimétrica miniaturizada (miniaturized colorimetric assay) (KING *et al.*, 2009).

Recentemente, uma nova proposta para a determinação de atividade endoglucanásica em papel filtro W1FP foi proposta, a qual é baseada na determinação de açúcares redutores insolúveis (AR_{Insol}) produzidos ao longo da hidrólise (GUPTA e LEE, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2012). A produção de AR_{Insol} é atribuída às EnGs, por que estas enzimas atuam majoritariamente na celulose não cristalina sem a liberação de quantidades consideráveis de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) (RABINOVICH *et al.*, 2002).

Portanto, além de propor o desenvolvimento de uma nova tecnologia de pré-tratamento envolvendo solventes verdes (etano, dióxido de carbono e líquidos iônicos) que seja possa vir a contemplar as premissas de integração de processos e aproveitamento do arsenal químico da biomassa, segundo o conceito de biorefinaria, este trabalho também apresenta parte de seus objetivos focados no desenvolvimento de uma metodologia de investigação de modo do ação das enzimas do complexo celulolítico seja na degradação de substratos puramente celulósicos padrão tal como o W1FP, seja na degradação de substratos lignocelulósicos experimentais, visando melhor entender os efeitos do pré-tratamento na suscetibilidade dos substratos frente à bioconversão.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Desenvolver uma metodologia de pré-tratamento baseada no uso de dióxido de carbono supercrítico e etanol na presença de líquido iônico como co-solvente, visando aumentar a susceptibilidade à hidrólise enzimática do bagaço de cana, e investigar o modo de ação das enzimas do complexo celulásico na conversão de substratos gerados pela nova tecnologia de pré-tratamento em comparação com substratos padrão.

3.2. *Objetivos Específicos*

- [1] Realizar a determinação dos efeitos das variáveis independentes do processo $scCO_2/EtOH-LI$ na composição química, na cristalinidade e na susceptibilidade à bioconversão dos substratos gerados;
- [2] Caracterizar a composição química das frações insolúveis derivadas do pré-tratamento;
- [3] Desenvolver modelos matemáticos que sejam capazes de relacionar as variáveis do processo com os aspectos químicos associados à eficiência do pré-tratamento e da hidrólise enzimática;
- [4] Avaliar o efeito do cátion e do ânion do líquido iônico no pré-tratamento de bagaço de cana por $scCO_2/EtOH-LI$;
- [5] Avaliar o perfil hidrolítico dos substratos pré-tratados empregando Cellic CTec2[®] com a metodologia de determinação dos açúcares redutores liberados ao longo da hidrólise;
- [6] Investigar a acessibilidade dos substratos celulósicos padrão ou experimentais determinando o efeito de sinergia das enzimas exoglucanase I e exoglucanase II com a endoglucanase II na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise, na presença e na ausência de atividade β -glucosidásica;
- [7] Desenvolver uma metodologia alternativa para determinação do modo de ação de preparados enzimáticos utilizando um único substrato (ligno)celulósico, seja este padrão ou experimental, com base nos estudos de sinergia.

4. METODOLOGIA

4.1. Material

No presente trabalho, os experimentos de pré-tratamento envolveram o uso de três líquidos iônicos, acetato de 1-butil-3-metilimidazol (Bmim[OAc]) (95 %, Sigma-Aldrich), cloreto de 1-butil-3-metilimidazol (Bmim[Cl]) (95 %, Sigma-Aldrich) e acetato de 1-etil-3-metilimidazol (Emim[OAc]) (96 %, Sigma-Aldrich), além de etanol anidro (99,8 % Sigma-Aldrich), etanol (95 %, Sigma-Aldrich) e dióxido de carbono (99,5 %, White Martins). Os demais reagentes foram utilizados em grau analítico ou cromatográfico, dependendo da aplicação.

As preparações enzimáticas comerciais celulolíticas Cellic CTec2[®], Novozym 188[®] e Celluclast 1.5 L FG[®] foram fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR). Vale ressaltar que, dentre estes preparados, a Cellic CTec2[®] foi desenvolvida especialmente para o emprego em processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e, por esta razão, apresenta alta eficiência em baixas concentrações de enzima. Além destes preparados comerciais, outros preparados enzimáticos foram utilizados no presente trabalho, como amostras purificadas de EG-I, EG-II, CBH-I, CBH-II de *Trichoderma reesei* e uma β G de *Aspergillus niger*, que foram gentilmente fornecidos pelo VTT Biotechnology (Finlândia).

Os ensaios de avaliação do modo de ação das enzimas purificadas em substratos (ligno)celulósicos foram realizados ao longo de um período de doutorado sanduíche, realizado no VTT Biotechnology.

4.2. Preparo de substratos em sistema supercrítico

Inicialmente, o material *in natura* foi submetido à extração em aparelho Soxhlet empregando etanol 95 % como solvente conforme sugerido por SLUITER *et al.* (2008b) por 12 h, para gerar um material com baixo teor de extrativos (BC_{LEE}).

Conforme a FIGURA 14, o processo de pré-tratamento consiste em pressurizar o reator contendo o material livre de extraíveis na presença de etanol e de líquido iônico. Nesta etapa de pré-otimização, foi empregado o [Bmim]OAc e posteriormente, outros dois líquidos iônicos foram testados conforme descrito no item 4.2.2., o Emim[OAc] e o Bmim[Cl] (FIGURA 15). A pressurização consistiu em alimentar o reator do tipo Parr de 50 mL de volume interno com uma quantidade específica de scCO₂. Além disso, é importante reiterar que os ensaios de pré-tratamento foram realizados com material de baixo teor de extrativos.

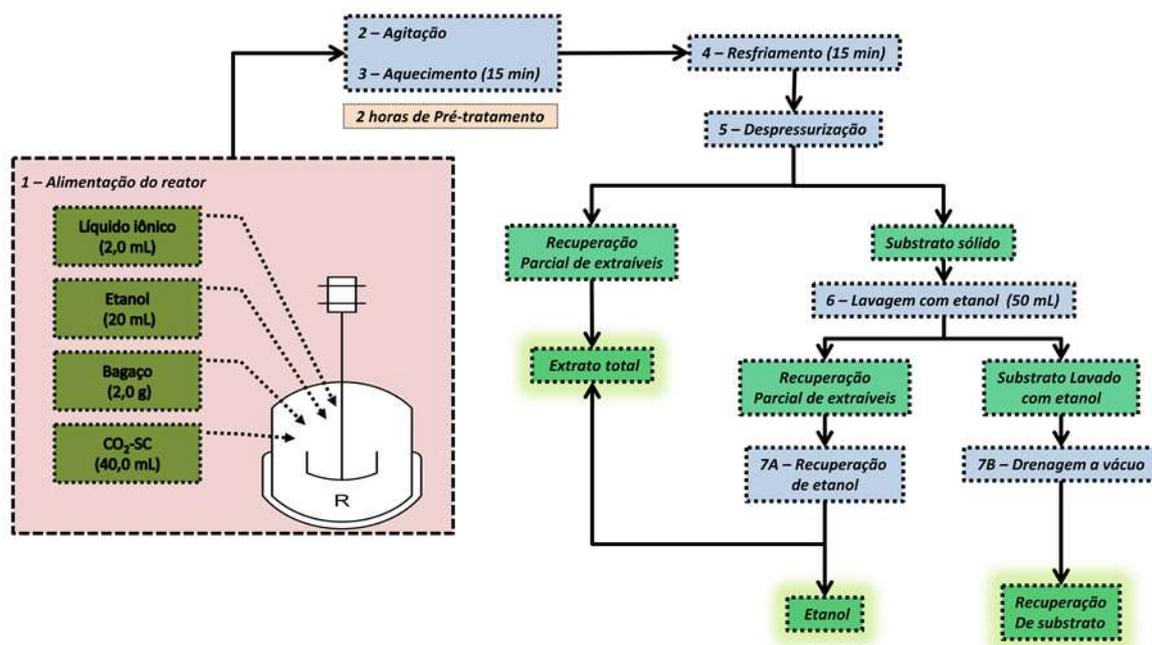


FIGURA 14. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO SISTEMA EM ESCALA DE LABORATÓRIO PARA O PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA COM FLUIDO PRESSURIZADO.



FIGURA 15. MODELOS ESTRUTURAIS DOS TRÊS LÍQUIDOS IÔNICOS IMIDAZÓLICOS UTILIZADOS.

De maneira mais descritiva, o reator foi carregado com o material juntamente com o LI correspondente e etanol e, então, uma carga de CO₂ é adicionado em pressão 20 bar superior à pressão desejada no reator, neste caso foram empregados 35, 40 e 45 mL de CO₂ para os ensaios realizados nas temperaturas de 110, 145 e 180 °C, ao passo que a pressão foi corrigida por liberação de CO₂ em excesso. Além disso, é importante mencionar que a alimentação do reator com CO₂ foi realizada em duas etapas, injetando inicialmente 70 % do volume total de CO₂ no reator até que este atingi-se a temperatura e etnãõ os demias 30 % foram adicionados. Sendo assim, o processo de pré-tratamento foi iniciado sob 500 rpm de agitação, e ao final de 2 h, o reator foi resfriado e

despressurizado. O substrato produzido foi lavado por 1 h com etanol e seco em estufa a 45 °C, até massa constante após drenagem a vácuo.

Os materiais gerados no pré-tratamento foram submetidos à análise de composição química (item 4.3) e com a massa de material seca obtida no final do pré-tratamento, foi possível calcular o rendimento mássico do pré-tratamento (R_M) para cada componente de origem, de acordo com a Equação 1.

$$R_M = \frac{\text{massa seca final}}{\text{massa seca inicial}} 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.2.1. Estudo preliminar de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico na presença de etanol e de líquido iônico como co-solvente

Para verificar o efeito das variáveis independentes do processo de pré-tratamento sobre as propriedades dos substratos gerados, experimentos foram realizados seguindo as condições de um planejamento fatorial com três variáveis em dois níveis (2^3) e triplicata no ponto central, conforme apresentado na TABELA 1.

TABELA 1. NÍVEIS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA EM SISTEMAS SUPERCRÍTICOS.

Variáveis	Níveis experimentais		
	Inferior (-1)	Superior (+1)	Central (0)
Temperatura (°C)	110	180	145
Pressão (bar)	195	250	222,5
[LI] (m/m)	0,0	1,0	0,5

Ensaio de pré-tratamento foram realizados conforme o planejamento fatorial descrito na TABELA 1. A temperatura mínima foi fixada em 110 °C baseado nos resultados de SWATLOSKI *et al.* (2002) para a regeneração de substratos na presença de LI imidazólicos, enquanto que o nível máximo de 180 °C foi fixado para evitar a maior degradação dos polissacarídeos constituintes da biomassa, que ocorre majoritariamente acima de 200 °C segundo, KÖLL *et al.* (1991). Por outro lado, a maior quantidade de LI utilizada foi de 1:1 (LI:substrato) em relação à massa seca de substrato, visando uma redução de 20 vezes nos valores utilizados em processos de pré-tratamento por regeneração de celulose (BLAKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009; SHILL *et al.*, 2010). Por este motivo, com base nas condições de pressão utilizados por GAO *et al.* (2010b) no

pré-tratamento de palha de arroz com scCO_2 , no presente trabalho os ensaios de pré-tratamento foram realizados sob pressões de 195 bar a 250 bar com o objetivo de facilitar a permeação do LI na lignocelulose. O tempo de reação do pré-tratamento foi fixado em 2 h, pois CHENG *et al.* (2011) demonstraram que tempos superiores a este não proporcionam maiores alterações na composição química da biomassa em pré-tratamentos baseados no uso de LIs imidazólicos para a regeneração do substrato após sua dissolução.

Os resultados obtidos, tanto para a composição química do substrato e seu grau de designificação, quanto para o aumento de sua acessibilidade à bioconversão, foram analisados por regressão linear múltipla. Para validação do modelo matemático, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica[®] 7.0. Como resultados desta análise estatística, os efeitos das variáveis independentes foram apresentados na forma de gráficos de Pareto, e os modelos matemáticos validados foram aplicados na construção de superfícies de resposta.

4.2.2. Análise do efeito do cátion e do ânion do líquido iônico no pré-tratamento

Ensaio com LI de diferentes estruturas foram realizados na condição de maior severidade de acordo com o desenho experimental, empregando Bmin[OAc]. Neste caso, os LIs utilizados para a comparação com Bmim[OAc] foram o acetato de 1-etil-3-metilimidazólio (Emim[OAc]) e o cloreto 1-butil-3-metilimidazólio (Bmim[Cl]). Assim, as condições experimentais foram de 250 bar, 180 °C e razão 1:1 (m/m) entre biomassa e LI. No entanto, os ensaios a 180°C na presença de Bmim[Cl] levaram à carbonização do material e, por este motivo, novos ensaios utilizando este LI foram realizados a 110 °C. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.

4.2.3. Determinação da recuperação de líquido iônico

A quantidade de LI que permaneceu na fração líquida do pré-tratamento foi determinada por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Além disso, com o objetivo de identificar se os substratos pré-tratados com os diferentes LIs apresentavam quantidades remanescentes de LI, estes materiais foram lavados com água ultrapura por 12 h e o sobrenadante da reação foi levado à análise cromatográfica. Neste caso, o processo de lavagem foi realizado na temperatura ambiente utilizando 100 mg de substrato em 2 mL de volume total com agitação por barra magnética.

A análise cromatográfica foi realizada empregando um sistema de cromatografia de íons Metrohm modelo 882 Compact IC plus, equipado com amostrador automático

modelo 863 Compact, coluna Metrosep A supp5 (150 x 4,0 mm; 5,0 μm), pré-coluna Metrosep RP e detecção por condutividade e por espectrofotometria no ultravioleta, usando detector UV/Vis 887 Professional configurado em 205 nm. As análises foram realizadas a 32 °C em sistema de eluição isocrático empregando tampão carbonato/bicarbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 0,7 mmol L⁻¹ em vazão de 1,0 mL min⁻¹. A determinação da concentração de LI foi realizada por calibração externa, e a concentração de LI encontrada foi expressa em porcentagem de LI em relação à massa de LI utilizada no pré-tratamento, de acordo com a Equação 2.

$$R_{LI} = \frac{\text{massa de LI quantificada}}{\text{massa de LI inicial}} 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.3. Análise química de lignocelulose

O material *in natura* foi submetido a um processo de extração contínua em Soxhlet com etanol 95 %, visando a produção de material livre de extrativos alcóolicos (BC_{LEE}). A determinação da composição química do bagaço de cana antes e depois do pré-tratamento foi realizada de acordo com as recomendações do Laboratório Nacional de Energias Renováveis dos Estados Unidos (NREL, do inglês *National Renewable Energy Laboratory*). No entanto, em virtude da pouca massa empregada no pré-tratamento, os substratos pré-tratados não foram submetidos às análises de extraíveis e cinzas. Nos próximos itens deste capítulo, encontram-se descritas as metodologias empregadas na análise química dos substratos.

4.3.1. Determinação do teor de cinzas

Uma massa conhecida de bagaço de cana (~1,0 g) foi condicionada em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado e pesado, que foi então submetido a uma rampa de aquecimento conforme descrito por SLUITER *et al.* (2008a). Neste procedimento, o material foi aquecido até 575°C onde permaneceu por 3 h, para depois ser submetido a uma rampa de resfriamento com duração de 4 h. O teor de cinzas foi obtido gravimetricamente após a pesagem do cadinho calcinado e o resultado foi expresso em porcentagem em relação à massa seca de substrato, conforme a Equação 3.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{m_{cad-f} - m_{cad}}{m_{am}} 100 \quad \text{Equação 3}$$

em que m_{cad-f} é a massa do cadinho calcinado com a cinza da amostra, m_{cad} é a massa do cadinho previamente tarado, e m_{am} é a massa da amostra empregada no ensaio.

4.3.2. Extraíveis

O material *in natura* foi submetido à extração em aparelho Soxhlet empregando etanol 95 % como solvente conforme sugerido por SLUITER *et al.* (2008b) por 12 h. etnaol foi recuperado por destilação rotativa em pressão reduzida, e a massa de extrato foi determinada gravimetricamente, sendo o resultado expresso em porcentagem de massa (base seca) de material utilizada no ensaio, de acordo com a Equação 4. O objetivo desta etapa foi de produzir material com baixo teor de extraíveis, o qual foi então submetido ao processo de pré-tratamento em sistema de alta pressão.

$$\text{Teor de extraíveis (\%)} = \frac{m_{bal-f} - m_{bal}}{m_{am}} 100 \quad \text{Equação 4}$$

em que m_{bal-f} é a massa do balão de fundo redondo com os extrativos, m_{bal} é a massa do balão previamente tarado, e m_{am} é a massa da amostra empregada no ensaio.

4.3.3. Análise química pelo método da lignina de Klason

A composição química dos substratos pré-tratados foi realizada de acordo com o método proposto por SLUITER *et al.* (2011) para a determinação de lignina solúvel e insolúvel em ácido. Já a composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante da determinação de Klason usando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), conforme este mesmo procedimento.

O método consistiu na hidrólise de 100 mg de amostra com 1 mL de ácido sulfúrico 72% por 1 h a 35 °C. Em seguida, o material foi diluído com 28 mL de água destilada e condicionado a 121°C por 1 h para posterior filtragem. A massa retida no cadinho de Gooch foi quantificada gravimetricamente e denominada Lignina Insolúvel em Ácido (LIA). Por outro lado, o filtrado foi avolumado em um balão de 100 mL e esta fração foi submetida à análise de Lignina Solúvel em Ácido (LSA) via análise espectrofotométrica. A determinação de LSA foi realizada de acordo com a Equação 5,

$$LSA\% = \frac{UV_{Abs} \times Volume_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon \times m_{seca}} \quad \text{Equação 5}$$

em que UV_{Abs} é a absorvância em 240 nm, ϵ (25) é a absorvância molar da lignina de bagaço de cana de açúcar neste comprimento de onda (SLUITER *et al.*, 2011) e m_{seca} é a massa seca do material submetido ao ensaio.

Para a análise cromatográfica, foi empregado um sistema de cromatografia de íons Metrohm modelo 850 Professional IC com detecção amperométrica, equipado com sistema de bombeamento modelo 818 IC, amostrador automático modelo 863 Compact e coluna Dionex Carbo Pac 10 (250 x 4,6 mm; 7,0 μ m). As análises foram realizadas utilizando 20 μ L de amostra a 32 °C empregando eluição gradiente baseada em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mmol L⁻¹. Inicialmente, a fase móvel foi constituída de uma diluição 1:100 da solução de NaOH e, após 8 min de eluição, a concentração de NaOH foi aumentada em gradiente linear até 0,1 mmol L⁻¹, finalizando em 33 min de análise após 5 min em eluição isocrática. Em seguida, a coluna foi recondicionada à concentração inicial em 7 min de gradiente linear e o sistema estabilizou por 5 min até que uma nova análise tivesse início. A quantificação foi feita via calibração externa na faixa de 0,015 a 1,300 mg mL⁻¹, envolvendo os seguintes componentes: glucose, xilose, arabinose, galactose, celobiose, furfural e hidroximetilfurfural. Em cada caso, foi considerado um fator de correção (F_c) conforme a Equação 6, devido à inserção de uma molécula de água durante o processo de hidrólise ácida, sendo estes fatores de 0,95 para a celobiose, de 0,90 para a glucose e galactose, de 0,88 para xilose e arabinose, de 1,28 para hidroximetilfurfural e de 1,37 para furfural, que serviram para converter cada componente em seus respectivos derivados anidros. A quantificação dos produtos de desidratação de hexoses e pentoses considerou que estes foram oriundos da degradação de anidrogucose e anidroxilose.

$$\text{Teor de Anidro componente (\%)} = \frac{Mn_{CLAE} \times V \times F_c}{m_{am}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

em que Mn_{CLAE} é a concentração de monossacarídeo encontrado na análise via CLAE do hidrolisado obtido na hidrólise ácida, V é o volume do balão em que o hidrolisado foi avolumado, F_c é o fator de correção do fator anidro e m_{am} é a massa seca da amostra.

4.5. Análises cristalográficas via difratometria de Raios X

4.5.1. Determinação do índice de cristalinidade por espalhamento de Raio X com ângulo elevado

Para as determinações de índice de cristalinidade (CrI_{WAXS}) por espalhamento de

Raios X com ângulo elevado (WAXS, do inglês *wide-angle X-ray scattering*), as amostras foram empacotadas em anel de metal (largura 1,5 mm) e envoltas em papel alumínio. A radiação foi produzida por um gerador de Raios X (UltraX 18S Rigaku) com ânodo de cobre rotacional, cuja faixa $K\alpha$ ($\lambda = 1,541$ nm) foi monocromatizada. Após passar pela amostra, o espalhamento da radiação foi detectado em detector MAR345 Marresearch em modo de transmissão e geometria perpendicular. Cada amostra foi medida por 30 min na temperatura ambiente. O alargamento instrumental do dispositivo de medição, que foi determinado como sendo de aproximadamente $0,3^\circ$ com o ângulo de espalhamento $2\theta = 28^\circ$, também foi considerado durante a análise através da medição de uma amostra de silício.

Na determinação das larguras dos cristais de celulose, uma amostra sintética de sulfato de lignina foi utilizada como referência para a região amorfa (não cristalina) de celulose micro-cristalina (ANDERSSON *et al.*, 2003).

A determinação da largura do cristal (L_{200}) foi calculada com base na reflexão 200 da celulose I_β usando a equação de Scherrer (Equação 7),

$$L_{hkl} = \frac{K\lambda}{\sqrt{(\Delta 2\theta)^2 - (\Delta 2\theta_{inst})^2} \cos\theta} \quad \text{Equação 7}$$

em que λ é o comprimento de onda da radiação, $\Delta 2\theta$ é a largura a meia altura (LMA) da reflexão hkl , $\Delta 2\theta_{inst}$ é a ampliação instrumental e θ é metade do ângulo de espalhamento. A reflexão é considerada simétrica e, portanto, as reflexões produzidas por superfícies opostas como de um espelho têm intensidades iguais. O fator K depende da forma do cristal e foi configurado em 0,9. A LMA para a reflexão 200 foi obtida ajustando o perfil de intensidade radial $I(2\theta)$ de 11° a 26° com quatro funções Gaussianas correspondentes às reflexões $\bar{1}10$, 110 , 102 e 200 da celulose I_β (NISHIYAMA *et al.*, 2002). Neste caso, os valores de $\bar{1}10$ e 110 são correspondentes ao sinal referência para a região amorfa, obtido com sulfato de lignina.

Para obter a cristalinidade das amostras, a soma de 28 funções Gaussianas e a referência para a região amorfa (sulfato de lignina) foram ajustadas. Este ajuste foi realizado com Matlab (R2012a, Mathworks, Inc[®]) aplicando o método de mínimos quadrados. Desta forma, o índice de cristalinidade (CrI_{WAXS}) foi calculada pela Equação 8,

$$CrI_{WAXS} = 1 - \frac{\sum I_{am}}{\sum I_{tot}} \quad \text{Equação 8}$$

em que $\sum I_{am}$ representa a área abaixo da região amorfa e $\sum I_{tot}$ representa a área abaixo da intensidade total medida em 2θ no intervalo de 11° a 49° .

4.5.2. Análise cristalográfica via espalhamento de Raios X com ângulo baixo

As medidas de espalhamento de Raios X com ângulo baixo (SAXS, do inglês *small angle X-ray scattering*) foram realizadas nas mesmas amostras empregadas para as medições de WAXS. Além disso, as medições foram repetidas com amostras reumedecidas. Estas foram preparadas por imersão das amostras liofilizadas em água em uma suspensão de 3 % (m/m), que foram condicionadas durante uma semana. O excesso de água foi removido pouco antes das medições e as amostras inchadas foram colocadas em anéis metálicos, os quais foram selados com papel laminado.

O sistema de medição SAXS consistiu de um gerador de Raios X (Siemens) com um tubo de Raios X com ânodo de cobre (Panalytical) e um detector de fio bidimensional (HI-STAR, Bruker AXS). A tensão de funcionamento e a corrente do gerador foram 36 kV e 25 mA, respectivamente. Um pedaço de polietileno de baixa densidade foi utilizado como padrão para escalonar as intensidades. Os valores do vetor espalhamento (q) foram medidos na faixa de $0,019 \text{ \AA}^{-1}$ a $0,37 \text{ \AA}^{-1}$ de acordo com a Equação 9 para o comprimento do vector de espalhamento. Neste caso, q é definido como a diferença nos valores do ângulo do vetor incidente (k_0) e vetor de espalhamento (k).

$$q = k - k_0 \quad \text{Equação 9}$$

No entanto, para espalhamento elástico, q é definida pela Equação 10.

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad \text{Equação 10}$$

Portanto, considerando a lei de Porod (POROD, 1982), em que a intensidade do sinal da reflexão é inversamente proporcional ao vetor espalhamento (q) (Equação 11),

$$I_{(q)} \propto q^{-\alpha} \quad \text{Equação 11}$$

é possível inferir que quando maior o valor do vetor espalhamento, maior a distância interfibrilar em relação às reflexões radiais (FIGURA 16), Assim, a determinação da distancia interfibrilar foi realizada conforme a Equação 12.

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{Equação 12}$$

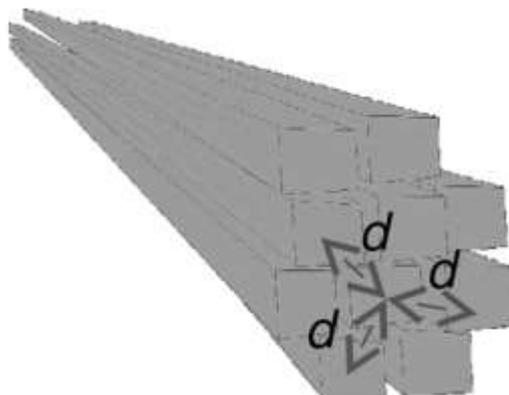


FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DA DISTÂNCIA INTERFIBRILAR DA CELULOSE.

4.6. Hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados

O pré-tratamento tem por objetivo aumentar a acessibilidade dos carboidratos da lignocelulose à bioconversão. Portanto, além da análise da composição química, a acessibilidade dos substratos também foi determinada. Neste caso, a acessibilidade foi definida como o potencial de sacarificação do substrato após 12 h de hidrólise enzimática, a 50 °C em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,8, usando 5 % (m/m, base seca de substrato) na presença de Cellic CTec2[®] na concentração de 0,01g de enzima líquida por g de substrato seco (m/m). O teor dos monossacarídeos obtidos ao final do experimento determinado por CLAE (item 4.3.3), convertido no componente anidro e expresso em porcentagem em relação à massa seca de material empregada no ensaio.

4.7. Quantificação de açúcares redutores

As determinações de ARs foram realizadas empregando uma solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitro-benzóico) conforme sugerido por MILLER (1959). O reagente ADNS foi preparado pela dissolução de 7,49 g de ácido-3,5-dinitrosalicílico e 14 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1000 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 216,10 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) (Sal de Rochelle), 5,86 g de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅) e 5,37 mL de fenol (C₆H₆O) fundido a 50 °C. A solução resultante foi avolumada para 2,0 L com água destilada e deixada em repouso por 24 h. Antes de estocar em frasco âmbar, a solução foi filtrada.

A reação de ADNS com açúcares redutores leva à redução do grupamento nitro na posição 3, formando o ácido 3-amino-2-hidróxi-5-nitro-benzóico, o qual apresenta comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) em 540 nm quando em solução aquosa. Todos os ensaios de hidrólise para estudos de sinergia foram determinados a 50°C na presença de 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5,0 e 1,0 mL de solução enzimática (também tamponada). A reação foi interrompida pela adição de uma quantidade do reagente ADNS no meio (na razão 2:3, de alíquota:ADNS) seguida de fervura por 5 min e a fração de interesse foi levada para leitura de absorbância em 540 nm. Diluições das amostras foram realizadas quando necessárias. Para a quantificação dos ARs, uma curva analítica foi realizada utilizando glucose (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g L⁻¹) como padrão de AR, portanto as concentrações foram expressas em equivalentes de glucose (EqGlc). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

4.8. Desenvolvimento de metodologia analítica para investigação de sinergia entre as enzimas do complexo celulásico

Os ensaios foram realizados a fim de estudar o desempenho de diferentes preparados enzimáticos na degradação da celulose, seja esta presente em substratos celulósico ou lignocelulósico. As determinações de ARs foram realizadas não apenas para açúcares redutores totais (AR_{Tot}), mas também para açúcares redutores solúveis na ausência (AR_{Sol}) e na presença de δ -gluconolactona (GLT) como inibidor específico de β G (ARI_{Sol}), conforme ilustrado na FIGURA 17. Sendo assim, foi possível determinar as atividades enzimáticas capazes de liberar açúcares redutores (ARS do inglês *Activity able to release Reducing Sugar*). Para a determinação de AR_{Tot}, a reação com o ADNS foi realizada no próprio tubo de ensaio pela adição de 3,0 mL deste reagente, neste caso, os ARs produzidos são oriundos da ação de todo o complexo enzimático, portanto, a atividade enzimática baseada em AR_{Tot} foi denominada de ARS_{Tot}. Por outro lado, para a determinação dos AR_{Sol} e ARI_{Sol}, a reação com o ADNS (1,25 mL) foi realizada em um tubo de ensaio separado, empregando uma alíquota da fração solúvel da reação (0,75 mL). Neste caso, a atividade enzimática determinada utilizando os valores de ARI_{Sol}, foi nomeada de ARS_{ExG}, uma vez que na presença de GLT as β G estão inibidas. A quantidade de açúcares redutores insolúveis (AR_{Insol}) foi determinada pela diferença entre AR_{Tot} e AR_{Sol}, e a atividade enzimática determinada com base nos valores de AR_{Insol}, foi chamada de ARS_{EnG}. De maneira similar, considerando que a atividade β G esteve inibida na presença de GLT, o ARI_{Sol} é resultado da atividade das exoglucanases, portanto, os açúcares redutores gerados pela ação da atividade β G (AR β _{Sol}) foram determinados pela

diferença entre AR_{Sol} e ARI_{Sol} . Logo, a atividade enzimática determinada com base nos $AR_{\beta Sol}$, foi denominada de $ARS_{\beta G}$.

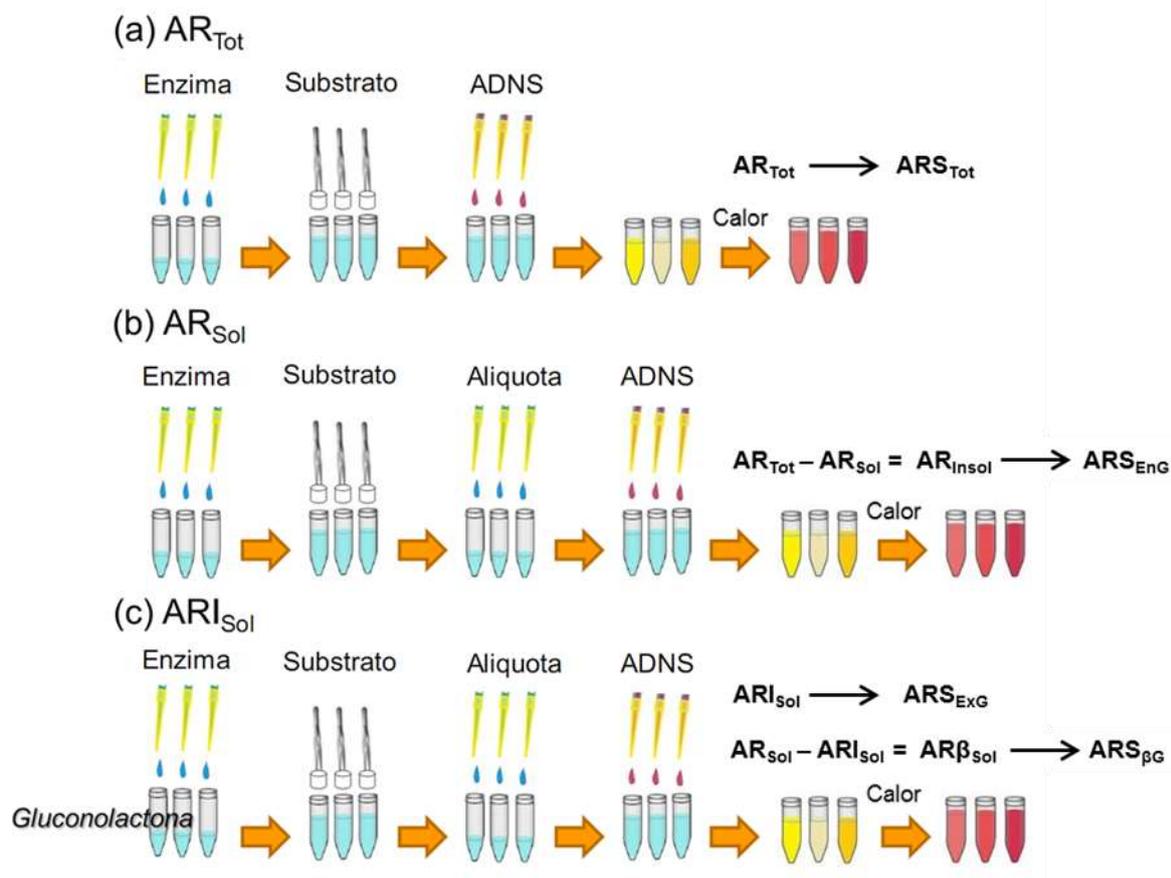


FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA ANALÍTICA DESENVOLVIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS.

A determinação destas atividades enzimáticas contra papel filtro foi feita utilizando 1,0 mL de solução enzimática em 1,0 mL de tampão. A mistura foi incubada por 10 min para atingir a temperatura de 50°C e a reação foi então iniciada com a adição de uma tira de papel filtro (1,0 cm x 7,0 cm) de aproximadamente $70 \pm 0,5$ mg. Ao cabo do tempo de incubação determinado pelo acompanhamento cinético, os ARs foram determinados como descritos anteriormente.

Para o desenvolvimento da metodologia, misturas enzimáticas comerciais e não comerciais foram empregadas. A preparação enzimática foi empregado em uma mistura contendo 1:0,3 (v/v) de Celluclast 1.5 L FG® e Novozym 188, respectivamente (BREUIL *et al.*, 1992), em diferentes concentrações de proteína total de 0,60, 1,20, 2,41, 4,82 e

9,64 mg L⁻¹, as quais foram identificadas como [E1], [E2], [E3], [E4] e [E5], respectivamente.

A atividade do preparado enzimático composto por Celluclast 1.5 L FG[®] e Novozym 188[®] também foi caracterizada segundo o método da I.U.P.A.C., conforme descrito por GHOSE (1987). Para a determinação de atividade celulásica total, uma tira de W1FP de 70 ± 0,5 mg foi utilizada como substrato e para a determinação das demais atividades, diferentes suspensões ou soluções contendo os respectivos substratos foram empregadas. Uma solução contendo 2% (m/v) de CMC e uma suspensão contendo 1% (m/v) de Avicel foram respectivamente utilizadas como substratos para a determinação das atividades endoglucanásica e exoglucanásica. Além disso, uma solução de celobiose (15 mmol.L⁻¹) foi utilizada como substrato para a determinação de atividade celobiásica.

4.9. Estudo da hidrólise enzimática da celulose: sinergia e modo de ação

As enzimas empregadas nos estudos de sinergia foram as CBH-I, CBH-II, EG-I e EG-II como celulasas de *T. reesei*, além da Novozym 188[®] e de uma β-glucosidase purificada de *A. niger*.

Cada preparação enzimática foi submetida à análise por eletroforese (SDS-PAGE) para confirmar a existência de apenas uma banda proteica em cada amostra. Para a realização do procedimento foram utilizadas uma solução indicadora, uma solução de tingimento e duas soluções descolorantes. A solução indicadora foi constituída de 5 mL de tampão Tris-HCl 1 mol L⁻¹ em pH 6,8, 11,6 mL de glicerol (87 %), 2 g de dodecil-sulfato de sódio (*SDS - Sodium Dodecyl Sulfate*) de poliacrilamida, 24 mL de água destilada, 5 mL de β-mercapto-etanol e 10 mg de azul de bromo-fenol. Na solução de tingimento foram empregadas 500 mg do corante *Coomassie-Blue*, (CBB R-250) em 300 mL de água na presença de 200 mL de uma mistura etanol:ácido acético 3:1.

Inicialmente, amostras contendo 10 µg de proteína total foram misturadas com o indicador de proteína na razão 3:1. Depois de misturadas, estas soluções foram condicionadas por 5 min a 95°C e antes de correr a amostra no gel, foram novamente misturadas e centrifugadas. A análise no gel foi realizada sob tensão de 200 V e 100 mA de corrente por aproximadamente 60 min. Após a eluição das amostras, foi realizada a coloração do gel por 60 min sob agitação na solução de *Coomassie-Blue*. Depois de tingido, a descoloração foi realizada em duas etapas, sendo a primeira com a solução descolorante A (40 % de etanol e 10 % de ácido acético (v/v)) em uma série de três repetições de 15 min, e a segunda por 16 h com a solução descolorante B (5 % de etanol e 7,5 % de ácido acético (v/v)).

Com os dados obtidos de AR foram realizados os cálculos de Grau de Efeito de Sinergia (DSE – *Degree of Synergistic Effect*), utilizando a Equação 13 (VALJAMÄE *et al.*, 1999).

$$DSE = \frac{AR_{Mistura}}{AR_A + AR_B}$$

Equação 13

em que $AR_{Mistura}$ é a quantidade de açúcares redutores produzidos pela mistura enzimática, ao passo que AR_A e AR_B representam os açúcares redutores produzidos pelas amostras individualmente. As determinações de ARs foram realizadas conforme descrito no item 4.7.

Os estudos de DSE, bem como do modo de ação das enzimas foram realizados empregando amostras enzimáticas purificadas, as quais foram estocadas em temperatura de 4 °C. Estas, por sua vez, foram combinadas e novas misturas enzimáticas foram geradas. Com isso, foi possível determinar se o efeito era realmente causado pela presença de determinada enzima, observação esta dificultada quando os ensaios estão baseados no uso de preparados comerciais multi-enzimáticos.

4.9.1. Hidrólise de papel de filtro Whatman N°1

Para os estudos de hidrólise enzimática em papel de filtro Whatman N° 1 (W1FP), bem como para a determinação dos valores de DSE, uma tira de $70 \pm 0,5$ mg de substrato foi utilizada e dois preparados enzimáticos purificados, oriundos do fungo *T. reesei*, foram empregados. Neste caso, foram utilizadas misturas entre CBH-I e EG-II nas seguintes proporções: 90:10, 75:25 e 50:50. Além disso, estas proporções foram mantidas na presença de 5% (m/m em relação à proteína total) de Novozym 188® (não purificada), conforme apresentado na TABELA 2.

Adicionalmente, para a análise do efeito da δ -gluconolactona como inibidor de β -glucosidase, os preparados enzimáticos apresentados na TABELA 2, foram investigados quanto ao seu desempenho na produção de AR_{Sol} .

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos e quando não estiveram em uso foram armazenadas em sala de baixa temperatura (4°C), em repouso e sem luz solar para evitar a degradação das enzimas.

Além da análise de DSE, os efeitos estatísticos devidos à proporção entre CBH-I, EG-II e Novozym 188 foram estudados por meio da análise de variância (ANOVA) usando desenho experimental misto de 2 e 3 níveis com 2 variáveis, conforme exposto

na TABELA 3. Neste caso, a análise dos efeitos foi realizada por regressão linear múltipla, através do modelo quadrático apresentada na Equação 14,

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1^2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_1^2 \cdot X_2 \quad \text{Equação 14}$$

em que Y é a produção de açúcares redutores; β_x é o coeficiente matemático relacionado ao efeito de cada variável; X_1 é a razão CBH-I/EG-II ratio; X_2 é a quantidade de Novozym 188 utilizada no ensaio.

TABELA 2. CARGAS DE PROTEÍNA UTILIZADAS NOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS.

Preparação enzimática	Proteína (mg mL ⁻¹)					Proteína total ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
	CBH-I	CBH-II	EG-I	EG-II	Novozym 188	
CBH-I	0,2300	-	-	-	-	0,0041
CBH-II	-	0,2330	-	-	-	0,0041
EG-I	-	-	0,2135	-	-	0,0041
EG-II	-	-	-	0,1980	-	0,0041
Mix A	0,1863	-	-	0,0207	-	0,0041
Mix B	0,1553	-	-	0,0518	-	0,0041
Mix C	0,1035	-	-	0,1035	-	0,0041
Mix D	0,1770	-	-	0,0197	0,0104	0,0041
Mix E	0,1475	-	-	0,0492	0,0104	0,0041
Mix F	0,0983	-	-	0,0983	0,0104	0,0041

^a Proteína total expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$ considerando as seguintes massas moleculares: CBH-I=56 kDa; CBH-II=56,7 kDa; EG-I=51,9 kDa; EG-II=48,2 kDa; βG =114 kDa (VÁRNAI *et al.*, 2013).

TABELA 3. DESENHO EXPERIMENTAL MISTO DE 2 A 3 NÍVEIS UTILIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DE EFEITOS ESTATÍSTICOS POR REGRESSÃO LINEAR MULTIPLA.

Amostra	Razão CBH-I / EG-II	Novozym 188 (β G)
Mix A	9 (+)	0 (-)
Mix B	3 (0)	0 (-)
Mix C	1 (-)	0 (-)
Mix D	9 (+)	1 (+)
Mix E	3 (0)	1 (+)
Mix F	1 (-)	1 (+)

4.9.2. Hidrólise em bagaço de cana pré-tratado por dióxido de carbono supercrítico na presença de etanol e de líquido iônico como co-solvente

Para o estudo de sinergia entre as enzimas do complexo celulolítico na hidrólise dos materiais pré-tratados com o processo $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$, preparados enzimáticos experimentais contendo as enzimas CBH-I, CBH-II e EG-II foram utilizados em reações contendo 1% de substrato (base seca) e as determinações de ARs foram realizadas conforme descrito no item 4.6.

Nestes ensaios, foram utilizadas as exoglucanases CBH-I ou CBH-II na ausência e na presença de endoglucanase EG-II (50/50 mol/mol). Estas misturas entre ExG e EnG foram nomeadas de Mix G e Mix H para CBH-I/EG-II e CBH-II/EG-II, respectivamente. No caso do estudo da hidrólise dos materiais parcialmente lignificados, as misturas de celulases foram testadas na presença e na ausência de β -glucosidase de *Aspergillus niger* (5% mol/mol) (diferentemente do estudo feito para W1FP, que fez o uso de um preparado comercial de β G, a Novozym 188), as quais foram nomeadas de Mix I e Mix J para CBH-I/EG-II+ β G e CBH-II/EG-II+ β G, respectivamente. Todas as preparações enzimáticas apresentaram uma concentração total de proteína de $0,125 \mu\text{mol g}^{-1}$ de celulose e os ensaios foram monitorados nos tempos de 24 e 48 h de reação.

4.9.3. Comparação das suscetibilidades dos materiais lignificados e deslignificados à hidrólise

Para o estudo comparativo entre os substratos pré-tratados (parcialmente lignificados) com o W1FP (substrato deslignificado), foram utilizados os dados de conversão obtidos após 24 h de reação e estes foram expressos em relação à

concentração de proteína empregada no ensaio de hidrólise, conforme descrito na Equação 10. Uma alternativa comumente utilizada para isso é a atividade específica, que demonstra a atividade em unidades internacionais por miligrama de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Considerando que a atividade é o desempenho do catalisador em gerar um micromol de produto por unidade de tempo, o cálculo utilizado para a comparação dos preparados enzimáticos empregados foi chamado de Atividade Específica Aparente (AEA), pois a unidade de proteína total está em $\mu\text{mol mL}^{-1}$ e os dados foram linearizados para a mesma concentração proteica e expressos em percentual (Equação 15).

$$AEA (\text{g} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\text{Conversão } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1})}{\text{Carga de proteína } (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})} \quad \text{Equação 15}$$

Esta medida foi adotada porque a comparação foi realizada entre enzimas diferentes que, por apresentarem massas moleculares diferentes, poderiam levar a uma comparação não estequiométrica se a carga de proteína fosse expressa em unidade mássica (e.g. g e mg). Além disto, uma vez que os estudos de hidrólise de W1FP e dos substratos pré-tratados foram baseados em misturas enzimáticas com teores proteicos distintos, os valores obtidos para o desempenho das enzimas foram normalizados para uma concentração molar de proteína de $0,125 \mu\text{mol g}^{-1}$ de celulose.

Além dos ensaios com os preparados enzimáticos baseados no emprego de enzimas purificadas, a suscetibilidade dos substratos à hidrólise foi também avaliada utilizando um preparado comercial, neste caso, Cellic CTec2[®]. Este ensaio foi realizado por 2,5 h a 50 °C em tampão acetato de sódio (pH 5,0, 0,1 mol.L⁻¹). Para esta avaliação, as reações foram realizadas de acordo com a proposta de determinação de modo de ação de complexo celulásico descrita no item 4.8.2, porém, utilizando $70 \pm 0,5$ mg dos substratos lignocelulósicos BC_{LEE} e pré-tratados com a tecnologia scCO₂/EtOH-LI utilizando diferentes LIs.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da composição química dos materiais *in natura* e livre de extraíveis

O material *in natura* foi submetido à extração hidro-alcoólica dando origem ao material livre de extrato alcoólico conforme descrito em 4.3.2. Para avaliar o efeito do pré-tratamento em sistemas de alta pressão na presença de líquido iônico sobre a estrutura química do material de trabalho, a composição química deste material foi determinada e os valores encontrados estão apresentados na TABELA 4. Desta forma, foi possível realizar uma comparação direta sobre a composição química dos substratos pré-tratados com a composição química do material não tratado.

TABELA 4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Componente	Percentual (%)	
	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço livre de extraíveis
Anidroglucose ¹	42,19±0,7	44,80±0,8
Anidroxilose ²	14,43±0,2	15,32±0,2
Anidroarabinose ²	1,53±0,2	1,62±0,2
Anidrogactose ²	0,33±0,2	0,35±0,2
Grupo acetil ²	2,72±0,3	2,89±0,3
Lignina total ³	27,65±1,0	29,36±1,1
<i>Lignina solúvel</i>	27,62±1,0	29,33±1,1
<i>Lignina insolúvel</i>	0,03±0,1	0,03±0,1
Cinzas	6,08±0,3	6,46±0,4
Extraíveis ⁴	2,36±0,1	-
Total	97,3	100,8

¹ Presente como componente das β -(1-4)-D-glucanas (celulose); ² Presente como componentes das (hemiceluloses); ³ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído; ⁴ Extração realizada com etanol 95%.

A determinação de lignina total e a quantificação dos principais monômeros constituintes dos polissacarídeos foi realizada utilizando o método proposto por SLUITER *et al.* (2011). O processo de extração do material *in natura* removeu 2,36 % de extrato alcoólico, resultando em um substrato com 44,80 % de celulose, 16,94 % de pentoses e

29,36 % de lignina total. A TABELA 5 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho com outros apresentados na literatura em referência aos principais componentes da parede celular do bagaço de cana, celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com o teor de cinzas.

TABELA 5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO BAGAÇO DE CANA.

Componente (%) ¹	Este trabalho	CAO e AITA (2013)	QUI <i>et al.</i> (2012)	TRAVAINI <i>et al.</i> (2013)
Anidroglicose	42,19	40,71	40,87	46,21
Hemiceluloses ²	19,01	27,78	22,55	20,86
Lignina total ³	27,65	22,69	24,81	22,67
Cinzas	6,08	6,39	1,44	1,19
Total	94,93	97,57	89,67	90,93

¹ Expresso em relação à massa seca do bagaço livre de extrato alcóolico. ² Expressa em termos da somatória dos teores de anidroxilose, anidroarabinose, anidroglicose e grupo acetil. ³ Expressa em termos da somatória dos teores de lignina solúvel e insolúvel.

Com base nos dados da TABELA 5, foi possível verificar que os valores obtidos estão coerentes com aqueles apresentados na literatura. Apesar disso, o teor de cinzas encontrado no presente trabalho foi superior aos relatados em outras publicações. Este alto teor de cinzas pode ser resultado da presença de impurezas oriundas do processo de colheita (terra e fuligem), uma vez que o bagaço de cana foi coletado imediatamente após o processo de moagem para extração do caldo. Por outro lado, o baixo valor de cinzas obtido por TRAVAINI *et al.* (2013), realizou etapas de lavagem do material em laboratório, diferentemente de CAO e AITA (2013) que também utilizaram materiais de origem industrial. No entanto, variações no teor de cinzas também podem ser devidas a fatores agrônômicos como a qualidade do solo, a tecnologia de colheita e o regime pluviométrico durante o desenvolvimento da planta.

O teor de hemiceluloses obtido no presente trabalho é próximo ao obtido por QUI *et al.* (2012), assim como o teor de glucanas, que também está próximo dos valores obtidos por CAO e AITA (2013) e QUI *et al.* (2010). Já o teor de lignina revelou-se maior que os valores apresentados nas referências citadas na TABELA 5, possivelmente por que não foi determinado e posteriormente descontado o teor de cinzas presente na lignina insolúvel em ácido. Por outro lado fatores agrônômicos podem estar associados à esta diferença no teor de lignina. Finalmente, baseado nos valores de desvio padrão,

conclui-se que os dados apresentados na TABELA 4 apresentam a confiabilidade necessária para realizar a comparação com os valores de composição química dos substratos pré-tratados.

5.2. Pré-tratamento de bagaço de cana com dióxido de carbono supercrítico e etanol na presença de líquido iônico como co-solvente

Conforme apresentado na TABELA 6, o pré-tratamento por $scCO_2/EtOH-LI$ apresentou valores de rendimento mássico de material (R_M) que foram fortemente influenciados pela temperatura. Para os ensaios de pré-tratamento realizados a 110 °C, os valores de R_M foram de 93 % a 101 % (m/m), ao passo que para a temperatura de 180 °C, estes valores foram de 81 % a 87 % (m/m). Possivelmente, a maior severidade nos processos realizados a 180 °C, em relação aos realizados a 110 °C, levou a uma maior degradação dos componentes mais acessíveis do substrato.

Os efeitos estatísticos causados pelas variáveis independentes do processo foram analisados em relação às mudanças na composição química dos substratos gerados. Como variáveis respostas foram adotadas a extensão da deslignificação e os teores de anidroglicose e de anidroxilose encontrados nos substratos pré-tratados. Neste caso, os dados relacionados à composição química dos substratos foram submetidos regressão linear múltipla, visando estudar os efeitos de cada variável independente no processo. Para cada resposta estudada foi obtido um modelo matemático via regressão linear, os quais estão apresentados na TABELA 7. A eficiência do processo de conversão enzimática de materiais lignocelulósicos depende de uma série de fatores, entre eles a relação enzima/substrato, a presença de lignina, o grau de polimerização, a volumetria de poros, a área superficial disponível e a cristalinidade, entre outros. Sendo assim, é necessário maior grau de liberdade para encontrar um modelo com mais coeficientes, que seja capaz de descrever a relação entre os valores de potencial de sacarificação obtidos e as variáveis independentes.

Apesar da possibilidade de interpretar os efeitos das variáveis independentes através da análise dos coeficientes dos modelos matemáticos, é importante gerar os elementos gráficos que resultam destas equações, para melhor visualizar as tendências encontradas no processo. Neste caso, o significado estatístico dos respectivos modelos matemáticos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), cujos resultados estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS LIVRE DE EXTRAÍVEIS E PRÉ-TRATADOS (DADOS EXPRESSOS EM PERCENTAGEM DE BASE SECA DE CADA MATERIAL).

T	[LI]	P	R _M	AnGlc	AnXyl	AnAra	AnGal	LIA	LSA	TOTAL	Conversão enzimática	
											AnGlc	AnXyl
110	0,0	195,0	93	41,22±5,73	15,77±1,97	1,64±0,21	0,29±0,37	32,63±0,43	0,02±0,01	91,56	30,00±0,50	0,04±0,01
110	0,0	250,0	95	50,71±3,21	12,66±0,57	1,50±0,02	0,29±0,05	26,59±0,41	0,03±0,01	91,78	30,46±4,62	21,73±0,84
110	1,0	195,0	96	48,33±1,43	15,35±1,26	1,47±0,14	0,27±0,04	27,62±0,36	0,03±0,01	93,06	38,85±6,56	29,14±4,30
110	1,0	250,0	95	58,32±3,07	15,02±3,70	1,31±0,81	0,27±0,32	27,92±0,60	0,02±0,01	92,83	29,58±4,30	47,06±1,17
180	0,0	195,0	87	48,83±5,55	16,53±3,96	1,64±0,28	0,32±0,05	22,79±3,75	0,03±0,01	90,14	40,55±3,45	32,74±2,47
180	0,0	250,0	86	50,09±0,43	14,45±0,02	1,60±0,32	0,37±0,47	25,44±1,03	0,02±0,01	91,97	32,31±8,03	50,31±6,56
180	1,0	195,0	81	59,55±0,60	11,43±1,28	2,02±0,03	0,32±0,23	24,27±0,37	0,03±0,01	97,62	56,54±2,48	101,93±1,01
180	1,0	250,0	87	52,17±0,95	17,17±0,60	1,86±0,17	0,36±0,04	17,04±2,18	0,03±0,02	88,63	71,14±6,22	92,23±1,90
145	0,5	222,5	91	51,48±0,16	16,02±0,16	1,41±0,36	0,31±0,33	24,00±0,58	0,03±0,01	93,25	65,96±4,75	56,33±4,78
145	0,5	222,5	91	47,74±1,37	17,25±0,65	1,32±0,07	0,32±0,09	24,10±0,48	0,03±0,01	90,76	78,45±4,51	63,82±2,54
145	0,5	222,5	94	48,87±0,03	16,08±0,49	1,45±0,02	0,30±0,07	23,67±0,34	0,03±0,01	90,39	58,74±3,22	48,46±0,89
<i>BC_{LEE}</i>			-	44,80±0,77	15,32±0,18	1,62±0,18	0,35±0,18	29,33±1,10	2,89±0,32	100,58	31,33 ± 2,73	34,20 ± 2,79

T = Temperatura (°C); [LI] = Líquido iônico (m/m); P = Pressão (Bar); R_M = Rendimento Mássico (% base seca); BC_{LEE} = Bagaço Livre de Extraíveis; AnGlc = Anidroglicose; AnXyl = Anidroxilose; AnAra = Anidroarabinose; AnGal = Anidrogactose; LIA = Lignina Insolúvel em Ácido; LSA = Lignina Solúvel em Ácido.

TABELA 7. PARÂMETROS DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS MATEMÁTICOS.

Parâmetros	Deslignificação	Anidroxilose	Anidroglucose
Intercepção	18,51	18,35	50,12
T	-1,26	1,92	2,25
[LI]	5,89	0,25	2,19
P	5,06	-2,77	0,92
T.[LI]	0,12	2,14	1,01
T.P	5,15	8,19	-2,45
P.[LI]	-0,02	6,83	-2,26
T.P.[LI]	8,28	6,18	p.n.m.

^a p.n.m. = parâmetro não modelado.

TABELA 8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS RESPECTIVAS RESPOSTAS.

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F _{tab}
<i>Deslignificação – R² = 0,9980; %Var = 99,91</i>					
Regressão	1255,40	7	179,34	470,51	8,88
Resíduo	1,14	3	0,38		
Falta de Ajuste	0,07	1	0,07	0,13	18,51
Erro Puro	1,08	2	0,54		
Total	1256,54	10			
<i>Teor de anidroxilose – R² = 0,9659; %Var = 97,44</i>					
Regressão	146,20	7	20,89	12,14	8,88
Resíduo	5,16	3	1,72		
Falta de Ajuste	1,29	1	1,29	0,67	18,51
Erro Puro	3,87	2	1,93		
Total	151,36	10			
<i>Teor de anidroglucose – R² = 0,9677; %Var = 99,66</i>					
Regressão	180,25	6	30,04	19,96	6,16
Resíduo	6,02	4	1,51		
Falta de Ajuste	5,38	2	2,69	8,41	19,00
Erro Puro	6,40	2	0,32		
Total	186,27	10			

%Var = Máxima variância explicável; SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = distribuição de Fischer encontrada; F_{tab} = distribuição de Fischer tabelada.

De maneira geral, para todas as respostas estudadas, é possível constatar que os altos valores de F , encontrados para as regressões e resíduos em relação aos respectivos F_{tab} , demonstram que o grupo de dados não representa um artefato matemático, e que existem tendências quando estes são modelados pelas equações empregadas. Além disso, os baixos valores de F para a falta de ajuste e erro puro, em relação ao respectivo valor de F_{tab} , indicam que os resíduos existentes nos respectivos modelos não são significativos. Estes fatores são também corroborados pelos altos valores de R^2 e das variâncias máximas explicadas. Portanto, já que os modelos apresentaram resultados satisfatórios de ANOVA, seguramente que os elementos gráficos resultantes destas equações são matematicamente corretos.

Com os modelos validados por ANOVA, foram geradas as superfícies de respostas, visando identificar as tendências experimentais que levariam a melhores resultados. Para os dados de desdesignificação, as superfícies de repostas indicam que seria necessário um aumento nas condições empregadas para que fossem alcançados maiores taxas de desdesignificação. Além disso, é possível observar nos gráficos A, B e C da FIGURA 18 que há um comportamento de sinergia entre as variáveis. No entanto, apesar de existir esta tendência, condições mais severas podem levar a maiores perdas de carboidratos no material. Neste caso, podemos ressaltar as superfícies obtidas para o teor de anidroxilose, indicando nos gráficos A, B e C da FIGURA 19, que maior severidade resultaria em menores teores de anidroxilose no material. Portanto, uma vez que de acordo com os gráficos apresentados nas Figuras 18 e 19, indicam que condições experimentais mais severas resultariam em maior desdesignificação e menor teor de anidroxilose no substrato, estas condições resultariam em substratos de maior teor de anidroglicose. Esta tendência é confirmada nos gráficos da FIGURA 20.

Apesar de que as tendências são de que devemos aumentar a severidade do processo, esta medida pode levar a um processo muito oneroso devido ao alto custo do LI, além de não ser uma opção coerente no que diz respeito à preservação de carboidratos na fração sólida do substrato. Naturalmente, se bons índices de recuperação de LI forem encontrados, de forma a permitir a reutilização deste co-solvente, o aumento da severidade pode se tornar uma alternativa interessante.

Uma vez que as tendências experimentais que levariam à melhores resultados foram identificadas graficamente, os efeitos estatísticos resultantes desta análise foram mensurados e são apresentados como gráficos de Pareto (FIGURA 21). Portanto, além de corroborar as superfícies de respostas, é possível saber qual efeito é realmente estatisticamente significativo, além de identificar a significância de efeitos de interação (sinergia ou antagonismo).

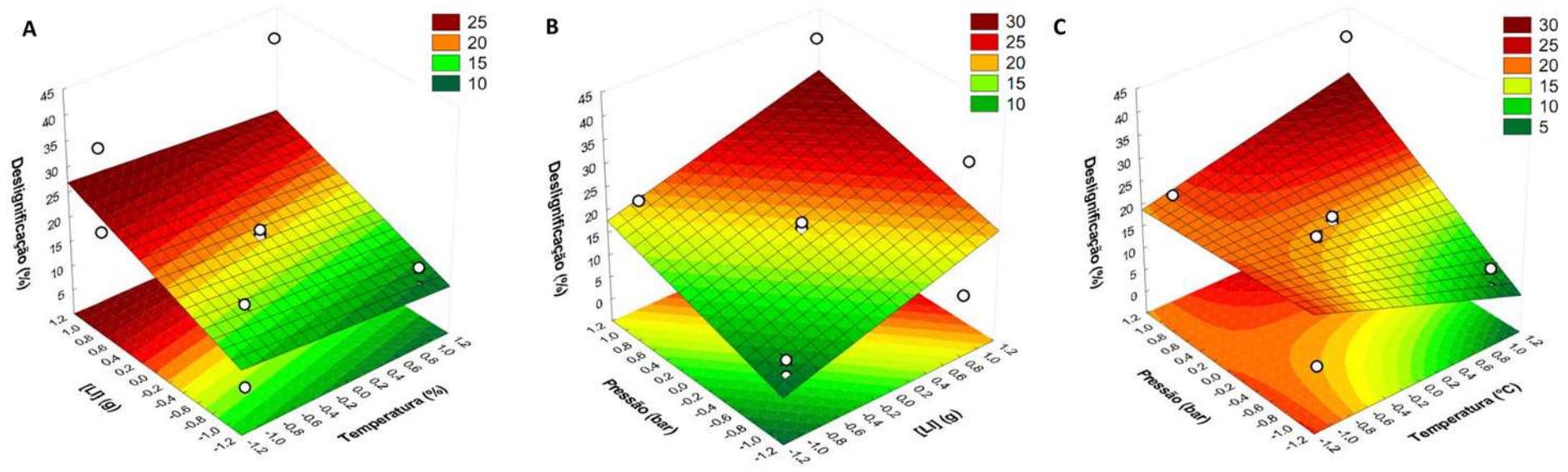


FIGURA 18. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DESLIGNIFICAÇÃO: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.

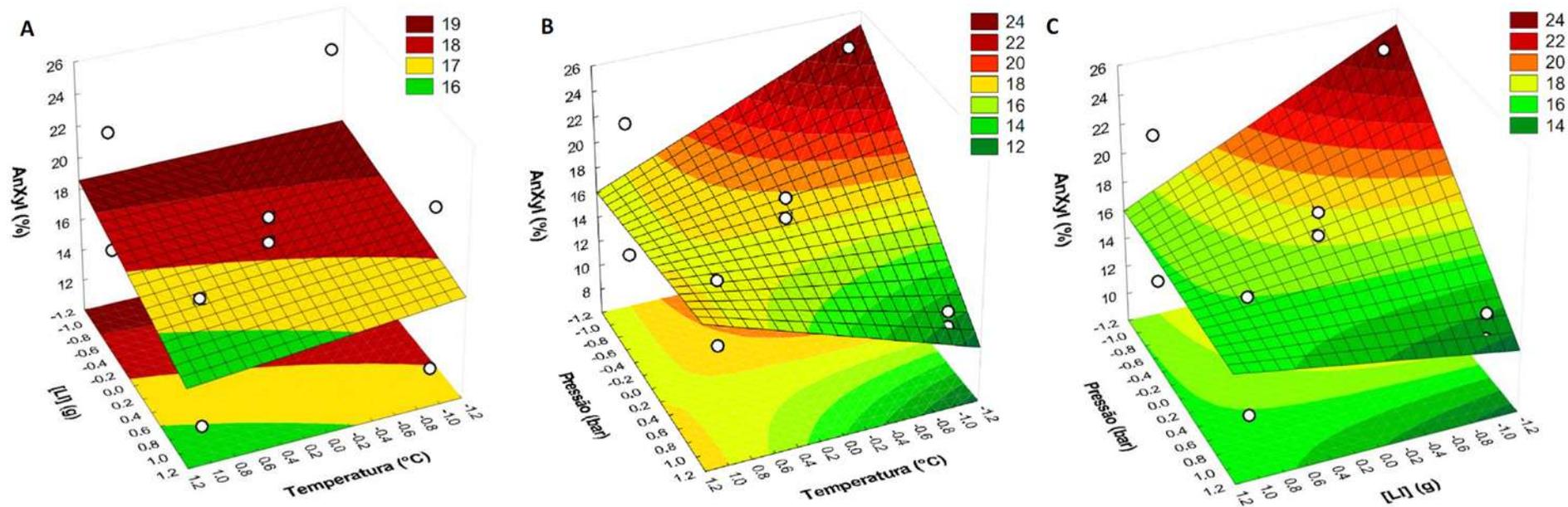


FIGURA 19. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TEOR DE ANIDROXILOSE: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.

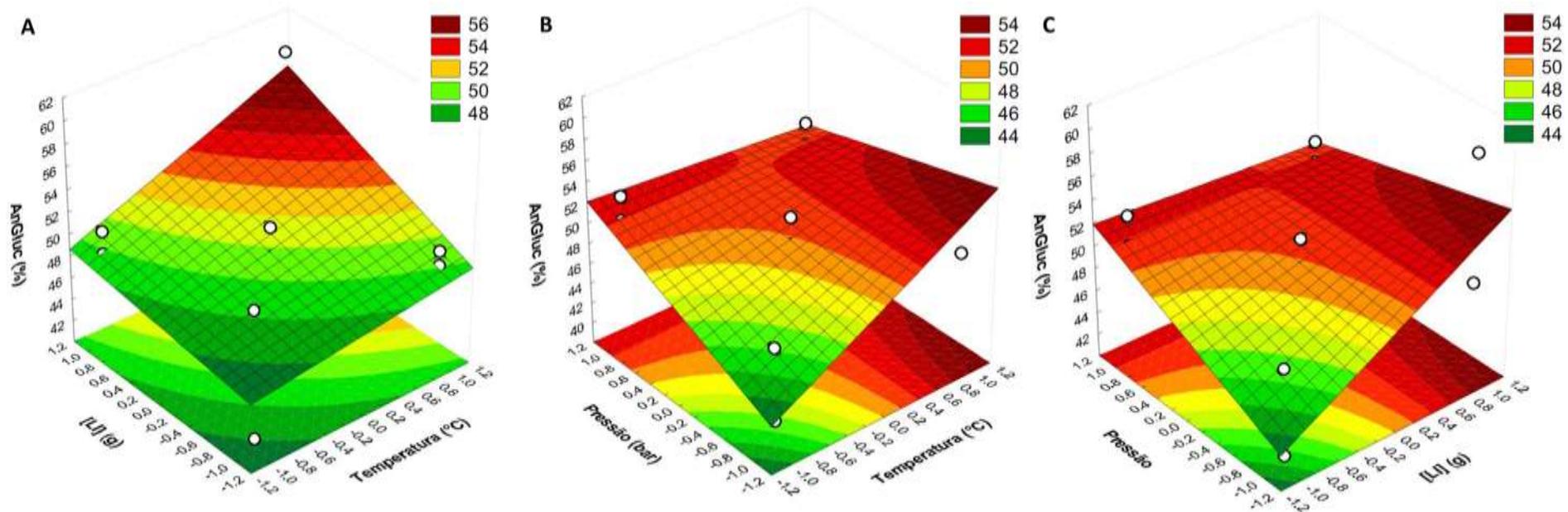


FIGURA 20. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA OBTIDAS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TEOR DE ANIDROGLUCOSE: A, CONCENTRAÇÃO DE LI CONSTANTE; B, PRESSÃO CONSTANTE; C, TEMPERATURA CONSTANTE.

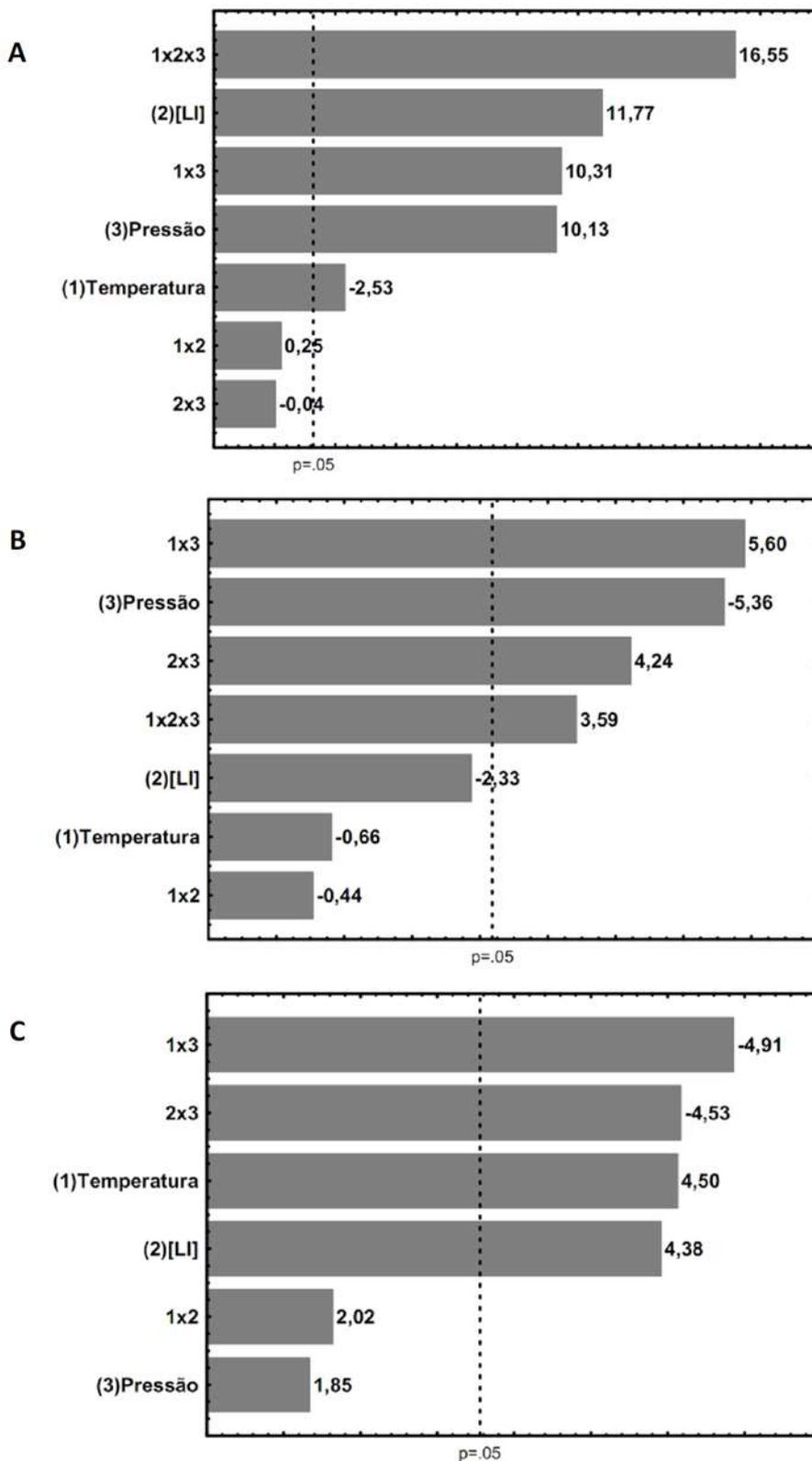


FIGURA 21. GRÁFICOS DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS DEPENDENTES ESTUDADAS. A, DESIGNIFICAÇÃO; B, TEOR DE ANIDROXILOSE; C, TEOR DE ANIDROGLUCOSE.

Para a deslignificação, todas as variáveis independentes apresentaram efeitos independentes estatisticamente significativos, de -2,53, 10,13 e 11,77 p.p. para temperatura, pressão e concentração de LI, respectivamente. No entanto, estes efeitos são resultados não apenas de uma variação individual de cada variável, pois existem efeitos de interação entre duas variáveis e entre as três variáveis, sendo de 10,31 e 16,55 p.p. para os efeitos de sinergia resultante da interação entre temperatura e pressão, interação entre as três variáveis, respectivamente. Estes efeitos indicam que, a pressão e a concentração de LI são as variáveis de maior impacto nos rendimentos de deslignificação encontrados.

Por outro lado, para o teor de anidroxilose, apenas a variável pressão apresentou um efeito independente estatisticamente significativo, de -5,36 p.p.. Além disso, os efeitos de sinergia envolvendo a variável pressão com a temperatura ou com a concentração de LI também foram estatisticamente significativos, de 5,60 e 4,24 p.p., respectivamente. Surpreendentemente, os valores dos efeitos estatísticos para o teor de anidroxilose no material foram em sua grande maioria positivos, indicando que o aumento das condições experimentais levará a maiores valores de teor de anidroxilose no substrato, possivelmente devido à maior remoção de lignina. O aumento da severidade de pré-tratamento pode levar à degradação de polissacarídeos via hidrólise ácida, no entanto, os ensaios foram realizados na presença de quantidades minoritárias de água, o que poderia justificar a pouca perda dos polissacarídeos.

No caso do teor de anidroglicose presente no material, os efeitos independentes das variáveis temperatura e concentração de LI foram estatisticamente significativos, apresentando 4,50 e 4,38 p.p. respectivamente. No entanto, as interações destas variáveis de processo com a pressão resultaram em efeitos antagônicos de -4,91 e -4,53 p.p. para a interação entre temperatura e a concentração de LI com a pressão, respectivamente. Possivelmente devido ao fato de que em maiores valores de pressão possam favorecer a ocorrência de reações de degradação da celulose.

Portanto, o pré-tratamento empregando a razão molar 1:1 (LI:biomassa) (TABELA 6), combinado ao scCO_2 na presença de etanol, promoveu 41% de deslignificação do bagaço de cana, além de gerar um substrato com 75 % (m/m base seca) de carboidratos. Neste caso, é importante ressaltar a seletividade do pré-tratamento nesta condição, pois a remoção de 41% de lignina resulta em aproximadamente 12% de perda de massa total do material de origem e, nesta condição, o R_M foi de 87%. Estes dados indicam que o pré-tratamento foi realmente seletivo na deslignificação e que não gerou perdas expressivas de outros componentes da biomassa. Além disso, para os ensaios de hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados, foi empregado o preparado enzimático Cellic CTec2[®] utilizando 0,01g de enzima líquida por g de substrato seco (m/m), conforme

as recomendações do fabricante. O emprego desta preparação enzimática na determinação do potencial de sacarificação do substrato oriundo das condições mais severas de pré-tratamento resultou na conversão de 70 % da celulose em glucose em apenas 12 h de reação, além da conversão de 92 % das xilanas presentes no substrato em xilose. Além disso, o pré-tratamento nesta condição resultou em maior recuperação de anidrogucose, portanto, esta foi identificada como a mais eficiente dentre as demais condições utilizadas.

No que diz respeito à recuperação mássica de cada componente presente no substrato de origem, a TABELA 9 apresenta os resultados obtidos em percentual mássico recuperado, além de informar a concentração em g L^{-1} de glucose e xilose produzidos na hidrólise enzimática. Em relação à temperatura, as recuperações de anidrogucose e de anidroxilose foram maiores a 110 °C do que as recuperações obtidas a 180 °C. Por outro lado, a recuperação de lignina teve comportamento inverso, apresentando valores maiores de recuperação a 180 °C. A menor recuperação mássica de anidrogucose foi de 85,6 % para o material pré-tratado nas condições menos severas do desenho experimental (sem LI). Por outro lado, menor recuperação de anidroxilose foi de 60,4 %, que foi obtida na presença de Bmim[OAc] a 180 °C e 195 Bar. Porém, ao realizar o mesmo experimento sob pressão de 250 Bar, a recuperação de anidroxilose foi de 97,5 %. Tanto para anidrogucose quanto para anidroxilose, os experimentos nas condições do ponto central resultaram em erros experimentais aceitáveis em relação à recuperação mássica, que foram de 3,9 % e 3,7 %, respectivamente. Como os ensaios de pré-tratamento empregaram apenas 2 g de substrato, o emprego de quantidades pequenas de material torna a minimização do erro experimental uma tarefa de difícil realização. Em relação à recuperação de lignina, os maiores rendimentos foram obtidos a 110 °C, sendo de 103,5 % e 90,4 % para os ensaios na ausência de LI a 195 Bar e na presença de Bmim[OAc] a 250 Bar, respectivamente. Assim como para anidrogucose e anidroxilose, a triplicata no ponto central para a recuperação de lignina apresentou repetibilidade, com erro experimental de apenas 1,0 % para LIA e 1,9 % para LSA.

Sobre a recuperação de Bmim[OAc] na fração solúvel gerada no pré-tratamento (TABELA 9), as maiores recuperações foram obtidas a 250 Bar, sendo de 91,5 % e 94,8 % para os ensaios realizados a 110 °C e 180 °C, respectivamente. Além disso, diferentemente do encontrado para a recuperação de anidrogucose, anidroxilose e lignina no material pré-tratado, a recuperação de Bmim[OAc] apresentou 15,1 % de erro experimental. Neste caso, conforme comprovado que o LI permaneceu parcialmente na fração sólida após o pré-tratamento, parte do erro experimental pode ser atribuído ao fato de que o LI pode ter reagido com a biomassa impossibilitando a quantificação deste co-solvente após a etapa de lavagem.

TABELA 9. RECUPERAÇÃO MÁSSICA OBTIDA PARA A FRAÇÃO INSOLÚVEL DO SUBSTRATO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO NA PRESENÇA DE ETANOL E DE LÍQUIDO IÔNICO COMO CO-SOLVENTE.

Condições			Fração sólida (%)						R _{LI} (%)	Hidrólise enzimática (g L ⁻¹)	
T	[LI]	P	AnGlc	AnXyl	AnAra	AnGal	LIA	LSA	Bmim[OAc]	Glucose	Xilose
110	0,0	195,0	85,6	95,7	94,1	76,5	103,5	46,5	-	6,18	0,00
110	0,0	250,0	107,5	78,5	88,0	78,7	86,1	95,0	-	7,72	0,70
110	1,0	195,0	103,6	96,2	87,0	73,1	63,3	96,0	23,7	9,39	1,08
110	1,0	250,0	102,5	93,0	76,4	72,3	90,4	71,3	91,5	7,15	1,71
180	0,0	195,0	94,8	93,9	88,1	79,5	67,6	87,0	-	9,90	1,32
180	0,0	250,0	96,2	81,1	84,9	90,2	74,6	57,3	-	8,09	1,82
180	1,0	195,0	107,7	60,4	101,0	74,1	67,0	81,0	56,7	16,83	3,47
180	1,0	250,0	101,3	97,5	99,9	89,5	50,5	87,0	94,8	18,45	4,13
145	0,5	222,5	104,6	95,2	79,3	80,5	74,5	91,0	41,9	16,98	2,32
145	0,5	222,5	97,0	102,5	74,4	82,4	74,8	91,0	32,5	18,73	2,63
145	0,5	222,5	102,5	98,7	84,0	79,3	75,9	94,0	43,4	14,35	1,90

T= Temperatura (°C); [LI]= Líquido iônico (m/m); P= Pressão (Bar); R_{LI}=Recuperação mássica de líquido iônico na fração solúvel; AnGlc = Anidroglicose; AnXyl = Anidroxilose; AnAra = Anidroarabinose; AnGal = Anidroglicose; LIA = Lignina Insolúvel em Ácido; LSA = Lignina Solúvel em Ácido.

O emprego de maior temperatura resulta em menor recuperação mássica dos componentes majoritários do substrato. No entanto, para o experimento de maior severidade que promoveu a maior deslignificação, não houve perda de anidroglicose e anidroxilose. Como resultado, a deslignificação aumenta a acessibilidade à sacarificação enzimática dos substratos, gerando aumentos na produção de glicose e xilose após 12 h, de hidrólise que foram de 18,45 % e 4,69 % respectivamente.

Apesar da condição de maior severidade do desenho experimental ter sido a de melhor rendimento mássico, o ponto central gerou maior eficiência se esta for expressa por massa de Bmim[OAc] utilizada. Neste caso, os valores de anidroglicose (g) quando expressos em relação à massa (g) de LI utilizada, foram de 9,5 e 16,7 para os ensaios realizados na condição de maior severidade e no ponto central, respectivamente, ao passo que para anidroxilose estes valores foram de mesma magnitude (sendo $2,3 \text{ L}^{-1}$ e $2,4 \text{ L}^{-1}$, respectivamente). Portanto, o ensaio no ponto central fez uso de metade da carga de LI em comparação com a condição de maior severidade, e o rendimento em produção de glicose na hidrólise enzimática foi apenas 9,57 % menor do que o obtido nas condições de maior severidade do desenho experimental. Por outro lado, a redução de 50% de carga de Bmim[OAc] no ponto central gerou redução de 48,41 % na quantidade de xilose produzida após a hidrólise. Portanto, considerando que a recuperação de anidroxilose foi em torno de 100 % para os ensaios realizados nas condições do ponto central, os substratos oriundos desta condição de pré-tratamento apresentaram menor suscetibilidade à hidrólise enzimática.

No que diz respeito à recuperação de LI na fração solúvel, as menores recuperações foram obtidas nos ensaios realizados a 195 bar e 222,5 bar, ao passo que nos ensaios realizados a 250 bar, tais valores foram de 91,5 % e 94,8 %, quando os ensaios foram conduzidos a 110 °C e 180 °C, respectivamente. Neste caso, a maior pressão favorece os rendimentos obtidos na solubilidade do Bmim[OAc] na fração líquida.

5.3. Análise do efeito do cátion e do ânion do líquido iônico no pré-tratamento

A condição que gerou o substrato mais suscetível à bioconversão, de acordo com o desenho fatorial 2^3 empregando Bmim[OAc], foi aquela realizada nos pontos de máximo das variáveis independentes: 180°C, 250 Bar e 1:1 (m/m) de LI:substrato. Além disso, é importante mencionar que esta condição recupera aproximadamente 2 vezes mais anidroglicose do que os experimentos realizados na condição do ponto central. Com isso, esta condição foi inicialmente escolhida para realizar os ensaios com os diferentes LIs. No entanto, como mencionado no item 4.2.2., ao empregar o Bmim[Cl] no pré-tratamento $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ a 180°C, o material sofreu carbonização e, neste caso, outro

experimento foi realizado a 110°C, sendo que o substrato gerado nesta condição foi utilizado para a comparação entre os diferentes LIs empregados no pré-tratamento.

A TABELA 10 contém os resultados de análise química obtidos para os substratos pré-tratados com os diferentes LIs. Os materiais pré-tratados com LIs contendo o ânion acetato, Bmim[OAc] e Emim[OAc] apresentaram 42 % e 44 % de deslignificação em relação ao material de origem, respectivamente, ao passo que o material pré-tratado na presença de Bmim[Cl] apresentou 36 % de deslignificação.

Outro aspecto importante sobre o efeito do LI no pré-tratamento dos materiais está em preservar a maior quantidade possível de polissacarídeos, promovendo aumento destes componentes nos substratos gerados que, neste caso, foi de 15,25 %, 20,60 % e 20,55 % para Bmim[OAc], Emim[OAc] e Bmim[Cl], respectivamente. Como resultado do uso de Bmim[OAc], Emim[OAc] e Bmim[Cl] associado ao dióxido de carbono supercrítico e etanol, os substratos gerados apresentaram 71 %, 74 % e 75 % de teor de carboidratos, respectivamente, além de apresentarem valores acima de 71 % de R_M .

Inicialmente os dados de recuperação de material após o pré-tratamento foram de 87, 77 e 99 % para os substratos Bmim[OAc], Emim[OAc] e Bmim[Cl], respectivamente. Portanto, para verificar a possibilidade do LI ter permanecido impregnado no substrato principalmente quando o pré-tratamento foi realizado na presença de Bmim[Cl], ensaios de lavagem aquosa dos substratos pré-tratados foram realizados durante 12 h. Os resultados da quantificação de LI nos filtrados indicaram que apenas o Bmim[Cl] foi recuperado na proporção de 25 % da quantidade inicial empregada no pré-tratamento, fato que leva à perda de atividade das enzimas por inibição ou por desnaturação. Conforme provado por TURNER *et al.* (2003) em ensaios de hidrólise enzimática na presença de Bmim[Cl], o íon cloreto (Cl^-) é responsável pela desnaturação da enzima. Portanto, contabilizando as quantidades Bmim[Cl] que permaneceram no substrato pré-tratado, um R_M de 71 % foi encontrado mesmo após deslignificação parcial do material.

Baseado na necessidade de redução da severidade do processo para o emprego do Bmim[Cl], pode-se extrapolar que, usando condições similares de pré-tratamento (250 Bar e 180 °C), talvez seja possível empregar quantidades ainda menores de LI em relação à biomassa sem que ocorram maiores danos ao substrato. No entanto, esta medida necessitaria de melhorias no processo de recuperação do LI.

Apesar de apresentar recuperação anidroxilose ligeiramente maior que o pré-tratamento empregando Bmim[OAc], o uso de Emim[OAc] gerou menor recuperação de anidroglicose com menor R_M quando comparado ao emprego de Bmim[OAc]. Além destes fatores, o preço de mercado do Emim[OAc] é em média 10 vezes maior do que o do Bmim[OAc]. Com base nisso, o uso de Bmim[OAc] gera um processo mais viável do que aquele baseado no uso de Emim[OAc].

TABELA 10. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS SUBSTRATOS LIVRE DE EXTRAÍVEIS E PRÉ-TRATADOS COM DIFERENTES LÍQUIDOS IÔNICOS.

Componentes	Composição Química				Recuperação mássica		
	BC _{LEE}	Bmim[OAc]	Emim[OAc]	Bmim[Cl]	Bmim[OAc]	Emim[OAc]	Bmim[Cl]
AnGlc	44,80±0,77	52,17±0,95	52,67±1,66	52,76±0,21	101,31	90,53	83,62
AnXyl	15,3±0,18	19,51±0,60	20,23±0,83	21,81±0,14	97,51	101,68	101,08
AnAra	1,62±0,18	1,86±0,17	1,98±0,19	0,28±0,06	99,89	94,11	12,27
AnGal	0,35±0,18	0,36±0,04	ND	ND	89,49		
LIA	29,33±1,10	17,04±2,18	16,56±0,48	18,67±0,31	50,54	43,47	45,20
LSA	0,03±0,01	0,04±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01	101,50	89,83	82,83
Total	94,31	88,63	91,48	93,56	-	-	-
R _{LI}	-	-	-	-	94,79	88,23	62,24
R _M	-	-	-	-	87	77	71

BC_{LEE}= bagaço de cana livre de extrato alcóolico; R_M= Rendimento mássico; R_{LI} = rendimento mássico de líquido iônico na fração solúvel; AnGlc = Anidroglicose; AnXyl = Anidroxilose; AnAra = Anidroarabinose; AnGal = Anidrogalactose; LIA = Lignina Insolúvel em Ácido; LSA = Lignina Solúvel em Ácido; ND = não detectado.

Na comparação entre os cátions, os substratos pré-tratados com LI de cátion Bmim apresentaram maiores teores de lignina, demonstrando que o cátion Emim foi ligeiramente mais eficiente na deslignificação do substrato. Interações entre os cátions imidazólicos e a lignina podem ocorrer via interações de baixa intensidade (van der Waals) entre grupamentos alquila, via ligação de hidrogênio e via interações Coulombianas envolvendo a carga positiva alocada no anel imidazólico (DUPONT, 2011) e o aumento da cadeia na posição 1 deste anel aumenta a sua exposição à interação Coulombiana. Além disso, por ter maior cadeia carbônica e assim maior efeito indutivo que doa elétrons ao anel, o grupamento butil estabiliza melhor a carga positiva no anel imidazólico do que o grupamento etil. Portanto, no anel imidazólico, a concentração de carga positiva (baixa densidade eletrônica) interage com a lignina por força Coulombiana, principalmente com os sítios aromáticos da lignina (alta densidade eletrônica).

Outro aspecto importante está nas possíveis modificações causadas na cristalinidade da celulose pelo emprego de diferentes LIs no pré-tratamento do bagaço de cana. Por este motivo, as amostras foram submetidas à análises de espalhamento de Raios X de alto e baixo ângulo.

As curvas de WAXS (WAXS do inglês Wide-Angle X-ray Scattering) são apresentadas na FIGURA 22A na forma das intensidades corrigidas dos feixes de dispersão (I) de Raios X como uma função do ângulo de espalhamento 2θ , enquanto que a FIGURA 22B apresenta as curvas obtidas para SAXS (SAXS do inglês Small-Angle X-ray Scattering).

Baseado na análise de cristalinidade de amostras celulósicas via difratometria de Raios X, alguns picos devem ser levados em consideração de acordo com o padrão de difração da amostra, tais como: o pico principal em torno de $22,5^\circ$, que é indicativo da distância das ligações de hidrogênio entre as folhas na celulose I; um pico mais largo próximo a 16° , que corresponde a uma composição de picos, sendo um destes de celulose I_β ($16,7^\circ$ e $14,9^\circ$) e outro de celulose I_α ($16,8^\circ$ e $14,3^\circ$); e um terceiro e pequeno pico por volta de $34,5^\circ$, que se refere a um quarto do comprimento de uma unidade de celobiose oriunda da ordenação ao longo do direcionamento das fibras (WADA *et al.*, 2003). Todos estes sinais foram observados para todas as amostras analisadas, no entanto, não foi possível de observar nenhum indício de modificação de celulose tipo I para celulose tipo II, a qual apresenta um pico por volta de $12,1^\circ$ (KUMAR *et al.*, 2010), possivelmente porque no processo $scCO_2/EtOH-LI$, o LI não é o solvente da reação, mas sim um co-solvente minoritário que não causa a dissolução do substrato, conforme observado por CHENG *et al.* (2011). Neste caso, uma solução de biomassa (3 % m/v) foi preparada em Emim[OAc], levando à transição de parte da celulose tipo I para tipo II pela regeneração do substrato.

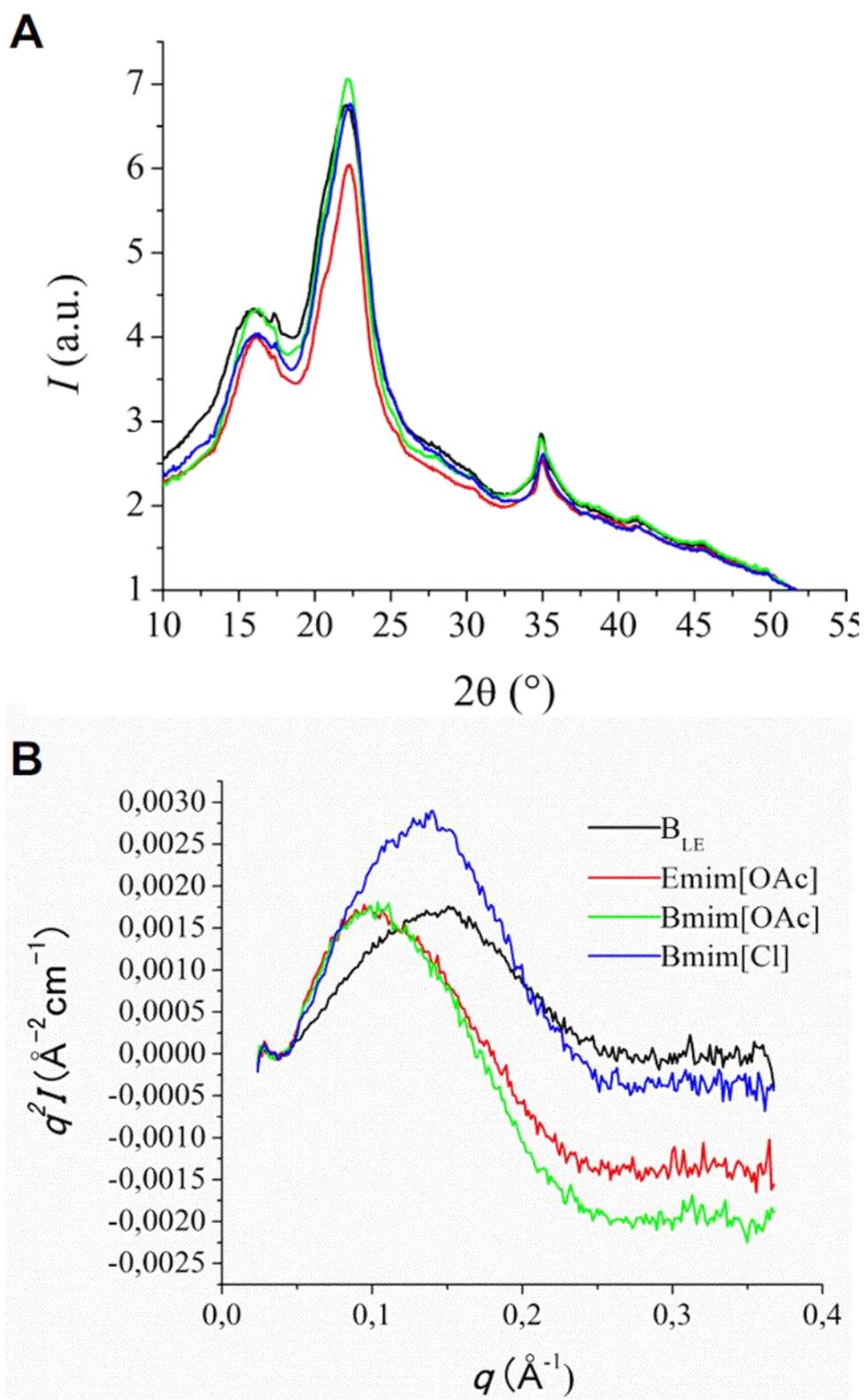


FIGURA 22. CURVAS DOS PERFIS CRISTALOGRÁFICOS DOS SUBSTRATOS BC_{LEE} E PRÉ-TRATADOS COM NA PRESENÇA DE Bmim[OAc], Emim[OAc] E Bmim[Cl] GERADOS PELAS ANÁLISES DE RAIOS X DE ALTO ÂNGULO (WAXS) EM (A) E BAIXO ÂNGULO (SAXS) EM (B).

De acordo com os dados de WAXS da celulose presente nos materiais (TABELA 11), não houve mudança expressiva nos valores de índice de cristalinidade dos substratos pré-tratados com $\text{scCO}_2/\text{EtO-LI}$ em relação ao substrato BC_{LEE} , mas apenas pequenos aumentos de 4 % quando o substrato foi pré-tratado na presença de $\text{Bmim}[\text{Cl}]$ e $\text{Emim}[\text{OAc}]$ e de 2% na presença de $\text{Bmim}[\text{OAc}]$. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas, de acordo com os valores de desvio padrão a elas associados. Referente à largura do cristal de celulose, os valores encontrados para os substratos pré-tratados foram maiores do que o valor encontrado para o BC_{LEE} . Neste caso, para os substratos que tiveram contato com os LIs de ânion acetato, os valores de largura do cristal foram maiores do que quando na presença de ânion cloreto, apresentando de 4,1 nm, 4,2 nm e 3,8 para o uso de $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, de $\text{Emim}[\text{OAc}]$ e de $\text{Bmim}[\text{Cl}]$, respectivamente, enquanto que para o BC_{LEE} , a largura do cristal foi de apenas 3,5 nm.

TABELA 11. VALORES ENCONTRADOS PARA AS PROPRIEDADES CRISTALOGRÁFICAS DA CELULOSE PRESENTE NOS MATERIAIS BC_{LEE} E PRÉ-TRATADOS NA PRESENÇA DE $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, $\text{Emim}[\text{OAc}]$ e $\text{Bmim}[\text{Cl}]$.

Substratos	WAXS		SAXS
	Largura do cristal (nm)	$^a\text{CrI}_{\text{WAXS}}$ (%)	Distância interfibrilar (nm)
$\text{BC}_{\text{LEE}}^{\text{b}}$	$3,5 \pm 0,1$	28 ± 3	$4,3 \pm 0,1$
$\text{Bmim}[\text{Cl}]^{\text{c}}$	$3,8 \pm 0,1$	32 ± 3	$4,7 \pm 0,1$
$\text{Emim}[\text{OAc}]^{\text{d}}$	$4,2 \pm 0,1$	32 ± 3	$6,4 \pm 0,1$
$\text{Bmim}[\text{OAc}]^{\text{d}}$	$4,1 \pm 0,1$	30 ± 3	$6,2 \pm 0,1$

$^a\text{CrI}_{\text{WAXS}}$ = índice de Cristalinidade obtido por espalhamento de Raio X de alto ângulo; $^b\text{BC}_{\text{LEE}}$ = bagaço de cana livre de extrato alcóolico; c Pré-tratamento realizado a 110 °C; d Pré-tratamento realizado a 180 °C.

A análise por SAXS permitiu caracterizar o aumento nos valores de distância interfibrilar para os substratos pré-tratados em relação ao substrato BC_{LEE} . Neste caso, os valores obtidos para os LIs contendo ânion acetato com cátions Bmim e Emim , foram de 6,2 nm e 6,4 nm respectivamente, ao passo que para o $\text{Bmim}[\text{Cl}]$, a distância interfibrilar foi de 4,7 nm. Portanto, os aumentos nos valores de distância interfibrilar foram de 9 %, 49 % e 44 % para os materiais pré-tratados com $\text{Bmim}[\text{Cl}]$, $\text{Emim}[\text{OAc}]$ e $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, respectivamente. De maneira similar à largura do cristal de celulose, os valores de distância interfibrilar foram de mesma magnitude quando o LI apresentava o ânion acetato. Neste caso, fica evidente que, apesar de não alterar a cristalinidade da celulose,

o emprego de Lis de ânion acetato foi mais eficiente do que o Bmim[Cl] no aumento da largura do cristal da celulose, bem como no aumento da distância interfibrilar.

5.4. Estudo de hidrólise enzimática da celulose: sinergia e modo de ação

O estudo do modo de ação das celulases, bem como da ocorrência de sinergia durante o processo de hidrólise, apresenta limitações quando aplicado à caracterização de preparados enzimáticos multi-componentes e comerciais. Por este motivo, a fim de garantir que as interpretações dos resultados fossem endereçadas especificamente a um tipo de atividade enzimática, amostras purificadas (SIPOS *et al.*, 2010) dos principais componentes do complexo celulásico de *T. reesei* foram empregadas nos estudos de sinergia e do modo de ação das enzimas (vide item 5.4.1.) sobre um substrato modelo (W1FP). Neste caso, conforme o item 4.6.1., as enzimas selecionadas corresponderam às frações CBH-I e EG-II por serem estas as enzimas de maior atividade dentre as produzidas por este fungo (VÁRNAI *et al.*, 2013). Posteriormente, o comportamento das enzimas frente ao substrato modelo foi comparado ao obtido sobre substratos celulósicos pré-tratados (vide item 5.4.2.).

A FIGURA 23 apresenta o eletroforetograma de SDS-PAGE obtido para as enzimas purificadas utilizadas neste trabalho. Neste caso, confirmou-se que não havia outras proteínas nas preparações selecionadas para os estudos de sinergia.

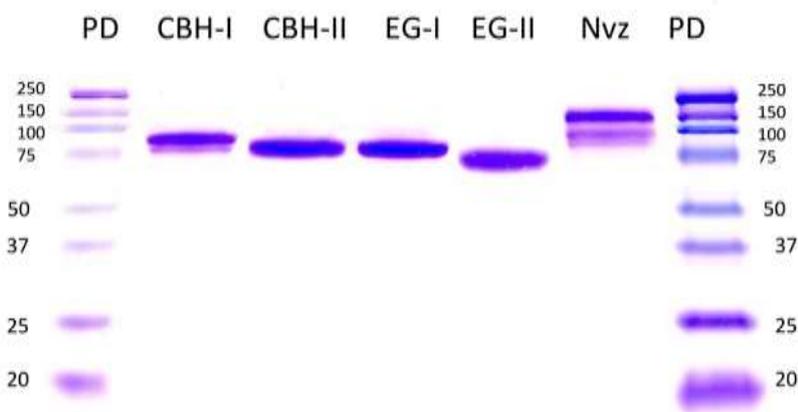


FIGURA 23. ELETROFORETOGRAMA SDS-PAGE DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1. PD = PADRÃO; NVZ = NOVOZYM 188.

No entanto, é importante mencionar que duas bandas de eluição foram encontradas na amostra comercial Novozym 188®, demonstrando que este preparado

não consiste de uma amostra mono-enzimática. No caso dos estudos de sinergia em substratos pré-tratados, a β G purificada de *A. niger* utilizada correspondeu a uma β G oriunda da Novozym 188[®] que foi cordialmente cedida pelo VTT Biotechnology (SIPOS *et al.*, 2010).

Finalmente, a metodologia empregada (vide item 4.6.), está baseada na utilização de um único substrato e no monitoramento dos ARs produzidos ao longo da hidrólise, sejam estes totais, solúveis ou insolúveis, o que facilita a determinação da contribuição de cada atividade enzimática sobre a conversão do material em açúcares passíveis de fermentação.

5.4.1. Desenvolvimento de metodologia alternativa para investigação de modo de ação do complexo celulásico

O atual método para determinação de atividades celulolíticas para a caracterização de preparações celulásicas sugerido pela I.U.P.A.C. (GHOSE, 1987) tem sido amplamente utilizado ao longo das últimas décadas; porém, por estar baseado na utilização de diferentes substratos (que diferem em sua acessibilidade química) para determinar diferentes atividades enzimáticas, a realização de estudos visando de sinergia EnG/ExG ou da relação EnG:ExG ao longo da hidrólise da celulose tem sido dificultada. Além disso, problemas como as mudanças sofridas pelo substrato ao longo da reação, tais como mudanças no grau de polimerização e na quantidade disponível de celulose para a hidrólise, ou fatores associados às enzimas, como a inibição competitiva pelo acúmulo de produtos de reação (celobiose e glucose) e a relação não linear (logarítmica) entre a concentração de enzima e seu desempenho, tornam difícil a elaboração de novos métodos de análise. Por este motivo, o atual método da I.U.P.A.C. está baseado no uso de pelo menos 3 diluições da enzima para identificar qual a concentração que é capaz de converter 4 % do substrato ($1,33 \text{ mg mL}^{-1}$ ou $7,39 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$) após 60 min de incubação e, desta curva, extrapolar a concentração enzimática capaz de liberar $1 \text{ } \mu\text{mol (min mL)}^{-1}$. Desta forma, este método discrimina a análise de amostras experimentais, caso o preparado enzimático não seja capaz de atingir tal conversão em 60 min.

Por este motivo, o acompanhamento da liberação de ARs (vide item 4.8.2.) foi avaliado como alternativa para a determinação de atividade enzimática em preparações celulásicas e o resultado deste ensaio foi nomeado de “atividade capaz de liberar açúcar redutor” (ARS, do inglês *Activity Able to Release Reducing Sugars*), que está baseada nos tempos de reação em que a liberação de produto (AR) é linear. Outro aspecto importante está relacionado ao comportamento logarítmico destas enzimas em relação à sua diluição (GHOSE, 1987), pois adicionando diferentes valores de FPA de um preparado enzimático em um ensaio de hidrólise, a diluição não é considerada no cálculo

da atividade, em outras palavras, a diluição feita com a enzima já não garante o mesmo desempenho (em FPU) na diluição de origem.

Portanto, a concentração enzimática na análise deve ser a mesma a ser utilizada no experimento de hidrólise. O método proposto permite a comparação direta entre as atividades ou produtos de reação envolvidos na hidrólise enzimática da celulose por fazer uso de um único substrato de referência (W1FP), permitindo a investigação do modo de ação e da sinergia existente entre as enzimas do complexo celulásico. Neste estudo, os preparados enzimáticos comerciais Celluclast 1.5 L FG[®] e Novozym foram empregados na forma de mistura em razão volumétrica 1:0,30, segundo as recomendações de BREUIL *et al.* (1992). A FIGURA 24 apresenta a produção de AR_{Tot}, AR_{Sol} e AR_{Insol} após 10 min de hidrólise para as diferentes concentrações enzimáticas usadas na mistura dos preparados.

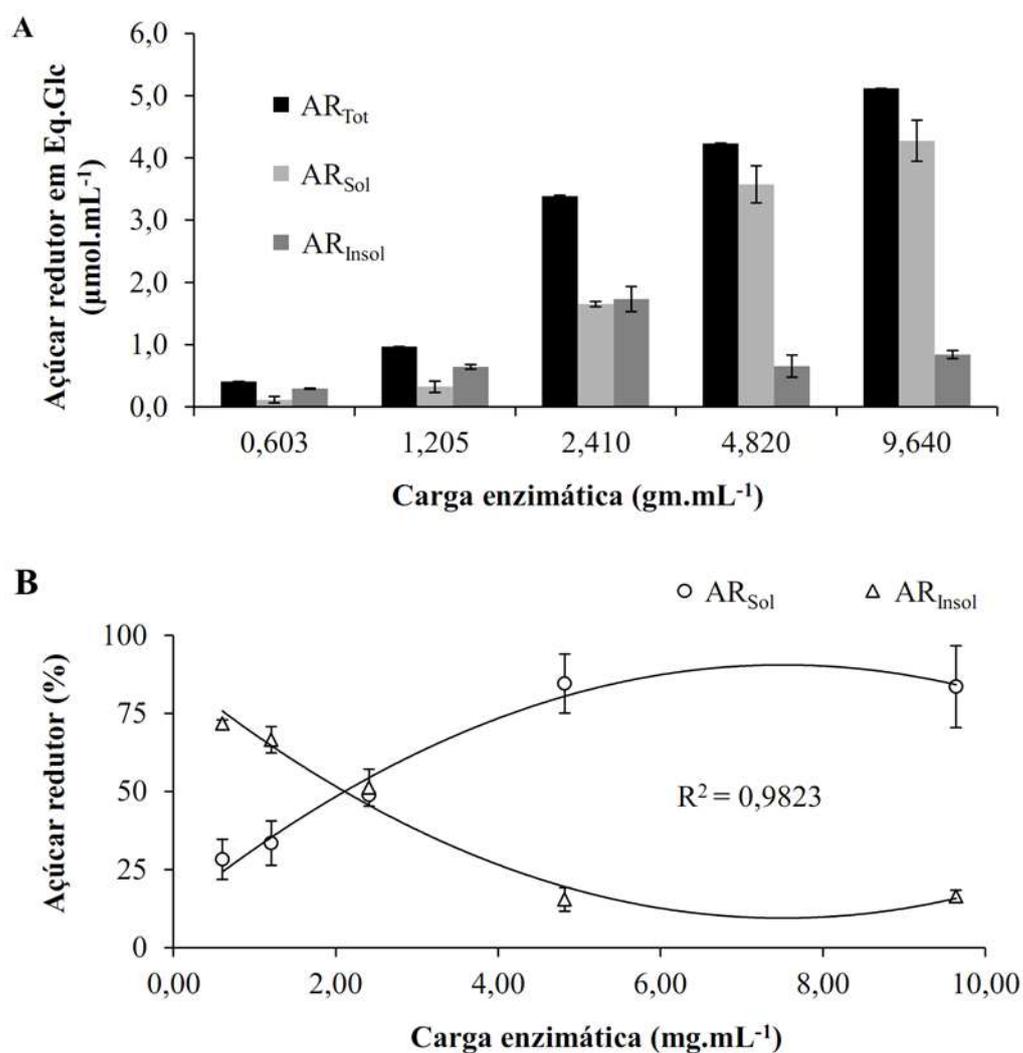


FIGURA 24. PERFIL CELULOLÍTICO DA MISTURA CELLUCLAST/NOVOZYM (1:0,30): AÇÚCAR REDUTOR EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE (Eq.Glc) (A); % DE AÇÚCARES REDUTORES (B).

Os perfis da FIGURA 24A, demonstram que, no procedimento proposto, as proporções entre AR_{Sol} e AR_{Insol} variam em relação à concentração de proteínas no meio (diluição). Isso ocorre porque as velocidades de reação são diferentes para cada classe de enzima envolvida, EnGs, ExGs e β Gs, que são diferentes em relação à concentração enzimática, merecendo, portanto, atenção individual ao longo da hidrólise. Além disso, a FIGURA 24B revela o comportamento de sinergia entre as atividades ARS_{Sol} (ExG + β G) e ARS_{Insol} (EnG) em relação à concentração do preparado enzimático. Em baixa concentração enzimática, os AR_{Insol} representam 72,38 % da atividade ARS_{Tot} , ao passo que os AR_{Sol} representam apenas 27,62 %. Por outro lado, em alta concentração enzimática a situação é inversa, com 88,46 e 11,54% de AR_{Sol} e AR_{Insol} , respectivamente. Portanto, fica claro que, para baixas relações enzima/substrato, a atividade EnG é um fator limitante para a sinergia endo-exo. No entanto, para alta relação enzima/substrato sem mudança na proporção EnG/ExG, a atividade EnG se torna alta o suficiente para gerar novas terminações redutoras insolúveis para a ação das ExGs. Portanto, a fim de verificar as alterações na razão entre AR_{Sol}/AR_{Insol} , foi necessário realizar um experimento cinético.

Sabe-se que a atividade β G presente na produção de AR_{Sol} pode modificar a magnitude do desempenho das celulasas, mas não o modo de ação catalítico (TEUGJAS e VÄLJAMÄE, 2013). Portanto, a fim de refinar os estudos de sinergia e do modo de biodegradação da celulose, a δ -gluconolactona (GLT) foi utilizada como inibidor forte e específico de atividade β -glicosidásica. A FIGURA 25A mostra o efeito da GLT sobre a atividade enzimática, que foi expressa em μ mol de AR solúveis (equivalentes de glucose) por tempo de reação para as enzimas CBH-I, CBH-II, EG-I e EG-II. Como esperado, a GLT não afetou os rendimentos de AR_{Sol} uma vez que estas amostras não têm atividade β G (FIGURA 25A e B).

Assim, foi possível determinar as Atividades Enzimáticas Capazes de Liberar Açúcares Redutores (ARS do inglês *Activity able to release Reducing Sugar*), as quais foram nomeadas da seguinte forma: celulásica total (ARS_{Tot}), solúvel na presença de um inibidor de β -glucosidase (ARS_{ExG}), solúvel devido a ação das β -glucosidases ($ARS_{\beta G}$) e insolúvel (ARS_{EnG}).

Por outro lado, para as preparações enzimáticas Mix D, Mix E e Mix F (amostras contendo β G), os rendimentos na produção de AR_{Sol} foram claramente inferiores na presença de GLT. Portanto, uma vez que ambas as enzimas EnG e ExG não foram afetadas pela GLT, as diferenças mostradas na FIGURA 25B para as amostras Mix D, Mix E e Mix F são devidas aos ARs liberados pela atividade β -glicosidásica. Uma vez comprovada a eficiência e especificidade da GLT como inibidor de β G, um estudo comparativo entre a metodologia recomendada pela I.U.P.A.C. e a proposta baseada na

quantificação dos diferentes ARs liberados na hidrólise foi realizado para o preparado enzimático contendo Celluclast 1.5 L FG® e Novozym188® na proporção 1,0:0,3, respectivamente. Os dados são apresentados na FIGURA 26.

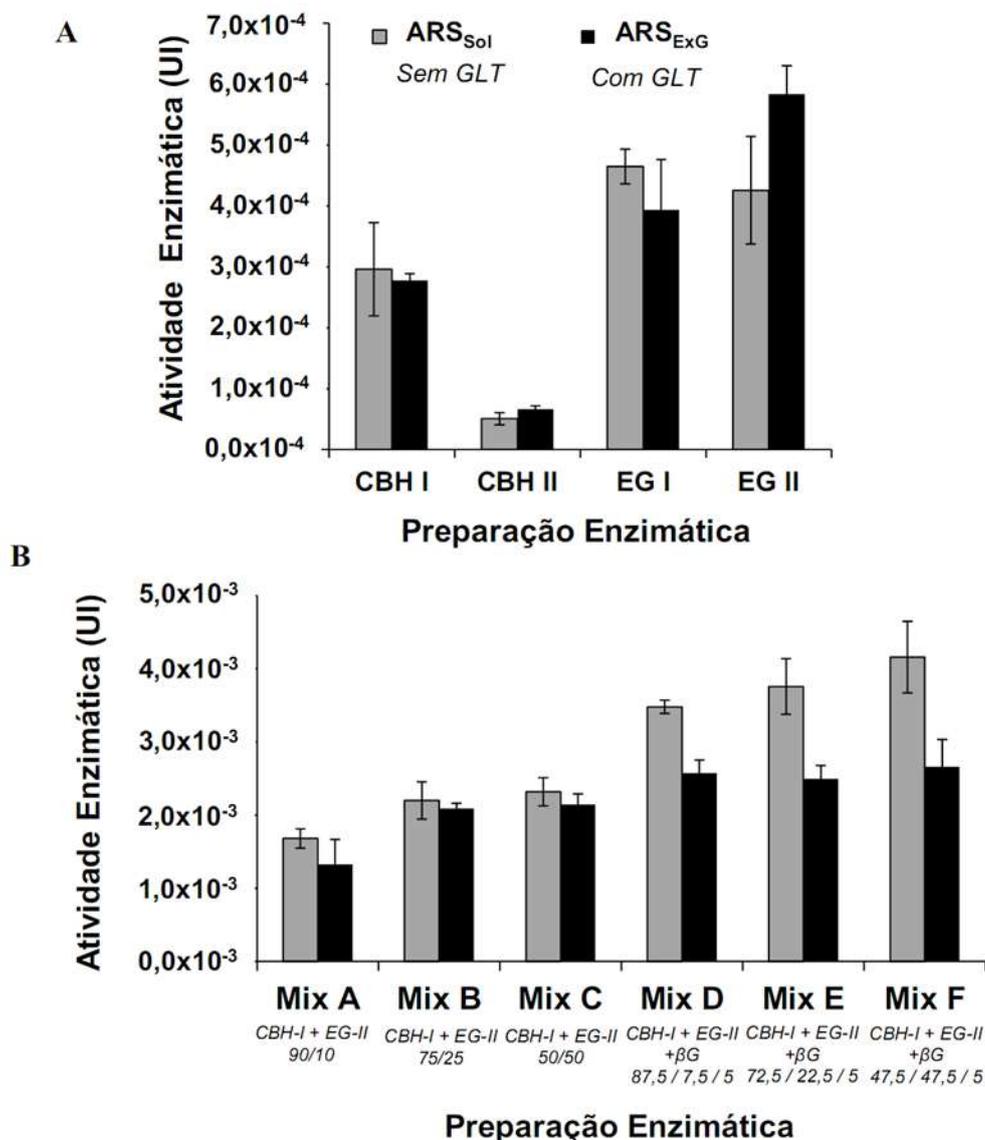


FIGURA 25. EFEITO DA δ -GLUCONOLACTONA SOBRE A ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AR_{Sol} PARA AS ENZIMAS PURIFICADAS (A) E SUAS MISTURAS (B).

Sabe-se que a atividade FPA é resultado da ação das três classes enzimáticas envolvidas na degradação da celulose à glucose (EnG, ExG e β G). Portanto, a soma dos valores das atividades individuais destas enzimas não pode ser superior ao valor obtido para o complexo enzimático que as contém. No entanto, comparando os dados obtidos para CMC (4651 UI de CMCCase) e W1FP (597 FPU), nota-se claramente a falta de complementaridade que existe entre as atividades enzimáticas derivadas do método

I.U.P.A.C. (FIGURA 26). Além disso, este método não fornece informações complementares sobre a degradação da celulose no que diz respeito à liberação de AR_{Sol} e AR_{Insol} , os quais podem ser facilmente obtidos com a metodologia de ARS. Neste sentido, os altos valores encontrados para CMCcase são devidos à alta acessibilidade deste substrato frente às enzimas, uma vez que se trata de um substrato solúvel, diferentemente das fibras de celulose presentes no W1FP.

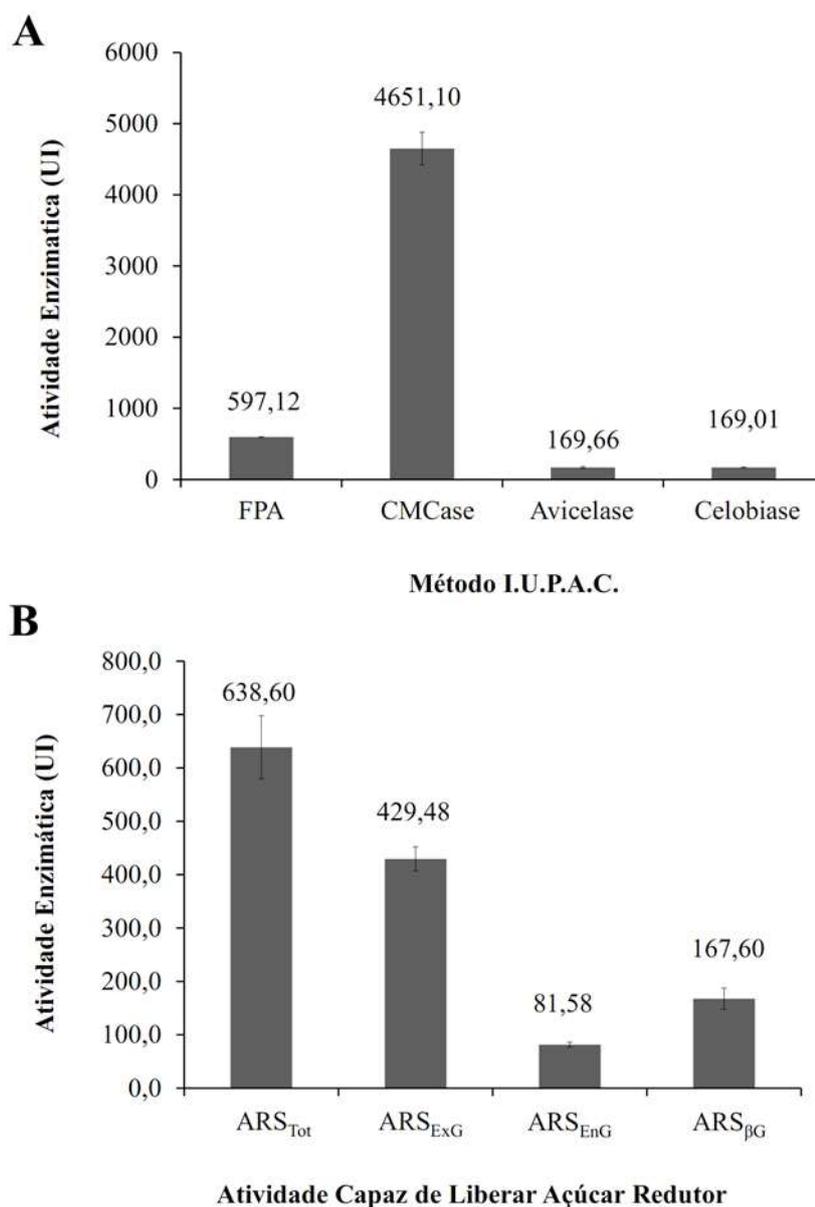


FIGURA 26. PERFIS HIDROLÍTICOS OBTIDOS COM OS MÉTODOS DA I.U.P.A.C. (A) E ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR (B).

É importante observar que ambos os métodos foram capazes de determinar valores similares para as atividades celulásicas totais e de β -glucosidasases. Assim, os valores observados para a atividade de celulase total foram de $597,12 \pm 2,39$ FPU e

638,60 ± 59,11 unidades de ARS_{Tot}, respectivamente, enquanto que para a atividade β-glucosidásica, os valores correspondentes foram de 169,01 ± 8,45 CBU e 167,60 ± 19,95 unidades de ARS_{βG}, que são muito próximos dos 30% da atividade original da Novozym 188 contra *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*NPG) (665 unidades) (DIEN *et al.*, 2008). Por conseguinte, além de ser comparável ao método I.U.P.A.C. para as atividades de celulase total e de β-glucosidase, que representou 26,24 % do total da atividade de celulolítica, a proposta de determinação dos diferentes ARs produzidos ao longo da hidrólise de W1FP também permite estimar a ação de enzimas EnG e ExG no mesmo substrato (FIGURA 26B), que está associado aos valores de AR_{Sol} (67,25 %) e AR_{Insol} (12,77 %). Além disso, conforme demonstrado anteriormente por SILVEIRA *et al.* (2012), as EnGs agem majoritariamente no início da hidrólise produzindo AR_{Insol} e, em seguida, estes são solubilizados ao longo da hidrólise. Esse fato demonstra que a relação AR_{Sol}/AR_{Insol} muda consideravelmente ao longo da hidrólise, além de ser um fator dependente da carga enzimática.

Recentemente, SILVEIRA *et al.* (2012) estudaram a habilidade de diferentes preparados enzimáticos em liberar AR solúveis ao longo da hidrólise de W1FP. Uma das principais observações foi a de que a hidrólise enzimática da celulose ocorre através de uma rápida formação de AR_{Insol}, seguida de uma etapa em que ocorre um decaimento de AR_{Insol} concomitante ao aumento na produção de AR_{Sol} (FIGURA 27). O mesmo comportamento foi observado para a mistura enzimática contendo Celluclast 1.5 L FG[®] e Novozym 188[®] que foi aplicada neste estudo.

De acordo com as FIGURAS 27A e C, a liberação de AR_{Tot} e AR_{Sol} seguiram um comportamento logarítmico em relação ao tempo para todas as cargas enzimáticas investigadas. Por outro lado, o perfil de AR_{Insol} não foi o mesmo para todas as concentrações enzimáticas. As concentrações enzimáticas mais baixas ([E1], [E2] e [E3]) geraram uma produção baixa, porém regular de AR_{Insol}, ao passo que, sob altas cargas enzimáticas ([E4] e [E5]), um aumento na inclinação destas séries foi visível no estágio inicial da reação. A maior produção de AR_{Insol} foi observada após 30 min sob ação da maior carga enzimática ([E5]) (FIGURA 27B). Isso significa que os AR_{Insol} recém-formados são gradualmente .

Como apresentado nas FIGURAS 23 e 26, a hidrólise enzimática da celulose é iniciada pelo aumento no número de terminações de cadeias do polímero (determinados como AR_{Insol}), os quais são consumidos gradualmente após a ação progressiva das exoglucanases, aumentando, desta forma, a liberação de AR_{Sol} e AR_{Sol}. Sob altas cargas enzimáticas, menores tempos são requeridos para alcançar uma disponibilidade significativa de AR_{Insol}, ao que se segue a liberação de altos valores de AR_{Sol} e AR_{Sol}. Portanto, devido ao acúmulo de produtos finais no meio de reação, a inibição das

enzimas que solubilizam a celulose segue um comportamento logarítmico (veja [E4] e [E5] na FIGURA 27), enquanto que, para [E1], [E2] e [E3], este comportamento se aproxima de uma função linear típica consumidos pela atividade ExG.

Exoglucanases atuam majoritariamente na liberação de celobiose ao longo da hidrólise de substratos celulósicos e estas enzimas apresentam um maior efeito de solubilização sobre a celulose. Assim, a atividade β -glucosidásica somente se torna importante existem oligossacarídeos solúveis encontram-se suficientemente disponíveis no ambiente de hidrólise. Portanto, em contraste com a predominância de AR_{Insol} nos primeiros estágios de hidrólise, a liberação de $AR_{\beta Sol}$ foi quase insignificante no início exceto para [E5], onde começou a aumentar apenas após 30 min de hidrólise, tornando-se majoritária após a maior parte da celulose ter sido solubilizada (FIGURA 27D).

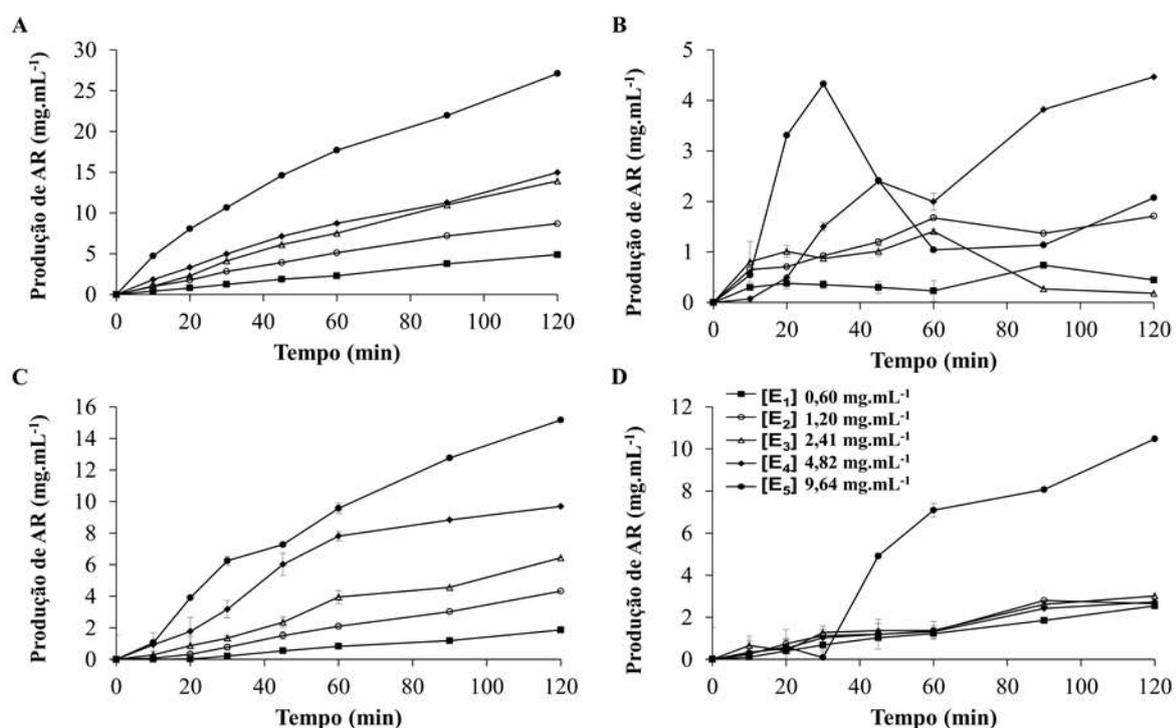


FIGURA 27. LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COMO RESULTADO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN Nº1: (A) AR_{Tot} , AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS; (B) AR_{Insol} , AÇÚCARES REDUTORES INSOLÚVEIS; (C) AR_{Sol} , AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS NA PRESENÇA DE δ -GLUCONOLACTONA; (D) $AR_{\beta Sol}$, AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS COMO RESULTADO DA ATIVIDADE DE β -GLUCOSIDASE.

Portanto, pode-se concluir que o método de análise do comportamento cinético de um preparado celulolítico, através do monitoramento dos diferentes tipos de ARs

formados, permite verificar em qual intervalo de tempo a formação dos diferentes produtos é majoritária. Além disso, com esta abordagem experimental, foi possível verificar que a GLT se comportou como um inibidor específico de atividade β G resultando em uma metodologia capaz que permite a comparação direta entre as atividades enzimáticas que estão envolvidas na formação dos diferentes tipos de ARs ao longo da hidrólise da celulose.

5.4.2. Hidrólise em papel filtro Whatman N°1

Os perfis hidrolíticos das amostras contendo CBH-I, CBH-II, EG-I e EG-II são apresentados na FIGURA 28 no que se refere à produção de AR_{Tot} , AR_{Sol} , AR_{Insol} e $AR_{\beta Sol}$. As faixas lineares de liberação AR_{Tot} foram semelhantes em todos os casos, correspondendo a uma reação de até 360 min para CBH-I e CBH-II e de até 120 min para as enzimas EG-I e EG-II. Conforme observado na FIGURA 28 e FIGURA 29, todos os preparados enzimáticos apresentaram um comportamento logarítmico para a liberação de AR_{Tot} e AR_{Sol} .

Comparado aos demais preparados enzimáticos, a amostra de EG-II apresentou a maior produção de AR_{Tot} até 360 min de reação (FIGURA 28). Já as liberações de AR_{Insol} e AR_{Sol} não seguiram um comportamento logarítmico, revelando que o comportamento típico geralmente descrito na literatura em trabalhos baseados na quantificação de produtos solúveis não é adequado para a liberação destas espécies durante a hidrólise enzimática da celulose. De maneira similar à EG-II, mas apresentando desempenho inferior, a EG-I liberou majoritariamente AR_{Insol} até 120 min de reação, os quais diminuíram a medida que a celulose era solubilizada.

Por outro lado, em se tratando de ExG, a CBH-I apresentou melhor desempenho não apenas em comparação com a CBH-II, mas também em comparação com as EnGs. Assim como para EG-I e EG-II, a CBH-I produziu apenas AR_{Insol} durante os primeiros 120 min de reação e estes AR_{Insol} diminuíram na medida que a reação se processou. Além disso, a velocidade de solubilização da celulose (produção de AR_{Sol}) foi muito maior para a CBH-I do que para as demais enzimas. Para a CBH-II, o perfil hidrolítico apresentado na FIGURA 28D demonstra que esta enzima exibiu baixo desempenho ao longo da hidrólise da celulose quando comparada com as demais enzimas apresentadas na mesma figura, tanto para a produção de AR_{Sol} quanto para a produção de AR_{Insol} . Neste caso, a explicação pode estar no fato de que esta enzima apresenta seu túnel catalítico não tão fechado quanto o da CBH-I e, portanto, pode apresentar alguma atividade EnG, sendo então menos eficiente do que a CBH-I na solubilização da celulose (EVANS *et al.*, 1995; VAN TILBEURGH *et al.*, 1984).

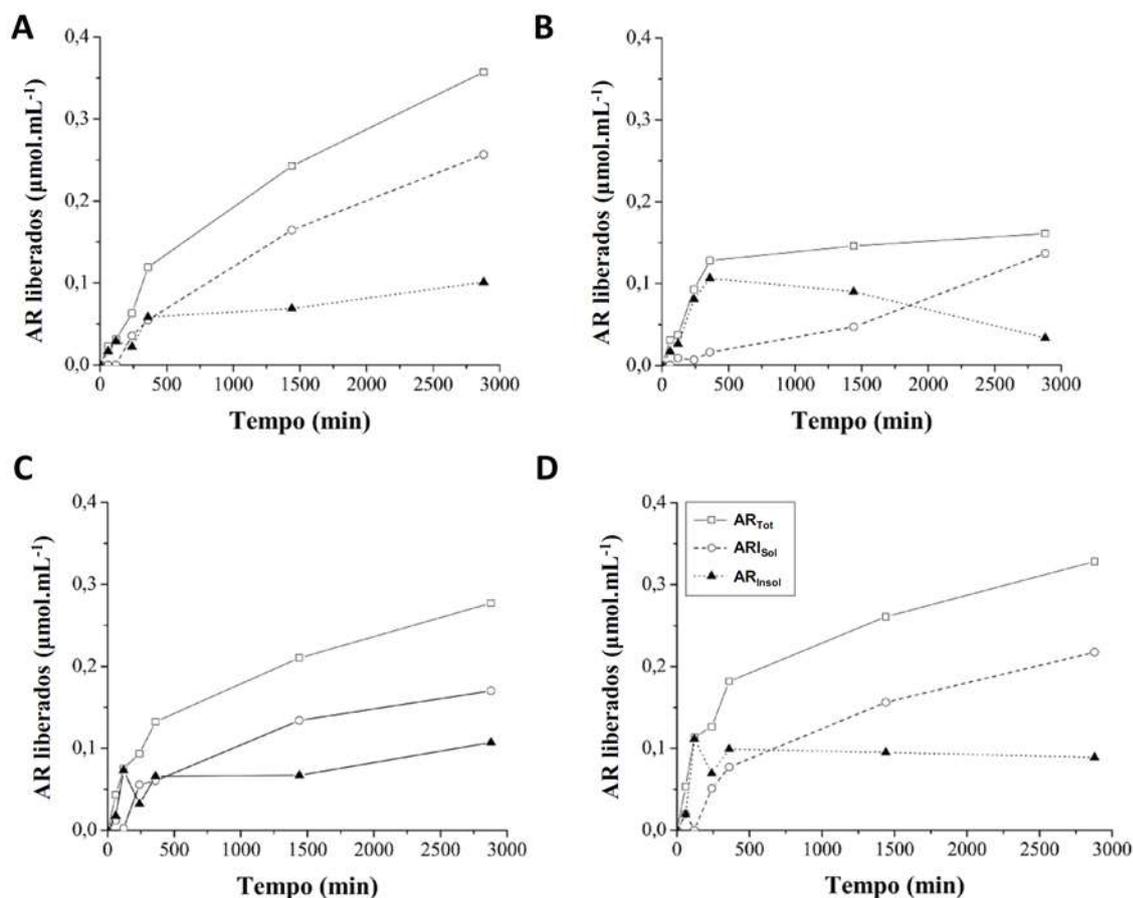


FIGURA 28. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 COM: A=EG-I; B=EG-II; C=CBH-I; D=CBH-II.

De maneira geral, foi constatado que tanto EnGs quanto ExGs apresentaram duas fases de hidrólise: (1) uma no início da reação, que consiste em gerar terminações redutoras insolúveis na superfície do substrato (AR_{Insol}); e (2) outra subsequente à formação de AR_{Insol} , que consiste em liberar AR_{Sol} com o consumo concomitante de AR_{Insol} . Neste caso, apesar das duas classes enzimáticas terem habilidade de atuar nos dois momentos da hidrólise, está claro que as EnG são especialistas na primeira etapa, ao passo que as ExG são especialistas na segunda etapa.

Os perfis de hidrólise apresentados na FIGURA 28 são um indício de que as especialidades de EnGs e ExGs são complementares numa amostra enzimática contendo estas duas atividades. Por este motivo, o estudo do perfil hidrolítico de misturas contendo estas enzimas fez-se importante para o entendimento e confirmação da existência de sinergia entre estas enzimas e de complementariedade entre as suas especialidades catalíticas. A FIGURA 29 apresenta os perfis hidrolíticos dos preparados enzimáticos contendo diferentes proporções de CBH-I/EG-II na ausência (FIGURA 29 A, B e C) e na presença de atividade β -glucosidásica (FIGURA 29 D, E e F).

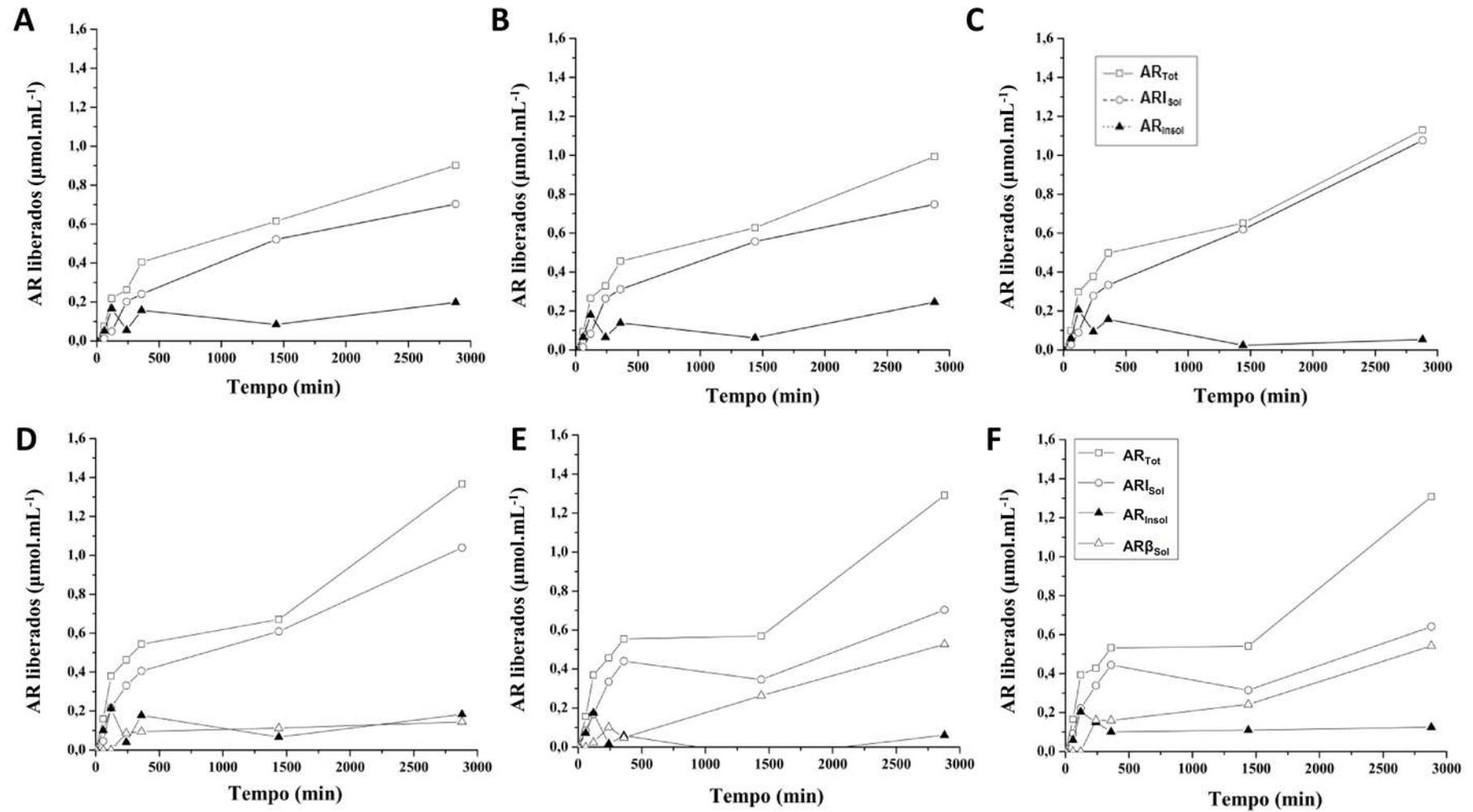


FIGURA 29. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 COM: A = Mix A; B = Mix B; C = Mix C; D = Mix D; E = Mix E; F = Mix F.

De acordo com os perfis hidrolíticos apresentados nos gráficos A, B e C da FIGURA 29, houve sinergia entre EnG e ExG e, de maneira similar, a sinergia entre celulases e β -glucosidases pode ser identificada na comparação entre os gráficos A, B e C com os gráficos D, E e F. Este fato ocorreu pois a produção observada para as misturas foi maior que a somatória dos desempenhos dos preparados quando empregados de maneira individual (vide Equação 8).

Para os preparados enzimáticos que contêm CBH-I e EG-II nas proporções 90:10, 72:25 e 50:50, intitulados Mix A, Mix B e Mix C, respectivamente, pode-se observar na FIGURA 29 que, da mesma forma encontrada para as misturas das enzimas purificadas (FIGURA 28), a composição do sistema é majoritária em AR_{Insol} nos 120 min de reação. Além do aumento na taxa de formação de AR_{Insol} nos primeiros 120 min de reação, o aumento na porção de EG-II na amostra enzimática resultou em um aumento linear da velocidade com que ocorre a produção final de AR_{Tot} , comportamento este evidenciado no aumento da inclinação nas séries destes produtos. A FIGURA 30 apresenta as curvas que relacionam a quantidade de EG-II no preparado enzimático e a taxa de formação de AR_{Tot} para as últimas 24 horas de reação ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). Este fato foi seguido de um aumento na velocidade de consumo de AR_{Insol} , que foi também causado pela mudança na proporção entre CBH-I e EG-II.

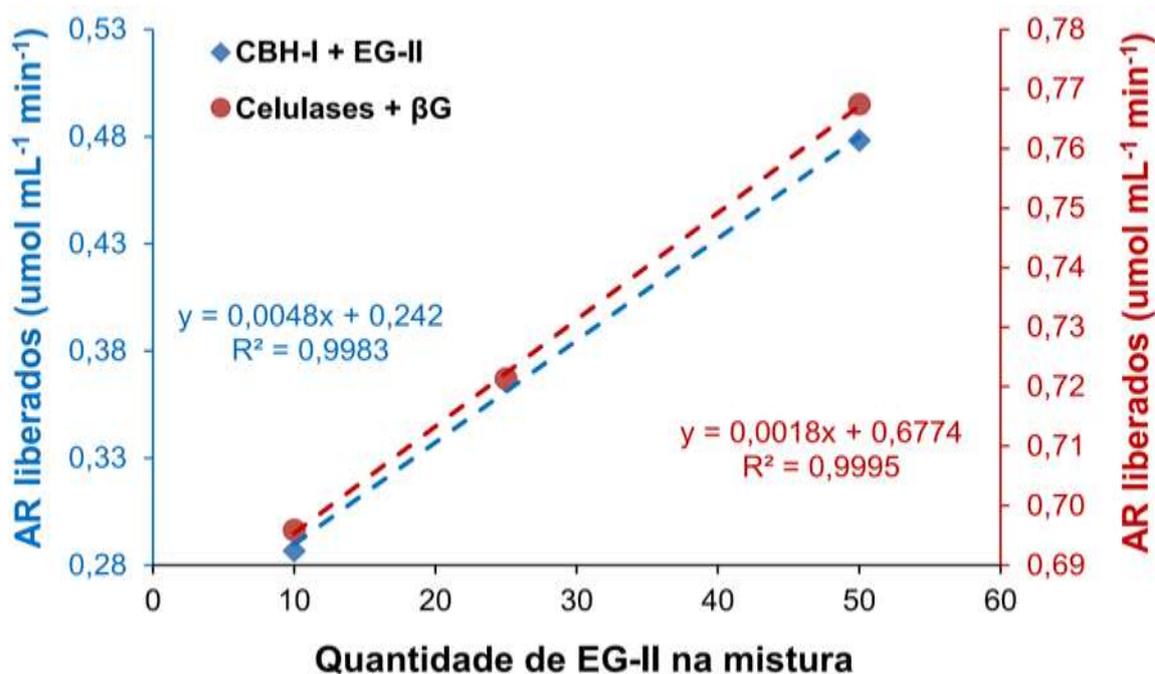


FIGURA 30. EFEITO DA QUANTIDADE DE EG-II NO PREPARADO ENZIMÁTICO SOBRE A VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR TOTAL.

De maneira similar aos preparados contendo apenas CBH-I e EG-II, a degradação da celulose na presença de β G seguiu as mesmas etapas reacionais. De acordo com a FIGURA 29, houve uma formação linear de AR_{Insol} até os primeiros 120 min de reação, sendo este o constituinte majoritário dos AR_{Tot} , ou seja, a formação de AR_{Sol} foi minoritária neste estágio inicial da reação. Posteriormente, uma queda na quantidade de AR_{Insol} foi observada de maneira concomitante a um aumento na formação de ARI_{Sol} .

De maneira diferente ao comportamento observado para a produção de AR_{Insol} , a produção de $AR\beta_{Sol}$ foi observada apenas no estágio final da reação. Uma vez comprovado que o $AR\beta_{Sol}$ é realmente devido à ação da atividade β G, é coerente não ter sido observada a formação de $AR\beta_{Sol}$ nos estágios iniciais da reação, pois sem a liberação de oligômeros solúveis, as β Gs não têm substrato disponível para atuarem. O aumento da quantidade de EG-II no preparado enzimático contendo CBH-I causou um aumento na taxa de produção de $ARTot$ quando na presença de β G (FIGURA 30). Portanto, além do efeito de sinergia causado pela presença de EG-II, também foi observado um aumento nos valores de conversão final devido à presença de β G (FIGURA 29 D, E e F). Estes efeitos reiteram a existência da sinergia durante a degradação enzimática da celulose.

Os valores do grau de efeito de sinergia (DSE do inglês *Degree of Synergistic Effect*) devidos à ação da EG-II em solução contendo CBH-I estão apresentados na

TABELA 12. Desta forma, com base na metodologia utilizada, o DSE para a produção de AR_{Insol} foi majoritariamente >1 ao longo da hidrólise, demonstrando que a maior contribuição do valor absoluto de DSE para AR_{Tot} foi devido à produção de AR_{Insol} , com exceção dos tempos de 1440 min e 2880 min, possivelmente devido ao alto consumo de AR_{Insol} na solubilização da celulose pela CBH-I.

Diferentemente do DSE entre CBH-I e EG-II, os maiores valores de DSE devido à presença de β G foram encontrados para a produção de ARI_{Sol} e $AR\beta_{Sol}$. Destes, o DSE para ARI_{Sol} apresentou valor máximo no início da reação, ao passo que o DSE para $AR\beta_{Sol}$ teve seu valor máximo após 240 min de reação e foi então diminuindo até 2880 min. A presença de β G no preparado enzimático, também gerou sinergia (DSE > 1) entre as enzimas para a produção de ARI_{Sol} .

Considerando o fato de que a cinética de degradação da celulose não apresenta um comportamento linear, juntamente com as alterações observadas para os valores de DSE ao longo da hidrólise, pode-se constatar que o modelo de WOOD e MCCRAE, (1979) para a degradação da celulose ocorre apenas nas fases iniciais da hidrólise.

TABELA 12. GRAU DE EFEITO SINÉRGICO (DSE) PARA A PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES AO LONGO DA HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO WHATMAN N° 1.

Açúcar redutor	DSE ao longo de hidrólise (t, min)					
	60	120	240	360	1440	2880
CBH-I + EG-II						
AR _{Tot}	1,31	2,06	1,99	1,65	1,29	1,70
AR _{Sol}	0,05	0,80	0,03	0,01	0,01	0,01
AR _{Insol}	2,91	1,85	1,34	1,58	0,25	0,60
CBH-I + EG-II + β G						
AR _{Tot}	1,67	1,32	1,13	1,07	0,83	1,16
AR _{Sol}	3,40	1,97	1,79	1,27	1,65	1,19
AR _{Insol}	1,01	0,99	0,17	0,64	2,65	2,33
AR β _{Sol}	1,55	0,06	4,24	3,2	1,47	0,14

Tipicamente, o perfil de composição de AR_{Sol} obtido para CBH I na hidrólise de celulose (Avicel) inclui 11-15 % de glucose, 82-89 % de celobiose e <6% de celotriose (MEDVE *et al.*, 1998), ao passo que para a EG-II este perfil é de 27,4 %, 49,1 % e 23,5% dos mesmos componentes na hidrólise de celulose microcristalina (WAHLSTRÖM *et al.*, 2012). Portanto, comparando diretamente a composição dos produtos solúveis de reação de EG-II e CBH-I, pode-se identificar a especialidade da CBH-I em liberar majoritariamente celobiose, ao passo que a EG-II apresenta aproximadamente 50 % de seu produto de reação solúvel composto por glucose e celotriose. Porém, é importante mencionar, que especialmente para a EG-II, estes produtos prevalecem apenas na fase final da hidrólise, já que no estágio inicial da hidrólise os AR_{Insol} se apresentam como os produtos majoritários (FIGURA 28). Portanto, além de confirmar que a EG-II atua liberando AR_{Sol}, os dados gerados demonstraram que esta enzima apresenta uma capacidade muito maior do que a CBH-I na produção de AR_{Insol}, que com o decorrer da hidrólise representam porção minoritária dos produtos de reação. Por outro lado, a CBH-I é considerada a celulase do *T reesei* de menor endo-atividade, porém, apesar disso, a ação desta enzima nos estágios iniciais da hidrólise foi a produção de AR_{Insol}. Outro aspecto importante constatado na FIGURA 30 e nos valores de DSE da

TABELA 12 é que a presença de EG-II em preparado enzimático contendo CBH-I promove a ação em sinergia destas enzimas, pois apesar de apresentarem comportamentos de conversão de celulose similares quando atuam individualmente,

estas apresentam especialidades diferentes que se completam quando presentes no mesmo preparado enzimático.

A fim de verificar o efeito estatístico de interação não apenas entre CBH-I e EG-II, mas também entre estas enzimas na presença de β G, foi realizada a ANOVA de seus desempenhos nas respectivas faixas lineares de ação ao longo da hidrólise de W1FP e, neste caso, os erros experimentais foram avaliadas empregando 3 blocos de dados a partir da triplicata realizada para a análise. O modelo polinomial aplicado gerou bons valores de R^2 para ARS_{Tot} , ARS_{ExG} , ARS_{EnG} e $ARS_{\beta G}$ de 0,95, 0,80, 0,91 e 0,94, respectivamente.

A FIGURA 31 apresenta os gráficos de Pareto e os efeitos estatísticos encontrados pela determinação de atividade ARS. Para ARS_{Tot} , ARS_{ExG} , ARS_{EnG} e $ARS_{\beta G}$, a quantidade de atividade β G apresentou o maior efeito estatístico. Além do efeito positivo da carga de β G (14,4), a razão CBH-I/EG-II também apresentou efeito significativo para ARS_{Tot} (-4,57), porém, negativo. No entanto, o efeito de interação entre estas variáveis foi positivo, indicando que um aumento gradual e constante na razão CBH-I/EG-II e na carga de β G leva a maiores valores de ARS_{Tot} (3,12).

Para a atividade ARS_{EnG} , além do efeito linear da carga de β G, os efeitos linear e quadrático da razão CBH-I/EG-II apresentaram valores negativos estatisticamente significativos (para um intervalo de 95% de confiança). Além disso, os efeitos de interação entre CBH-I/EG-II e β G, linear ou quadrático, também foram significativos e correspondentes a 2,61 e -2,44, respectivamente. Estes resultados indicam que o aumento linear de ambas as variáveis independentes (proporção CBH-I/EG-II e a carga de β G) contribuiu para o aumento da atividade ARS_{EnG} , ao passo que o aumento não linear da proporção CBH-I/EG-II conduziu a um efeito negativo sobre ARS_{EnG} na presença de β G. Este fato não indica que houve perda de atividade ARS_{EnG} , mas que quanto maior a razão CBH-I/EG-II, mais rapidamente o AR_{insol} é consumido pelas enzimas ExG.

Para ambas as atividades ARS_{ExG} e $ARS_{\beta G}$, o aumento da proporção CBH-I/EG-II leva a um menor desempenho de hidrólise, como pode ser visto nos seus efeitos primários de -5,63 e -6,69, respectivamente (FIGURA 31). Embora a CBH-I tenha atuado independente da EG-II na produção de oligossacarídeos (majoritariamente celobiose), alguma atividade EG-II foi necessária para alcançar maiores valores de atividade ARS. De maneira similar à ARS_{EnG} , para as atividades de ARS_{ExG} e $ARS_{\beta G}$, o efeito de interação (CBH-I/EG-II)² e a carga de β G foram negativos (-2,86 e -6,79) e, embora o efeito de interação com CBH-I/EG-II (linear) tenha apresentado valores positivos para estas atividades, este não pode ser considerado estatisticamente significativo.

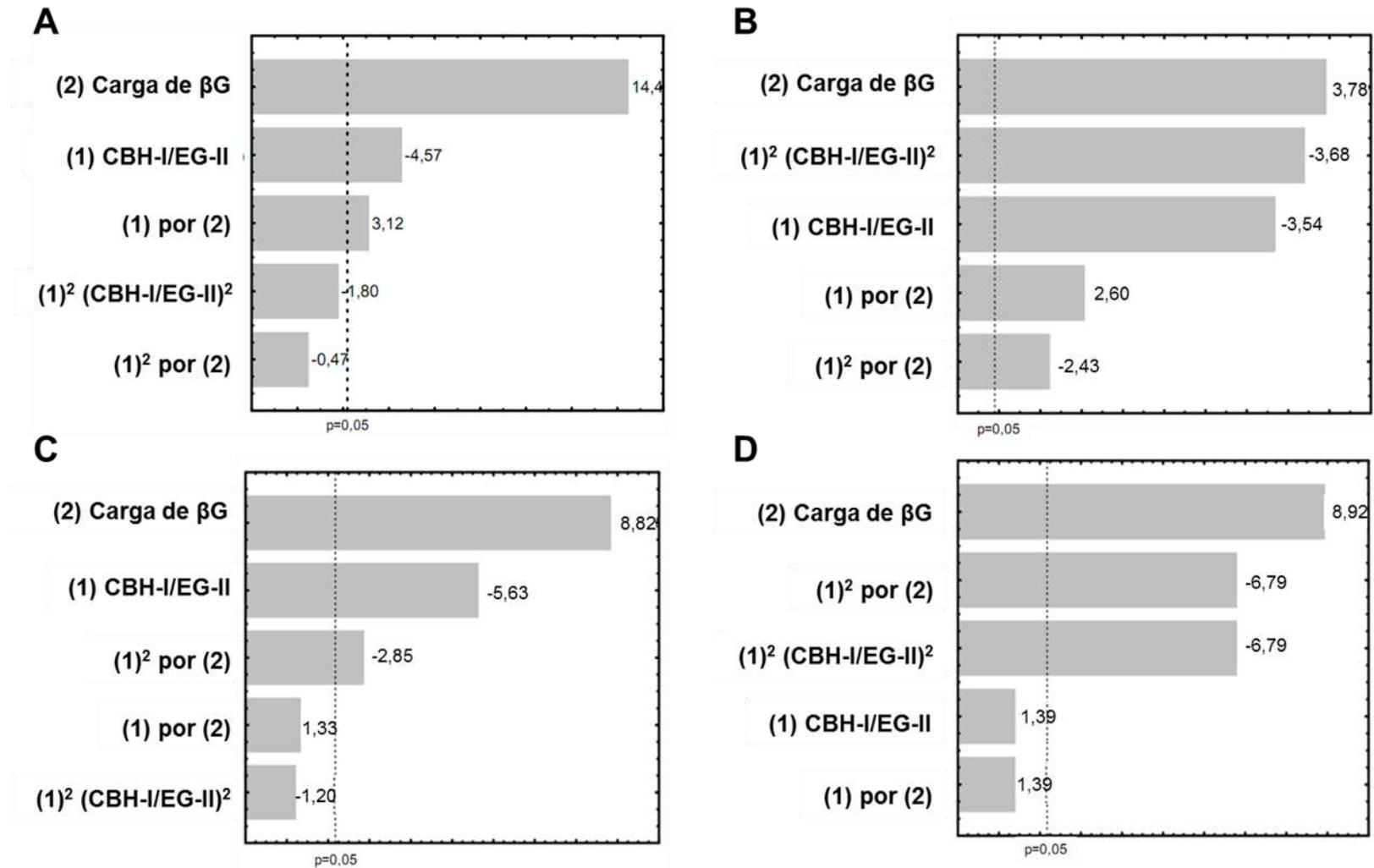


FIGURA 31. GRÁFICO DE PARETO PARA O DESIGN EXPERIMENTAL MISTO 2 A 3 NÍVEIS PARA OS VALORES DE ATIVIDADES CAPAZES DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR. A=ARS_{Tot}; B=ARS_{EnG}; C=ARS_{ExG}; D=ARS _{β G}.

5.4.3. Hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por $scCO_2/EtOH-LI$

Assim como para W1FP, a relação 50:50 entre ExG:EnG foi adotada para as misturas enzimáticas utilizadas na investigação do modo de ação e sinergia das enzimas na hidrólise dos substratos pré-tratados por $scCO_2/EtOH-LI$. Porém, com estes substratos, concentrações diferentes de proteína total foram empregadas, quando comparadas às concentrações empregadas na hidrólise de W1FP. Os perfis de conversão dos substratos pré-tratados por $scCO_2/EtOH-LI$ empregando Bmim[OAc] e Emim[OAc], expressos em g de AR por 100 g de polissacarídeos presentes no substrato, estão apresentados na FIGURA 32.

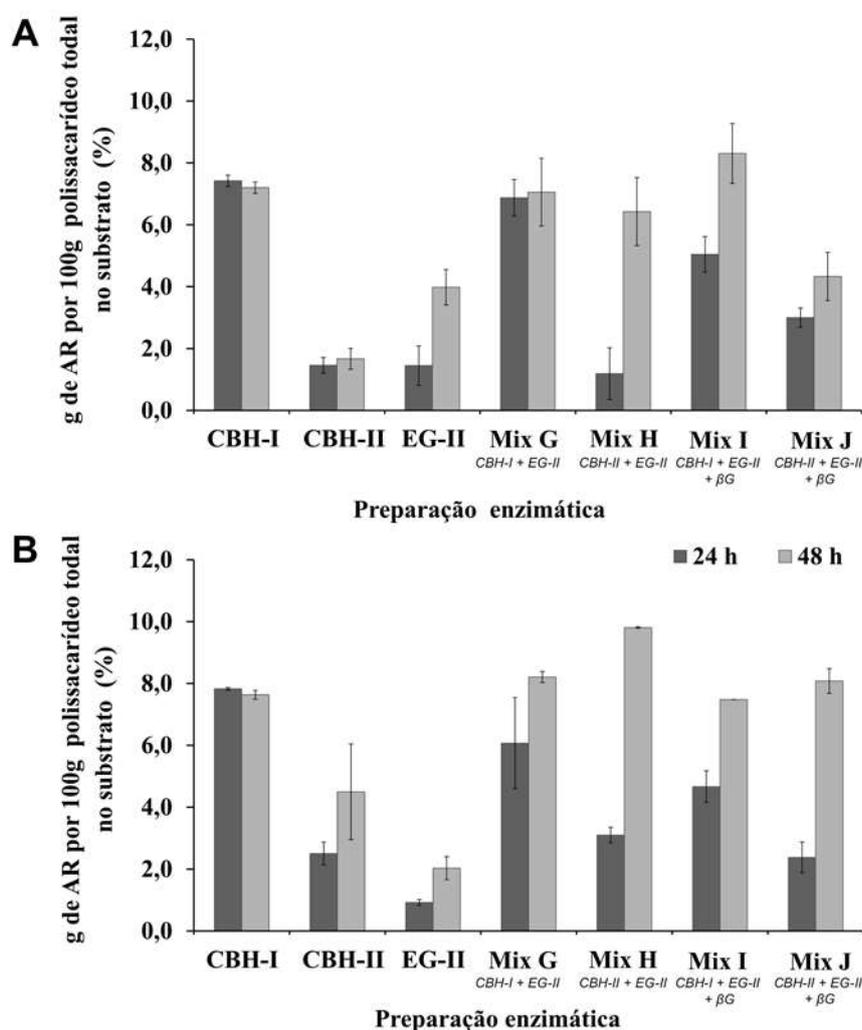


FIGURA 32. PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE POLISSACARÍDEOS NO SUBSTRATO OBTIDAS NA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR $scCO_2/EtOH-LI$ NA PRESENÇA DE Bmim[OAc] (A) E Emim[OAc] (B).

Os ensaios de hidrólise também foram realizados para o substrato obtido na presença de Bmim[Cl]; no entanto, estes não resultaram em conversões mensuráveis, possivelmente devido ao alto teor de LI ainda retido neste substrato. Por este motivo, os preparados enzimáticos não foram capazes de promover a sacarificação deste substrato, uma vez que Lis alquil imidazólicos podem inibir celulasas quando em concentrações acima de 15 % (m/v) (TURNER, *et al.*, 2003; WAHLSTRÖM *et al.*, 2012).

De acordo com a FIGURA 32, o emprego de Emim[OAc] no pré-tratamento por $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ levou a um substrato celulósico de maior acessibilidade enzimática, apresentando maiores valores de conversão para 24 e 48 h quando comparado aos valores obtidos para o substrato pré-tratado na presença de Bmim[OAc], principalmente na presença de atividade βG (Mix I e Mix J).

No que diz respeito às amostras enzimáticas purificadas, para ambos os substratos pré-tratados na presença de Bmim[OAc] e Emim[OAc], a CBH-I apresentou melhor desempenho do que a CBH-II e ambas apresentaram desempenho superior à EG-II. Por outro lado, quando as preparações de ExG (CBH-I e CBH-II) foram investigadas na presença de EnG (EG-I) para o substrato pré-tratado na presença de Bmim[OAc], o preparado Mix G apresentou desempenho muito melhor do que o preparado Mix H após 24 h de reação, porém, após 48 h de reação, os valores de conversão foram muito próximos entre si, revelando que a mistura contendo CBH-I foi melhor do que a mistura contendo CBH-II. Este comportamento foi também encontrado para o substrato pré-tratado na presença de Emim[OAc], embora o preparado Mix H tenha apresentado conversão ligeiramente maior após 48 h de reação.

Na presença de atividade βG , um comportamento muito semelhante ao encontrado para as misturas entre EnG e ExG foi observado. Em outras palavras, as conversões obtidas em 24 h demonstram que, para ambos os substratos, os preparados enzimáticos Mix G e Mix I (contendo CBH-I) foram mais eficientes que os preparados Mix H e Mix J (contendo CBH-II). No entanto, após 48 h de hidrólise, esta relação muda para o substrato pré-tratado na presença de Emim[OAc].

Com os valores obtidos para a liberação de ARs, foram realizados os cálculos de DSE (conforme descrito no item 4.6) e, diferentemente do que foi encontrado para a hidrólise de WFP1, apenas alguns valores maiores que 1 foram obtidos na presença de EnG ou de βG em amostras contendo ExG e ExG+EnG, respectivamente. Os valores de DSE para a produção de AR_{Tot} corresponderam a 1,14 e 1,50 para 48 h de hidrólise usando substratos pré-tratados com Bmim[OAc] e Emim[OAc], respectivamente, devido à presença de EG-II na amostra de CBH-II. Já para a produção de ARI_{Sol} (majoritariamente devido à atividade ExG), DSEs de 4,49 e 3,37 foram obtidos para 24 e 48 h de hidrólise, respectivamente, sendo o primeiro devido à presença de EG-II na amostra de CBH-I e o

segundo à presença de β G na mistura de CBH-II e EG-II, ambos para a hidrólise do substrato pré-tratado por Bmim[OAc]. Por outro lado, para o substrato pré-tratado por Emim[OAc], foi encontrado apenas um valor maior que 1 para o DSE na produção de AR_{Sol} , que foi de 4,76 para a presença de β G na mistura de CBH-I e EG-II. Por fim, para a produção de AR_{Insol} , apenas um ponto de DSE maior que 1 foi encontrado, de 1,89, sendo este para 48 h de hidrólise do substrato pré-tratado por Emim[OAc] devido à presença de EG-II na amostra contendo CBH-II.

5.4.4. Comparação das suscetibilidades dos substratos lignificados e deslignificados

Para a comparação da acessibilidade dos substratos pré-tratados frente à hidrólise enzimática seja com preparações enzimáticas mono- ou multi-componentes, a FIGURA 33 expressa seus valores de conversão comparados aos de W1FP após 24 h de hidrólise. Estes dados foram expressos em relação à quantidade de proteína empregada nos ensaios de hidrólise, considerando valores de proteína normalizados em $0,125 \mu\text{mol g}^{-1}$ por celulose, pois as concentrações de enzimas utilizadas foram diferentes para os estudos de sinergia empregando W1FP em relação aos que empregaram os substratos pré-tratados.

A comparação dos preparados enzimáticos em relação à liberação de equivalentes de glucose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) por unidade de concentração de proteína ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ de celulose) revelou que a CBH-I é mais efetiva do que a EG-II individualmente, seja na hidrólise de W1FP ou dos substratos pré-tratados. Por outro lado, a CBH-I foi mais efetiva na hidrólise do substrato pré-tratado na presença de Emim[OAc] do que na hidrólise daquele pré-tratado na presença de Bmim[OAc], ao passo que a EG-II apresentou comportamento inverso.

Para a hidrólise de W1FP, a presença de EG-II em amostras contendo CBH-I (preparado Mix C) aumentou em até 2,15 vezes o desempenho enzimático em relação à somatória dos desempenhos das amostras purificadas, enquanto que a presença de β G (preparado Mix F) aumentou este valor em 2,59 vezes. Tais dados representam uma nova comprovação da sinergia entre estes componentes enzimáticos, assim como já foi demonstrado neste trabalho através do cálculo dos valores de DSE discutidos anteriormente.

De maneira contrária aos dados obtidos para W1FP, a hidrólise dos substratos pré-tratados com $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ não causou aumentos e sim reduções nos valores de atividade específica aparente (AEA) das preparações enzimáticas.

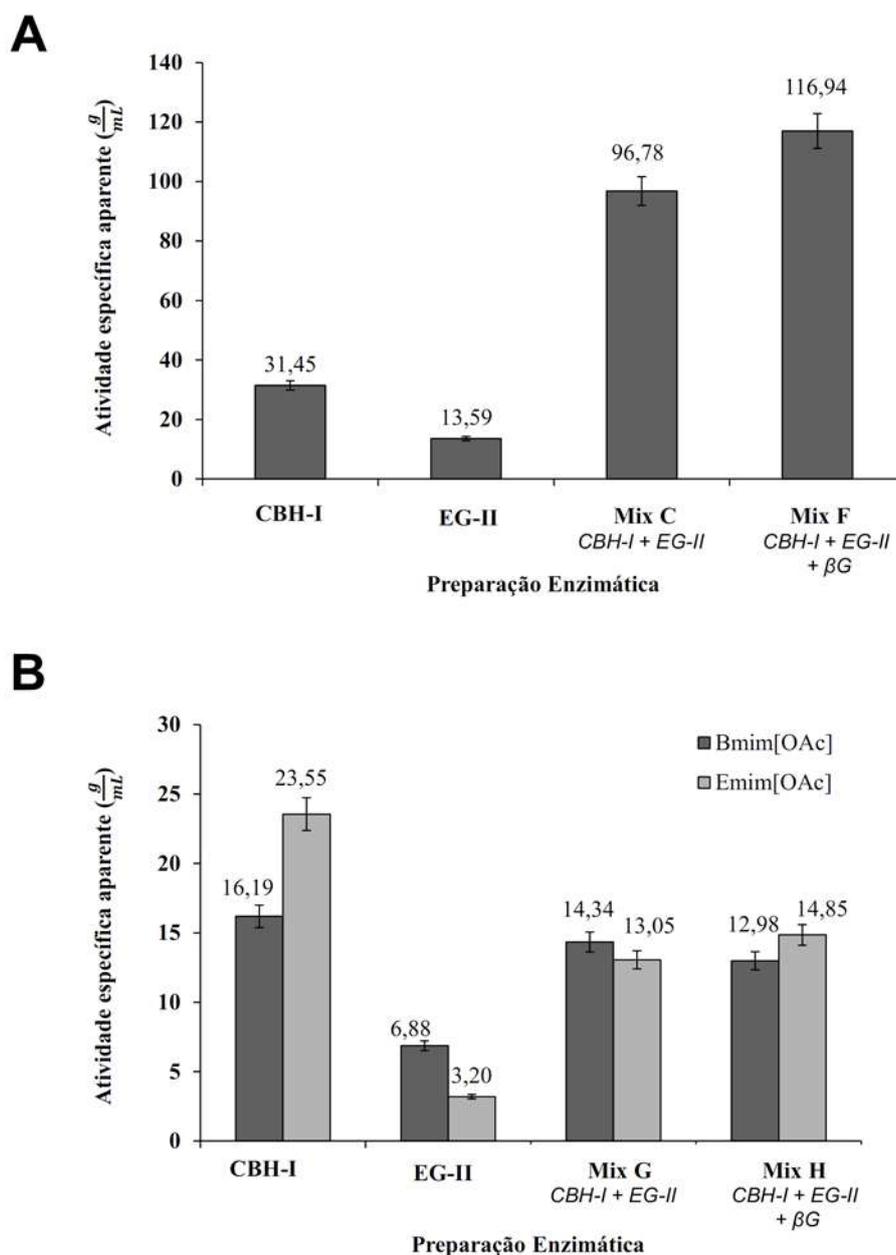


FIGURA 33. DESEMPENHO DAS ENZIMAS EM 24 h DE HIDRÓLISE, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA DE PROTEÍNA UTILIZADA NOS ENSAIOS COM PAPEL DE FILTRO WHATMAN N°1 (A) E COM OS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS (B).

Neste caso, os valores de redução para os efeitos causados pela presença de EG-II em amostras contendo CBH-I e de β G nas amostras contendo CBH-I e EG-II foram de 0,72 e 0,65 para a hidrólise dos substratos pré-tratados com Bmim[OAc] e de 0,43 e 0,45 para os pré-tratados com Emim[OAc], respectivamente. Neste caso, a atividade específica das enzimas pode ter diminuído devido à presença de lignina e hemicelulose, a primeira via inibição por adsorção não efetiva (RAHIKAINEN *et al.*, 2013) e a segunda pela eventual ocorrência de inibição competitiva (XIAO *et al.*, 2004).

Outro aspecto importante que pode ser constatado com a análise do desempenho dos preparados enzimáticos é de que a CBH-I apresentou maior eficiência do que a EG-II quando empregada individualmente. No entanto, como já mencionado, a mistura CBH-I/EG-II (Mix G) não levou a aumentos de desempenho na hidrólise dos substratos pré-tratados por $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$. Portanto, para a hidrólise de substratos deslignificados (W1FP), uma relação 50:50 entre EnG e ExG é suficiente para promover sinergia na hidrólise da celulose, ao passo que, para substratos lignificados, maiores valores na razão entre estas enzimas são requeridos, tal como observado no preparado enzimático Cellic CTec2[®], que apresenta 75% de sua atividade na forma de $\text{ARS}_{\text{Insol}}$ quando empregada para a hidrólise de W1FP.

A solução enzimática empregada (Cellic CTec2[®]) foi caracterizada quanto ao seu perfil hidrolítico de acordo com metodologia proposta no presente trabalho visando investigar seu modo de ação em relação aos ARs redutores formados ao longo do processo (FIGURA 34). Neste caso, a carga enzimática empregada nos ensaios de sacarificação enzimática foi de $1,59 \text{ ARS}_{\text{Tot}} \text{ g}^{-1}$ de substrato, sendo destes 75,29 %, 26,26 % e 1,55% atribuídos às atividades $\text{ARS}_{\text{Insol}}$, AR_{Sol} e $\text{AR}_{\beta\text{Sol}}$, respectivamente.

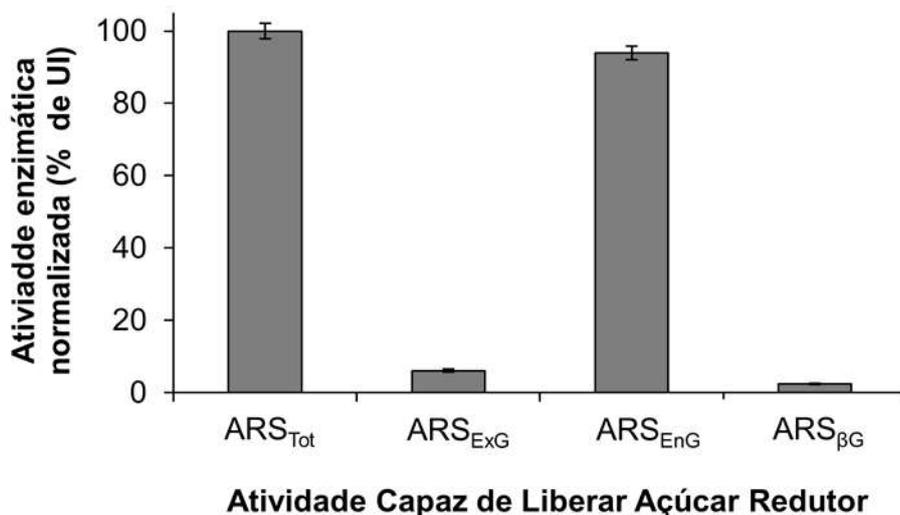


FIGURA 34. PERFIL HIDROLÍTICO DO PREPARADO Cellic CTec2[®] OBTIDO PELA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CAPAZ DE LIBERAR AÇÚCAR REDUTOR.

Recentemente, CANNELLA *et al.* (2012) demonstraram que o preparado comercial Cellic CTec2[®] apresenta a enzima GH61 em sua composição. Esta enzima atua oxidando as ligações glucosídicas da celulose formando uma terminação de ácido glucônico na cadeia, juntamente com a produção de unidades de ácido celobiônico e glucônico na fração solúvel. Uma vez que este ácido já está oxidado, não pode ser quantificado pela

reação com o ADNS, sendo assim, esta preparação enzimática apresentou menor atividade ARS do que o preparado enzimático composto por Celluclast 1.5 L FG e Novozym 188[®]. Além disso, cabe ressaltar que o ácido glucônico pode se transformar em gluconolactona, que atuam como forte inibidor de β Gs. No entanto, apesar desta inibição competitiva, a presença de enzimas oxidativas neste preparado enzimático tem um efeito de sinergia sobre os dados globais de conversão em hidrólise enzimática, quando comparado aos dados sem a presença de enzimas oxidativas (CANNELLA *et al.*, 2012).

A suscetibilidade à hidrólise dos substratos gerados no pré-tratamento $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ foi também avaliada empregando o preparado comercial Cellic CTec2[®] e a comparação dos resultados foi baseada na capacidade da enzima em liberar açúcares redutores total, solúvel e insolúvel, e o perfil em % de AR_{Tot} é apresentado na FIGURA 35. Neste caso, o material livre de extraíveis (BC_{LEE}) e substratos pré-tratados com os diferentes LIs foram submetidos ao experimento descrito no item 4.9.2 durante 2,5 h na presença de $0,01\text{g g}^{-1}$ de Cellic CTec2[®] em relação à massa de substrato seco. Os valores obtidos para a conversão enzimática em AR_{Tot} foram de $20,03 \pm 1,17\%$ para os substratos BC_{LEE} e de $48,58 \pm 0,28\%$, $52,52 \pm 1,34\%$ e $16,48 \pm 0,53\%$ para os substratos pré-tratados com Emim[OAc], Bmim[OAc] e Bmim[Cl], respectivamente. Portanto, os maiores valores de conversão enzimática foram encontrados para os substratos de maiores valores de largura de cristal e distância interfibrilar (TABELA 11).

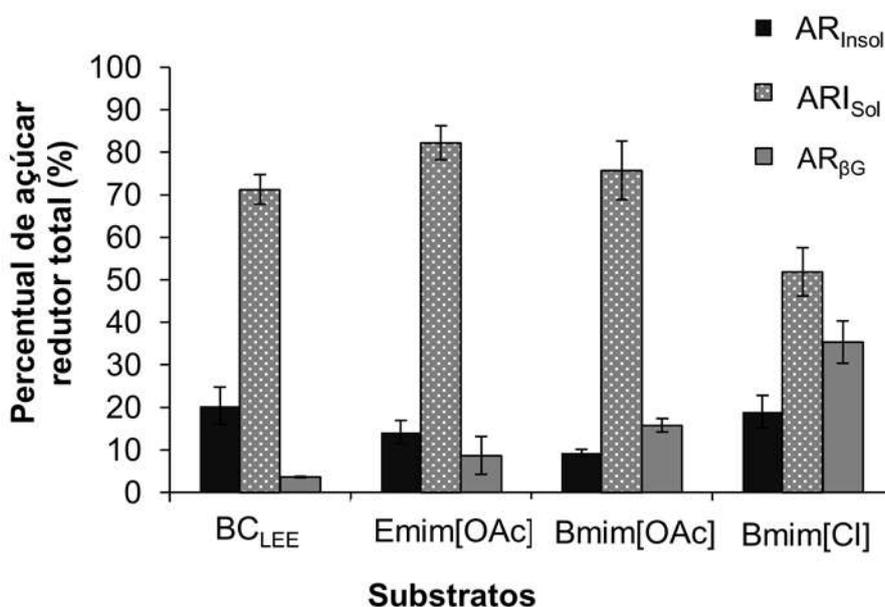


FIGURA 35. PERFIL HIDROLÍTICO DE Cellic CTec2[®] NA HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS.

Estes valores de conversão são consideravelmente altos para 2,5 h de reação, porém, são oriundos não apenas da conversão de celulose, mas também das hemicelulose presentes nos substratos. Com base nestes dados, confirma-se que os substratos pré-tratados com a tecnologia $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ foram mais suscetíveis à bioconversão quando baseada em LIs de ânion acetato. Neste caso, existem dois fatores que podem claramente levar à baixa eficiência da conversão do substrato pré-tratado com $\text{Bmim}[\text{Cl}]$, a qual foi inferior ao valor obtido para o material BC_{LEE} . O primeiro motivo seria o pouco aumento nos valores de distância interfibrilar e na largura do cristal de celulose (TABELA 11), que foram 8,6 % e 9,3 % superiores ao BC_{LEE} . Além disso, também ocorreu retenção de LI no substrato, que pode ter causado inibição das enzimas resultando em baixa conversão deste substrato.

No que diz respeito ao perfil hidrolítico de todos os substratos em relação aos açúcares redutores liberados com 2,5 h de hidrólise, os valores de ARS_{ExG} foram sempre majoritários na composição dos AR_{Tot} . Baixos valores de AR_{Insol} foram encontrados pois, com 2,5 h de reação, a conversão dos substratos foi consideravelmente alta e, conforme descrito nas FIGURAS 27 e 28, os AR_{Sol} tornam-se os componentes majoritários dos AR_{Tot} ao longo da hidrólise da celulose. Além disso, para os substratos pré-tratados, o número de AR_{Insol} no início da reação é maior do que o encontrado para o W1FP, o que tornaria as ExG mais importante do que as EnG na hidrólise destes substratos. Neste caso, enquanto para o W1FP a quantidade de AR_{Insol} inicial foi de $0,14 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, para os materiais lignocelulósicos foram de $0,93 \pm 0,09 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,86 \pm 0,31 \text{ mg mL}^{-1}$, $2,45 \pm 0,32 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,22 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os valores de ARS_{Tot} para a hidrólise dos substratos BC_{LEE} e pré-tratados com $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, $\text{Emim}[\text{OAc}]$ e $\text{Bmim}[\text{Cl}]$ foram de $1,72 \pm 0,10 \text{ UI}$, $5,42 \pm 0,14 \text{ UI}$, $5,49 \pm 0,03 \text{ UI}$ e $1,80 \pm 0,06 \text{ UI}$, respectivamente. No entanto, apesar de apresentar maior atividade ARS_{Tot} do que o substrato pré-tratado com $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, o substrato pré-tratado com $\text{Emim}[\text{OAc}]$ apresentou menor conversão, apresentando maior atividade ARS_{EnG} do que o substrato pré-tratado na presença de $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, sendo os valores de ARS_{EnG} de $0,88 \pm 0,07 \text{ UI}$ e $0,57 \pm 0,04 \text{ UI}$, respectivamente. Portanto, o fato de ter maior produção de AR_{Insol} confirma que o estágio de hidrólise está mais avançado para o substrato pré-tratado na presença de $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, indicando que este substrato foi mais suscetível do que o substrato pré-tratado na presença de $\text{Emim}[\text{OAc}]$. Uma vez que o substrato pré-tratado na presença de $\text{Emim}[\text{OAc}]$ apresentou menor quantidade de lignina e maiores valores de largura do cristal bem como distância interfibrilar, uma possibilidade que explique a menor suscetibilidade deste substrato em relação ao gerado no pré-tratamento empregando $\text{Bmim}[\text{OAc}]$, pode ser a menor recuperação mássica de LI na fração solúvel (88,23 % de $\text{Emim}[\text{OAc}]$) em relação a recuperação de $\text{Bmim}[\text{OAc}]$ (94,79 %).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Com o levantamento de dados de composição química e do potencial de sacarificação dos respectivos substratos pré-tratados, foi possível demonstrar que o aumento da severidade do pré-tratamento leva a um aumento da eficiência do processo. Estes efeitos estão relacionados à diminuição do teor de lignina no substrato (maior deslignificação), resultando num enriquecimento do teor de carboidratos na fração sólida do material após o pré-tratamento, bem como na sua maior suscetibilidade frente à hidrólise enzimática. Desta forma, a condição de melhor resultado, com base nas variáveis dependentes adotadas no processo, foi de 180 °C, 250 bar e 1:1 (m/m) de LI:substrato. No entanto, de acordo com os gráficos de Pareto, o aumento da variável temperatura pode não conduzir ao substrato ideal, uma vez que tal aumento pode causar a uma diminuição nos rendimentos de recuperação das hemiceluloses e/ou da celulose.

O emprego de diferentes cátions e ânions na estrutura do LI foi também avaliada, bem como o efeito destes no desempenho do pré-tratamento. De maneira geral, o pré-tratamento utilizando scCO₂/EtOH-LI foi mais efetivo na presença de Bmim[OAc] para a deslignificação do material, gerando um substrato menos cristalino com 71,56 % de polissacarídeos. Além disso, foi possível observar que o emprego de LIs de ânion acetato provocou aumento nos valores de largura do cristal e distância intermicrofibrilar da celulose. Como resultado do pré-tratamento, a hidrólise dos substratos pré-tratados com os diferentes LIs na presença de Cellic CTec2[®] confirmaram que os substratos pré-tratados com Emim[OAc] e Bmim[OAc] apresentaram maiores conversões enzimáticas quando hidrolisados a 3,5 % de consistência. Por outro lado, os ensaios realizados com Bmim[OAc] resultaram em maiores índices recuperação de carboidratos. Logo, a união destes fatores com o menor custo deste LI em relação ao Emim[OAc] o identifica o melhor para o pré-tratamento de bagaço de cana empregando a tecnologia scCO₂/EtOH-LI.

Sobre os ensaios de hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados com diferentes LIs, fica evidente que o emprego de Bmim[Cl] resultou na impregnação do LI na estrutura do material, levando à não conversão deste substrato nas condições empregadas provavelmente devido a fatores de inibição enzimática. Por outro lado, o emprego de Emim[OAc] no pré-tratamento scCO₂/EtOH-LI gerou um substrato mais acessível à hidrólise enzimática do que o substrato pré-tratado na presença de Bmim[OAc]. No entanto, uma vez que a diferença estrutural dos LIs de ânion acetato está no grupamento alquila na posição 1 do anel imidazólico, a solubilidade destes compostos em etanol é diretamente afetada pelo tamanho da cadeia carbônica deste radical alquila, fato que contribuiu para menor recuperação de Emim[OAc] na fração solúvel do pré-

tratamento, e, portanto, os melhores resultados obtidos na presença desde LI não compensam o custo do Emim[OAc] em relação ao do Bmim[OAc], pois a recuperação de LI é fator determinante para a viabilidade do processo.

No que diz respeito aos perfis de conversão da celulose, a CBH-I foi mais eficiente do que a CBH-II ao passo que a EG-II foi mais efetiva do que a EG-I. Além disso, sobre a ação destas enzimas em sistemas enzimáticos mono-componentes, concluí-se que a CBH-I e a EG-II do *T. reesei* atuam de maneira similar na degradação da celulose, que foi caracterizada por dois momentos principais: inicialmente, ocorre a produção de AR_{Insol} e, em seguida, ocorre a sua redução concomitantemente a um aumento de AR_{Sol} . Porém, CBH-I e EG-I possuem diferentes especialidades, sendo a CBH-I mais efetiva na produção de AR_{Sol} (solubilização da celulose) ao passo que a EG-II é mais efetiva na formação de AR_{Insol} . Apesar disso, estas enzimas apresentam a mesma magnitude de conversão final na hidrólise de papel filtro. A avaliação do modo de ação destas enzimas em amostras multi-componentes permitiu a determinação do grau do efeito de sinergia (DSE) na produção de AR_{Tot} , AR_{Sol} , AR_{Insol} e $AR_{\beta Sol}$ ao longo da hidrólise. Os valores de DSE revelaram que a sinergia entre CBH-I e EG-II afetou diretamente a produção de AR_{Insol} , sendo o aumento na taxa de produção de AR_{Insol} o principal responsável pelos efeitos no DSE para AR_{Tot} . De maneira similar ao DSE para as celulasas, a presença de βG em preparações contendo CBH-I e EG-II resultou em aumentos na produção de AR_{Sol} , de $AR_{\beta Sol}$ e de AR_{Tot} e nos respectivos valores de DSE.

Na hidrólise dos substratos pré-tratados, empregando preparados enzimáticos mono-componentes a CBH-I produziu maior quantidade de AR_{Tot} do que a CBH-II e a EG-II, sendo que esta última apresentou atividade ainda inferior a CBH-II. Já para a hidrólise dos substratos empregando preparados multi-componentes, na presença de EG-II, a CBH-I e a CBH-II apresentaram a mesma produção de AR_{Tot} na conversão de substrato pré-tratado na presença de Bmim[OAc], ao passo que para o substrato pré-tratado na presença de Emim[Cl], a mistura contendo CBH-II e EG-II foi mais efetiva na conversão do substrato após 48 h de reação. Por outro lado, na presença de celulasas e βG , a mistura contendo CBH-I apresentou maior produção de AR_{Tot} na hidrólise do substrato pré-tratado na presença de Bmim[OAc], ao passo que para o substrato pré-tratado na presença de Emim[OAc], os valores de AR_{Tot} foram similares para preparados contendo CBH-I e CBH-II, revelando que entre as exoglucanases do *T. reesei* a CBH-I foi a enzima mais importante.

Sobre os estudos de sinergia dos substratos pré-tratados, foi possível identificar que não houve valores de DSE expressivos como na hidrólise de W1FP, principalmente quando comparamos os valores de Atividade Específica Aparente (AEA). Para a hidrólise de W1FP, a presença de EG-II em preparado contendo CBH-I resultou em aumento de

AEA na ordem de 2,15 vezes e um aumento de 2,59 vezes foi encontrado devido à presença de β G em preparado enzimático contendo celulases. No entanto, na hidrólise dos substratos pré-tratados não foram identificados aumentos nos valores de AEA para as enzimas estudadas.

Por fim, a tecnologia de pré-tratamento $scCO_2$ /EtOH-LI apresentou-se interessante por promover a deslignificação do material gerando um substrato de maior acessibilidade e baixo teor de umidade. Portanto, apesar de alguns ajustes (otimização) ainda serem necessários, principalmente em relação à recuperação do LI, pode-se concluir que o processo $scCO_2$ /EtOH-LI apresenta um bom potencial para aplicação industrial, sendo que os estudos de sinergia relacionados à hidrólise enzimática da celulose ofereceram elementos para auxiliar na otimização de preparações enzimáticas especializadas em sua conversão à açúcares fermentescíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H. L.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 416-423. 2013.
- 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, 2010, p. 4851-4861.
- ALVO, P.; BELKACEMI, K. Enzymatic saccharification of milled Timothy (*Phleum pretense L.*) and alfafa (*Medicago sativa L.*). **Bioresource Technology**, v. 61, 1997, p. 185-198.
- ANDERSSON, S.; SERIMAA, R.; PAAKKARI, T.; SARANPÄÄ, P.; PESONEN E. Crystallinity of wood and the size of cellulose crystallites in Norway spruce (*Picea abies*). **Journal of Wood Science**, v. 49, 2003, p. 531-537.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, 2010, p. 1-11.
- ARAQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRIGUEZ, J.; MENDONCA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, 2008, p. 214-219.
- ARAÚJO, O. A. S.; NADIYE, P. M.; RAMOS L. P.; CORAZZA, M. L. Phase behavior measurement for the system CO₂+glycerol+ethanol at high pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, 2012, p. 41-46.
- BALAN, V.; LI, B.; YUAN, Y.; DALE, B. E. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 1285-1292.
- BERGLUND, G.I., GUALFETTI, P.J., REQUADT, C., GROSS, L.S., BERGFORS, T., SHAW, A., SALDAJENO, M., MITCHINSON, C., SANDGREN, M. The crystal structure of the catalytic domain of *Thermobifida fusca* endoglucanase Cel5A in complex with cellotetraose. **Protein Data Bank**, publicado em 2007.

- BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; NADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. N. Inhibition of cellulose xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, 2006, p. 198-209.
- BEUKES, N.; PLETSCHKE, B. I. Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy efficient hemicellulos hydrolysis in sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 5207-5213.
- BEUKES, N.; PLETSCHKE, B. I. Effect of lime pre-treatment on the synergistic hydrolysis of sugarcane bagasse by hemicellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4472-4478.
- BLAKE S.; SIMMONS, A.; VOGEL, K. P. Visualization of Biomass Solubilization and Cellulose Regeneration During Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, 2009, p. 68-75.
- BOISSET, C.; PETREQUIN, C.; CHANZY, H.; HENRISSAT, B.; SCHULEIN, M. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, 2001, p. 339-345.
- BORASTON, A.; BRAY, M.; BRUN, E.; CREAGH, A. L.; GILKES, N. R.; GUARNA, M. M.; JERVIS, E.; JOHNSON, P.; KORMOS, J.; MCINTOSH, L. The structure and function of cellulose binding Domains. In: Claeysens M, Nerinckx W, Piens K, editors. Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 1997, p.139–46.
- BREUIL, C.; CHAN, M.; GILBERT, M.; SADDLER, J. N. Influence of β -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 39, 1992, p. 139-142.
- BRUN, E., MORIAUD, F., GANS, P., BLACKLEDGE, M.J., BARRAS, F., MARION, D. Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. **Biochemistry**, v. 36, 1997, p. 16074-16086.
- BUNKER, C. E.; ROLLINS, H. W.; SUN, Y. Fundamentals Properties of Supercritical Fluids. *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties and Applications*. Cap. 1, 2002.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, 2009, p. 642-647.

- CANNELLA, D.; HSIEH, C. C.; FELBY C.; JØRGENSEN H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012, p. 1-10.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, 2009, p. 233-238.
- CAO, S.; AITA, G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, 2013, p. 357-364.
- CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 1869-1876.
- CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, 2007, p. 2415-2457.
- CASTRO, E.; MESA, L.; GONZÁLES, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F. Preliminary evaluation of organosolv pré-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design. **Applied Energy**, v. 87, 2010, p. 109-114.
- CAZACU, G.; MIHAIES, M.; PASCU, C.; PROFIRE, L.; KOWARSKIK, A. L.; VASILE, C. Polyolefin/lignosulfonate blends. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 289, 2004, p. 880–889.
- CHEN, H. Z.; SUN, F. B. Comparison of atmospheric aqueous glycerol and steam explosion pretreatments of wheat straw for enhanced enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, 2008a, p. 707-714.
- CHEN, H.; SUN, F. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008b, p. 6156-6161.
- CHEN, W. H.; TSAI, C. C.; LIN, C. F.; TSAI, P. Y.; HWANG, W. S. Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. **Bioresource Technology**, v. 128, 2013, p. 297-304.
- CHEN, X. A.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J. I.; TAKAHASHI, H.; KITAMOTO, K. Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline

Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, 2010, p. 2556-2561.

CHENG, G.; VARANASI, P.; LI, C. L.; LIU, H. B.; MENICHENKO, Y. B.; SIMMONS, B. A.; KENT, M. S., SINGH, S. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. **Biomacromolecules**, 2011, v. 12, p. 933-941.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S.; BAKER, J.; GROHMANN, K.; SARKANEN, K. V.; WALLACE, K.; SCHROEDER, H. A. Organosolv pretreatment for enzymatic-hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, 1988, p. 643-649.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BELLESIA, G.; UPPUGUNDLA, N.; SOUSA, L. D.; GAO, D. H.; CHEH, A. M.; AGARWAL, U. P.; BIANCHETTI, C. M.; PHILLIPS, G. N.; LANGAN, P.; BALAN, V.; GNANAKARAN, S.; DALE B. E. 2011. Restructuring the Crystalline Cellulose Hydrogen Bond Network Enhances Its Depolymerization Rate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, 2011, p. 11163-11174.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. β -1,4-D-Xylan-degrading enzymes systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, 1993, p. 259-289.

CUNHA, C. M.; SILVA, F. T. Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. In: 6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, v. VII, São Paulo, 2001. Proceeding, p. 221-226.

CURRELI, N.; FADDA, M. B.; RESCIGNO, A.; RINALDI, C. A.; SODDU, G.; SOLLAI, F.; VACCARGIU, S.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 32, 1997, p. 665-670.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química de materiais lignocelulósicos. Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, 2ª Ed., v. 1, 1988. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo.

DA SILVA, A. S.; LEE, S. H.; ENDO, T.; BON, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]). **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 10505-10509.

- DA SILVA, A. S.; TEIXEIRA, R. S. S.; ENDO T.; BON, E. P. S.; LEE, S. H. Continuous pretreatment of sugarcane bagasse at high loading in an ionic liquid using a twin-crew extruder. **Green Chemistry**, v. 15, 2013, p. 1991-2001.
- DADI, A. P.; VARANASI, S.; SCHALL, C. A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, 2006, p. 904-910.
- DALE, B. E.; MOREIRA, M. J. A Freeze-explosion for increasing cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 12, 1982, p. 31-43.
- DECKER, S. R.; ADNEY, W. S.; JENNINGS, E.; VINZANT, T. B.; HIMMEL, M. E. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, 2003, p. 689-703.
- DECKER, S. R.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Enzymatic Depolymerization of Plant Cell Wall Hemicelluloses, in Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy (ed M. E. Himmel), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 2009.
- DIEN, B. S.; XIMENES, E. A.; O'BRYAN, P. J.; MONIRUZZAMAN, M.; LI, X. L.; BALAN, V.; DALE, B.; COTTA, M. A. Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 5216-5225.
- DIN, N.; GILKES, N. R.; TEKANT, B.; MILLER, R. C.; WARREN, A. J.; KILBURN, D. G. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding domain of a bacterial cellulase. **Bio-Technology**, v. 9, 1991, p. 1096-1099.
- DUPONT, J. From Molten Salts to Ionic Liquids: A "Nano" Journey. **Accounts of Chemical Research**, v.44, 2011, p. 1223-1231.
- EIJSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G.; VARUM, K. M.; HORN, S. J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends in Biotechnology**, v. 26, 2008, p. 228-235.
- EKWE, E.; MORGENSTERN, I.; TSANG, A.; STORMS, R.; POWLOWSKI, J. Non-hydrolytic cellulose active proteins research progress and potential application in biorefineries. **Industrial Biotechnology**, v. 9, 2013, p. 123-131.

- ELSHAFEI, A. M.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E. C.; GADDY, J. L. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Bioresource Technology**, v. 35, 1991, p. 73-80.
- EMMEL, A.; RAMOS, L. P.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, 2003, p. 105-115.
- EVANS, B. R.; MARGALIT, R.; WOODWARD, J. Enhanced hydrolysis of soluble cellulosic substrates by a metallocellulase with veratryl alcohol-oxidase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51/52, 1995, p. 225-239.
- FENG, L.; CHEN, Z. I. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 142, 2008, p. 1-5.
- FENGEL, D.; WEGENER G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T.; ENGLAND, G.; KELLEY, A.; MEERMAN, H.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H.; TEUNISSEN, P.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, 2003, p. 31988-31997.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74, 2006, p.78-88.
- GAO, D.; CHUNDAWAT, S. P. S.; KRISHNAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 2770-2781. (a)
- GAO, M.; XU, F.; LI, S.; JI, X.; CHEN, S.; ZHANG, D. Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, 2010, p. 470-475. (b)
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, 1987, p. 257-268.

- GHOSH, B.; MAITI, S.; DEY, S.; PURAKAYASTHA S. Physical and thermochemical characterization of rice husk char as a potential biomass energy source. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, p-2065-2070.
- GONÇALVES, A. R.; SAAD, M. B. W.; OLIVEIRA, L. R. M.; CÂNDIDO, R. G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G. J. M. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, 2008, p. 220-225.
- GOSSETT, J. M.; STUCKEY, D. C.; OWEN, W. F.; MCCARTY, P. L. Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. **Journal of the Environmental Engineering Division**, v. 108, 1982, p. 437-454.
- GUPTA, R.; LEE, Y. Y. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, 2009, p. 1570-1581.
- HARRIS, P. V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K. C.; RE, E.; POULSEN, J. C. N.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H. S.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LEGGIO, L. L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, 2010, p. 3305-3316.
- HATANO, K.; AOYAGI, N.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M.; KUBOTA, K. Evaluation of nonionic adsorbent resins for removal of inhibitory compounds from corncob hydrolysate for ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 149, 2013, p. 541-545.
- HELBERT, W.; CHANZY, H.; HUSUM, T. L.; SCHULEIN, M.; ERNST, S. Fluorescent cellulose microfibrils as substrate for the detection of cellulase activity. **Biomacromolecules**, v. 4, 2003, p. 481-487.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 10-18.
- HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHULEIN, M. synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio-Technology**, v. 3, 1985, p. 722-726.
- HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls; In lignin biodégradation: Microbiology, chemistry and potential applications, v. I.CRC Press, Inc., Kirk, T.K., Higuchi, T. et Chang, H.-M. (Eds), 1985, 237 pages.

- HILDEN, L.; ENG, L.; JOHANSSON, G.; LINDQVIST, S. E.; PETTERSSON, G. An amperometric cellobiose dehydrogenase-based biosensor can be used for measurement of cellulase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 290, 2001, p. 245-250.
- HIMMEL, M. E.; VIZANT, T. B.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; KINTER, M. T.; SHERMAN, N. E.; FOX, J. W. Fingerprint *Thichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, 2001, p. 99-109.
- HOLTZAPPLE, M. T.; KAAR, W. E. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, 2000, p. 189-199.
- HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4907-4913.
- HU, G.; HEITMANN, J. A.; ROJAS, O. J. quantification of cellulase activity using the quartz crystal microbalance technique. **Analytical Chemistry**, v. 81, 2009, p. 1872-1880.
- INGRAM, L. O.; GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAN, K. T. Optimizing the saccharification of the sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 1851-1857.
- INOUE, H.; HIDENO, A.; TSUKAHARA, K.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of Rice straw. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 2706-2711.
- IRWIN, D. C.; SPEZIO, M.; WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Activity studies of 8 purified cellulases - specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, 1993, p. 1002-1013.
- JÄGER, G.; GIRFOGLIO, M.; DOLLO, F.; RINALDI, R.; BONGARD, H.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; SPIESS, A. C.; BUCHS, J. How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011, p. 1-16.

- KIM, H. K.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocelluloses enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, 2001, p. 139-144.
- KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, p. 778-785.
- KIM, Y.; HENDRICKSON, R.; MOSIER, N. S.; LADISH, M. R.; BALS, B.; BALAN, V.; DALE, B. E. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distiller's grains at high-solids loadings. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 5206-5215.
- KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An Optimized Microplate Assay System for Quantitative Evaluation of Plant Cell Wall-Degrading Enzyme Activity of Fungal Culture Extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, 2009, p.1033-1044.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **ChemInform**, v. 36, 2005, p. 36.
- KÖLL, P.; BORCHERS, G.; METZGER, J. O. Thermal degradation of chitin and cellulose. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 19, 1991, p. 119-129.
- KOOSTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOOT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, 2009, p. 126-131.
- KUMAR S.; GUPTA R.; LEE Y. Y.; GUPTA R. B. Cellulose treatment at subcritical water: effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity. **Bioresource Technology**, v. 101, 2003, p. 1337-1347.
- KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocelulósic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, 2009, p. 3713-3729.
- LANGAN, P.; NISHIYAMA, Y.; CHANZY, H. A revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, 1999, p. 9940-9946.
- LAWTHER, J. M.; SUN, R.; BANKS, W. B. Effect of steams treatment on the chemical composition of wheat straw. **Holzforschung**, v. 50, 1996, p. 365-371.

- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v, 56, 1997, p. 1-24.
- LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic Liquid-Mediated Selective Extraction of Lignin From Wood Leading to Enhanced Enzymatic Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, 2009, p. 1368–1376.
- LI, B.; BALAN, V.; YUAN, Y.; DALE, B. E. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 1285-1292.(a).
- LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGELC, K. P.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4900-4906.
(b)
- LI, J.; ZHOU, P.; LIU, H.; XIONG, C.; LIN, J.; XIAO, W.; GONG, Y.; LIU, Z. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 155, 2014, p. 258-265;
- LI, L.; KIRAN, E. Interaction of supercritical fluids with lignocellulosic materials. **Industrials and Engineering Chemistry Research**, v. 27, 1988, p. 1301.
- LI, Q.; JIANG, X. L.; HE, Y.C.; LI, L. Z.; XIAN, M.; YANG, J. M. Evaluation of the biocompatible ionic liquid 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphite pretreatment of corn cob for improved saccharification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, 2010, p. 117-126. (c)
- LI, X.; ZHENG, M.; LI, L.; YANG, X.; HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 5140-5145.
- LUND, M.; HASSINGBOE, J.; FELBY, C. Oxidoreductase catalyzed bonding of wood fibers. In: Proceedings of the 6th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Bordeaux, France, 2000, p. 113–116.
- LUTERBACHER, J. S.; TESTER, J. W.; WALKER, L. P. Two-temperature stage biphasic CO₂-H₂O pretreatment of lignocellulosic biomass at high solid loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, 2012, p. 1499-1507.

- LYND, L. R.; LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J. J. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, 2002, p. 33-44.
- MARJAMAA, K.; TOTH, K.; BROMANN, P. A.; SZAKACS, G.; KRUIUS, K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, 2013, p. 358 – 369.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2007, p. 426-432.
- MARTÍN, R. S.; AGUILERA, J. M. Steam pretreatment and enzymatic production of D-glucose from *Eucalyptus globulus*. **Biomass**, v. 15, 1988, p. 281-289.
- MARTIN, R. S.; PEREZ, C.; BRIONES, R. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 53, 1995, p. 217-223.
- MATTHEWS, J. F.; SKOPEC, C. E.; MASON, P. E.; ZUCCATO, P.; TORGET, P. W.; SUGIYAMA, J.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . **Carbohydrate Research**, v. 341, 2006, p. 138-152.
- MAZZER, H. R.; SANTOS, J. C. O.; CABRAL, V. C.; DARIVA, C.; KUNITA, M.; RUBIRA, A. F.; AZNAR, M.; CARDOZO-FILHO, L. Phase Behavior at High Pressure of the Ternary System: CO₂, Ionic Liquid and Disperse Dye. **Journal of Thermodynamics**, v. 2012, 2012, p. 1-7.
- MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J. D. B.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, 1993, p. 1-20.
- MCINTOSH, S.; VANCOV, T.; PALMER, J.; SPAIN, M. Ethanol production from *Eucalyptus* plantation thinnings. **Bioresource Technology**, v. 110, 2012, p. 264-272.
- MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, 1998, p. 621-634.

- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, 1959, p. 426-428.
- MILLET, M. A.; BAKER, A. J.; SCATTER, L. D. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. 1976, v. 6, 125–153.
- MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic hydrolysis in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, 2010, p.295-314.
- MONIRUZZAMAN, M.; ONO, T. Separation and characterization of cellulose fibers from cypress wood treated with ionic liquid prior to laccase treatment. **Bioresource Technology**, v. 127, 2013, p. 132-137.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte II – Caracterização da lignina de madeira moída. **Sociedade de Investigações Florestais, Revista Árvore**, v. 29, 2005, p.461-470.
- MORAÏS, S.; BARAK, Y.; CASPI, J.; HADAR, Y.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; WILSON, D. B.; BAYER, E. A. Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. **mBIO**, v. 1, 2010, p. 1-8.
- MOSIER, N.; LADISH, M.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 673-686.
- MUTHUKUMAR, K.; VELMURUGAN, R. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: Sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 7119-7123.
- NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J.; GU, T. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 6995-7000.
- NGUYEN, Q. A.; DIKOW, J. H.; DUFF, B. W.; FARMER, J. D.; GLASSNER, D. A.; IBSEN, K. N.; RUTH, M. F.; SCHELL, D. J.; THOMPSON, I. B.; TUCKER, M. P. NREL/DOE ethanol pilot plants: current status and capabilities. **Bioresource Technology**, v. 58, 1996, p. 189-196.

- NGUYEN, T. A. D.; KIM, K. R.; HAN, S. J.; CHO, H. Y.; KIM, J. W.; PARK, S. M.; PARK, J. C.; SIM, S. J. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 7432-7438.
- NISHIYAMA, Y.; SUGIYAMA, J.; CHANZY, H.; LANGAN, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I_α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, 2003, p. 14300-14306.
- NISHIYAMA, Y.; SUGIYAMA, J.; CHANZY, H.; LANGAN, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I_β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, 2002, p. 9074-9082.
- NOVOZYMES. **Product benefits of Cellic® CTec2**. Disponível em: <<http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec2/product-description/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 05 Jun. 2011.
- O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, 1997, p. 173-207.
- OLSSON, L. J.; JÖRGENSEN, H. K.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol production from lignocellulosic material. In: Dimitriu, S. (Ed.), *Polyssaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. Marcel Dekker, New York, 2005, p. 957-993.
- PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, 2004, p. 65–72.
- PARK, N.; KIM, H. Y.; KOO, B. W.; YEO, H.; CHOI, I. G. Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 7046-7053.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, 2005, p. 125-131.
- PÉREZ, J. A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; SAEZ, F.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. **Fuel**, v. 87, 2008, p. 3640-3647.

- PÉREZ, S.; MAZEAU, K. Conformation, Structures, and Morphologies of Cellulose. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Cap 2, 2005, p. 41-68.
- PHILLIPS, C. M.; IAVARONE, A. T.; MARLETTA, M. A. Quantitative Proteomic Approach for Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, 2011, p. 4177–4185.
- POPA, V. I.; SPIRIDON, I. Hemicellulose: Structure and Properties. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Cap 18, 2005, p. 475-489.
- POROD, G. General theory. In Small Angle X-ray Scattering, Glatter, O., Kratky, O., Eds., **Academic Press: London**, 1982.
- QIN, L., PEREIRA, J.H., MCANDREW, R.P., SIMMONS, B.A., SAPRA, R., ADAMS, P.D., SALE, K.L. Crystal structure of Cel7A from *Talaromyces emersonii* in complex with cellotetraose. **Protein Data Bank**, publicado em 2010.
- QUI, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, 2012, p. 251-256.
- QUINLAN, R.J., SWEENEY, M.D., LO LEGGIO, L., OTTEN, H., POULSEN, J.C.N., JOHANSEN, K.S., KROGH, K.B.R.M., JORGENSEN, C.I., TOVBORG, M., ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C. P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, 2011, p. 15079-15084.
- RABELO, S. C.; AMEZQUITA, F. N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, 2011, p. 2600-2607.
- RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, 2002, p. 850-871.
- RAHIKAINEN, J. L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O. J.; KRUIUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource Technology**, v. 133, 2013, p. 270-278.

- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, 2003, p. 863-871.
- RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45/46, 1994, p. 193-207.
- RAMSURN, H.; GUPTA R. B. Production of biocrude from biomass by acidic subcritical water followed by alkaline supercritical water two-step liquefaction. **Energy & Fuels**, v. 26, 2012, p. 2365-2375.
- SADDLER, J. N.; CHANDREA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X. Substrate Pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosic?. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Biofuels*. v. 108, 2007, p. 67-93.
- SADDLER, J. N.; GREGG, D. J. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzymatic recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, 1996, p. 375-383.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, 2005, p. 3693-3700.
- SAMEJIMA, M.; SUGIYAMA, J.; IGARASHI, K.; ERIKSSON K. E. L. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Carbohydrate Research**, 1997, v. 305, p. 281-288.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, 2009, p. 185-194.
- SCHMIDT, A. S.; THOMSEN, A. B. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 64, 1998, p. 139-151.
- SELIG, M. J.; KNOSHAUG, E. P.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; DECKER, S. R. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 4997-5005.
- SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHINN, M.; HOWELL, N. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, 2009, p. 88-96.

- SHEVCHENKO, S. M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion enzymatic hydrolysis of softwood - Structural features and possible uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, 1999, p. 867-876.
- SHI, J.; CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 6556-6564.
- SHILL, K.; PADMANABHAN, S.; XIN, Q.; PRAUSNITZ, J. M.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: Enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, 2010, p. 511–520.
- SIHVONEN, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies, Trends in Food Science & Technology, Cap. 10 1999, p. 217–222.
- SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; ANDREAUS, J. Influence of mechanical agitation on the pH profile of total, soluble and insoluble filter paper activity of *Hypocrea jecorina* cellulase preparations. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, 2012, p. 63-70.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUIUS, K.; GARRIDA, L. M.; RAMOS, L. P. **The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges**. In: *Biofuels in Brazil*. Da Silva, S. S.; Chandel, A. K. Springer International Publishing Switzerland, 2014, p. 151-172.
- SIMIONESCU, C. I.; RUSAN, V.; MACOVEANU, M. M.; CAZACU, G.; LIPSA, R.; VASILE, C.; STOLERIU, A.; IOANID, A. Lignin/epoxy composites. **Composites Science and Technology**, v. 48, 1993, p. 317–323.
- SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 2003, p. 3-16.
- SIPOS, B.; BENKÖ, Z.; DIENES, D.; RÉCZEY, K.; VIKARI, L.; SIIKA-AHO, M. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, 2010, p. 347-364.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.(a)

- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, 2011.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42619. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.(b)
- SMITH, S. M.; DEMESSIE, E. S.; MORREL, J. J.; LEVIEN, K. L. Supercritical-fluid (SCF) treatment: its effect on bending strength and stiffness of ponderosa pine sapwood. **Wood Fiber Science**, v. 25, 1993, p. 119-123.
- SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, 2012, p. 564-579.
- SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. **Macromolecules**, v. 24, 1991, p. 6816-6822.
- SUN, R.; WANG, K.; JIANG, J.; XU, F. Influence of steaming explosion time on the physical-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*Lespedera crytobotrya*). **Bioresouce Technology**, v. 100, 2009, p. 5288-5294.
- SUN, Y. Enzymatic hydrolysis of rye straw Bermudgrass for ethanol production; Phd. Thesis. Biological and Agricultural Engineering. North Carolina State University, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, 1997, p. 39-67.
- SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. **Journal of the American chemical Society**, v. 124, 2002, p. 4974-4975.
- TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy & Environmental Science**, v. 4, 2011, p. 3913-3929.

- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, 2008, p. 1621-1651.
- TAN, H. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimisation study using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, 2011, p. 1862-1868.
- TEERI T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **TibTech**, v. 15, 1997, p. 160-167.
- TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Optimizing paraacetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**, v. 16, 1999, p. 1070-1073.
- TERAMOTO, Y.; LEE, S. H.; ENDO, T. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 8856-8863.
- TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, 2013, p. 1-13.
- TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, v. 133, 2013, p. 332-339.
- TURNER, M. B.; SPEAR, S. K.; HUDDLESTON, J. G.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. **Green Chemistry**, v. 5, 2003, p. 443-447.
- TURUNEN, M.; ALVILA, L.; PAKKANEN, T. T.; RAINIO, J. Modification of phenol-formaldehyde resol resins by lignin, starch, and urea. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, 2003, p. 582-588.
- VAAJE-KOLSTAD, G.; HORN, S. J.; VAN AALTEN, D. M. F.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V. G. H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, 2005, p. 28492-28497.

- VALJAMÄE, P.; SILD, V.; NUTT, A., PETTERSSON G., JOHANSSON, G. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, 1999, p. 327-334.
- VAN TILBEURGH, H.; BHIKHABHAI, R.; PETTERSSON G. L.; CLAEYSSENS, M. Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity chromatography method. **FEBS Letters**, v. 169, 1984, p. 215–218.
- VÁRNAI, A.; HUIKKO, L.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 9096-9104.
- VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited. Reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013, p. 1-11.
- VÁZQUEZ, M.; RODRÍGUES-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, 2004, p. 143-152.
- VLASENKO, E.; SCHÜLEIN, M.; CHERRY, J.; XU, F. 2010. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, 2011, p. 2405–2411.
- VOUTILAINEN, S.; PURANEN, T.; SIIKA-AHO, M.; LAPPALAINEN, A.; ALAPURANEN, M.; KALLIO, J.; HOOMAN, S.; VIIKARI, L.; VEHEMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Cloning, expression, and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, 2008, p. 515-528.
- WADA, M.; KONDO, T.; ITOH, T. Thermally Induced Crystal Transformation from Cellulose I_α to I_β. **Polymer Journal**, v. 35, 2003, p. 155-159.
- WAHLSTRÖM, R.; ROVIO, S.; SUURNÄKKI, A. Partial enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in ionic liquids by *Trichoderma reesei* endoglucanases. **RSC Advances**, v. 2, 2012, p. 4472-4480.
- WAYMAN, W.; PAREKH, S. Biotechnology of Biomass Conversion: Fuels and chemicals from renewable source. Open University Press, UK. In: biotechnology Series. v. 30, 1990, p. 40-71.

- WOOD, T. M.; MCGRAE, S. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. In: Ross D. Brown Jr. LJ, editor. **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis**, 1979, p 181-209.
- WYMAN, C. E. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor Francis, Washington. 1996. P. 47.
- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, 2004, p. 1115-1126.
- YU, Z.; YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rive hull. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 903-908.
- ZACCHI, G.; EKLUND, R.; GALBE, M. The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 52, 1995, p. 225-229.
- ZACCHI, G.; GALBE, M. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 108, 2007, p. 41-65.
- ZACCHI, G.; ÖHGREN, K.; BURA, R.; LESNICKI, G.; SADDLER, J. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, 2007, p. 834-839.
- ZHANG, L.; LI, D.; WANG, L.; WANG, T.; ZHANG, L.; CHEN, D. X.; MAO, Z. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 8512-8515.
- ZHANG, X.; GUO, G.; YU, H.; YAN, K.; XU, C. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 5170-5175.
- ZHAO, X. B.; CHENG, K. K.; LIU, D. H. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, 2009, p. 815-827.