JOICE JAQUELINE KASCHUK

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Frollini

SÃO CARLOS

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Kaschuk, Joice Jaqueline

Hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal. / Joice Jaqueline Kaschuk.
- São Carlos, 2014.
170 f.

Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Carlos, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Frollini

1. Hidrólise enzimática. 2. Sisal. 3. Etanol. 4. Açúcares fermentescíveis. 5. Biomassa. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.”

Johann Joachim Becher, *Physica Subterranea* (1667)

Dedico àqueles que sempre estiveram ao meu lado desde os primeiros momentos da minha vida, àqueles que nunca mediram esforços para me auxiliar, sempre me apoiando em todas as minhas derrotas e comemorando comigo as minhas conquistas.

Dedico aos meus pais **José e Luci**, os grandes amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por ter iluminado todo o meu caminho durante a realização deste sonho, por me conceder o privilégio de trabalhar em algo que eu amo e manter-me sempre amparada, me carregando no colo nos momentos difíceis desta caminhada

Aos meus pais **José** e **Luci** por me ensinarem o valor existente nas pequenas coisas da vida e que nunca me deixaram desamparada me dando, acima de tudo, o seu amor incondicional. Aos meus sobrinhos **Valentin** e **Jéssica** e principalmente a **Isa (Eloísa)** e ao **Teteu (Matheus)** que mesmo longe, me fizeram dar vários sorrisos. Aos meus irmãos (**Glaciela, Andréia e Adir**) que mesmo com todas as nossas diferenças e desavenças sempre pude contar. Enfim, a toda minha família que sempre acreditou em mim.

Em especial, agradeço a duas pessoas, **Álvaro Fontana** e **Sandra Regina de Moraes**, que durante toda a minha graduação sempre acreditaram e sempre me deram incentivo e força para chegar aonde cheguei.

Agradeço também, as pessoas que durante minhas horas vagas em São Carlos deixaram a minha vida mais leve. Àquelas que me fizeram sentir as melhores sensações e que estiveram ali pra amenizar as piores. **Aldinéia, Aline, Amanara, Amanda, Ana Elisa Ana Maria, Anderson, Daniele, Daniella, Danielli, Diêgo, Emmanuella, Fabiana, Fernanda, Gláucio, Lilian, Marcello, Mayara, Natália, Pedro, Régis, Sérgio, Suzy, Tonimar, Virgínia e Vivian**; obrigada pelos momentos maravilhosos. Também agradeço aos amigos de graduação que mesmo com toda a distância sempre estiveram ali para o que precisar. **Anne, Carla, Isaac, Isaaquinho, Larissa, Rafael e Oilson**, obrigada, principalmente, por todas as piadas, risadas e momentos de confraternização.

Aos meus colegas/amigos do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas, e do Grupo de Físico-química Orgânica: **Anderson, Andrea, Bruna, Bruno, Cristina, Daiana, Daniele, Daniella, Danilo, Érica, Fernando, Lilian, Rachel, Roberta e Tonimar** (espero não

ter esquecido ninguém) pela divisão de bancadas, estufas, vidrarias, cafés, comidas, conversas, risadas e alegrias, que tornaram esses dois anos e meio mais agradáveis.

Aos meus amigos/irmãos do **Grupo de Oração Universitária (GOU)** e toda a comunidade **Ministério Universidades Renovadas (MUR)**, pelos momentos de partilha e orações, que foram fundamentais para eu arrancar forças de onde eu achava que já não existia, e me fazer conseguir continuar correndo atrás dos meus sonhos.

À **Profa. Dra. Elisabete Frollini**, por todos os ensinamentos dados em sua orientação durante estes anos de mestrado. Pela sua confiança e credibilidade na minha capacidade. Muito obrigada.

Ao **Prof. André Meleiro Porto (IQSC-USP)** e seu aluno **Darlisson Alexandria**, que por meio de sua colaboração ajudaram a concluir este trabalho. Ao **Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (DEQ-UFSCar)** por ceder o equipamento de HPLC e sua aluna **Mayerlenis Jimenez Rojas** que me auxiliou nas respectivas análises. À **Prof. Fernanda Canduri (IQSC-USP)** por me auxiliar na técnica de eletroforese.

Aos técnicos do Grupo de Físico-Química Orgânica, **Márcia Dib Zambon** pela sua ajuda nas análises de cromatografia e **Luís Antônio Ramos** pela ajuda nos imprevistos laboratoriais. Aos técnicos **José Augusto Lopes da Rocha (IFSC -USP)** pela eficiência na obtenção dos dados de raios X, e **Márcio de Paula (IQSC-USP)** pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Por fim, quero expressar aqui, o meu agradecimento à **Universidade de São Paulo** e ao **Instituto de Química de São Carlos** que se tornaram a minha segunda casa durante esses anos, e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2012/21576-5).

RESUMO

KASCHUK, J. J. **Hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal**. 2014. 170f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O foco deste estudo correspondeu a hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal previamente mercerizada (20g de polpa.L⁻¹, solução aquosa de NaOH 20%) via agitação mecânica (50°C,3h, M-AgMec-50°) e ultrassom (25°C,1h) a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude. As polpas mercerizadas apresentaram as seguinte propriedades: M-AgMec-50° 97,4% de α -celulose, cristalinidade (Ic) de 68% e massa molar média viscosimétrica (MMvis) de 94618,0g.mol⁻¹, M-US-20% 95% de α -celulose, Ic de 68% e MMvis de 87581,6g.mol⁻¹, M-US-40% 91,2% de α -celulose, Ic de 66% e MMvis de 81786,9g.mol⁻¹. As reações de hidrólise (48h) foram realizadas utilizando enzimas *celulase* comercial (Accellerase 1500) e enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Aliquotas constituídas por polpas não reagidas e licor foram retiradas do meio durante a reação. As polpas não reagidas foram caracterizadas em relação a Ic, MMvis, comprimento e espessura e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os licores foram avaliados pelo método Miller (DNS) e cromatografia líquida de alta eficiência(CLAE). Na hidrólise da polpa celulósica de sisal M-AgMec-50°, variou-se a quantidade de enzimas utilizadas (0,5 (HE-SAG-0,5); 0,7 (HE-SAG-0,7) e 0,9 (HE-SAG-0,9) mL de complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica). O maior rendimento de glicose (98%), obtido via CLAE, correspondeu a HE-SAG-0,9, sendo esta proporção de enzimas utilizada para as reações usando as polpas M-US-20% (HE-SU20-0,9), M-US-40%(HE-SU40-0,9). Dentre todas as polpas consideradas, o melhor rendimento de glicose foi para HE-SAG-0,9 pois, a presença de maior quantidade de hemiceluloses nas polpas celulósicas tratadas via ultrassom (HE-SU20-0,9 HE-SU40-0,9) prejudicou o acesso das enzimas às cadeias de celulose. As análises das polpas não reagidas mostraram que as enzimas *celulases* no geral agiram primeiramente na região não cristalina. Comportamentos variados foram observados com relação a Ic e MMvis, dependendo do intervalo de tempo transcorrido durante a reação. Considerando o pico de maior densidade de comprimento para as fibras de HE-SAG-0,5; HE-SAG-0,7 e HE-SAG-0,9, a variação durante a reação foi de [129-215] μ m para [77-129] μ m. As fibras de comprimentos superiores a [359-599] μ m passaram a ser menores, aumentando a concentração de fibras com comprimentos menor que 359 μ m no meio. Para HE-SAG-0,5; HE-SAG-0,7; HE-SAG-0,9 o pico de maior densidade para a espessura variou de [28-39] para [11-23] μ m, e para HE-SU20-0,9 e HE-SU40-0,9 este variou de [18-30] μ m para [14-18] μ m. O conjunto de resultados indicou que as enzimas agiram principalmente a partir das superfícies das fibras. As reações utilizando as enzimas *celulases* comercial e obtidas a partir do fungo *Aspergillus* foram realizadas utilizando outros substratos, além de M-AgMec-50° (HE-SAG-0,5; H-*Aspergillus*-SAG-1,5), ou seja, celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5; H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5; H-*Aspergillus*-PFT-1,5). Dos três substratos utilizados, o papel filtro apresentou maior quantidade de hemiceluloses, e por isto, para as duas enzimas, observou-se para esta amostra o maior teor de açúcar redutor (DNS). A enzima fúngica, para todos os substratos, produziu um teor de açúcar muito menor que o obtido usando enzima comercial. As enzimas foram avaliadas via eletroforese de proteínas, sendo que para as enzimas fúngicas, foram observadas bandas de endoglucanases e exoglucanases, confirmando que durante o crescimento do fungo houve a formação das enzimas *celulases*. No entanto, as respectivas

bandas das *celulases* comerciais mostraram que estas enzimas estão presentes em concentração consideravelmente maior, comparativamente as obtidas a partir do fungo *Aspergillus sp.* Ao comparar os resultados de Ic, MMvis, comprimento e espessura para todas as polpas não reagidas, usando as enzimas comercial e fúngica, observou-se que as enzimas fúngicas, nas condições consideradas no presente estudo atuaram de forma significativamente menos intensa que a comercial. Os estudos envolvendo as enzimas fúngicas requisitam aprofundamento. Dentre os resultados obtidos, destaca-se a alta conversão a glicose da polpa celulósica M-AgMec-50°, o que indicou que a hidrólise enzimática de polpa celulósica de sisal, com características similares à esta, apresenta grande potencial para produção de açúcares via catálise enzimática, visando obtenção de etanol.

Palavras chaves: sisal, hidrólise enzimática, etanol

ABSTRACT

KASCHUK, J. J. **Enzymatic hidrollysis of cellulose pulp sisal**. 2014. 170f. Thesis (MS in Physical Chemistry) - Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2014.

This study corresponds to the enzymatic hydrolysis of previously mercerized pulp sisal (20g polpa.L⁻¹ aqueous 20% NaOH) via mechanical agitation (50° C, 3h, M-AgMec-50°) and ultrasound (25 ° C, 1h) at 20% (M-US-20%) and 40% (-M-US 40%) of amplitude. The mercerized pulp had the following properties: M-AgMec-50° 97.4% of α -cellulose, 68% of crystallinity (Ic) and average viscometric molecular weight (MMvis) of 94618,0g.mol⁻¹, M-US-20% 95% of α -cellulose, 68% of Ic and MMvis of 87581,6 g.mol⁻¹, M-US-40% 91.2% α -cellulose, 66% of Ic and 81786,9g .mol⁻¹ of MMvis. The hydrolysis reactions (48 h) were performed using commercial enzymes *cellulase* (Accellerase 1500) and enzymes obtained from the growth of the fungus *Aspergillus sp.* Aliquots constituted of unreacted pulp and liquor were taken from the medium during the reaction. The unreacted pulps were characterized with respect to Ic, MMvis, length and thickness and scanning electron microscopy (SEM). The liquors were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and by the Miller method (DNS). In the hydrolysis of the cellulose pulp sisal M-AgMec -50 °, the amount of enzymes used was varied (0.5 (HE-SAG-0.5), 0.7 (HE-SAG-0.7) and 0.9 (HE-SAG-0.9) mL enzyme complex.g⁻¹ pulp). The highest yield of glucose (98%), obtained via HPLC, corresponded to HE-SAG-0.9. This proportion of enzymes was used for the reactions using the pulps M-US-20% (HE-SU20-0,9) and M-US-40% (HE-SU40-0,9). Among all the considered pulps, the best performance for glucose was HE-SAG-0.9 as the presence of greater amounts of hemicellulose in pulps treated via ultrasonic (HE-HE-SU 20-0,9 SU40-0,9) made it difficult for the enzymes to access the cellulose chains. The analysis of unreacted pulps showed that, in general, *cellulase* enzymes act primarily on the non-crystalline region. Different behaviors were observed with respect to Ic and MMvis, depending on the time interval elapsed during the reaction. Considering the peak density of greater length for the fibers HE-SAG-0.5; HE-SAG-0.7 and HE-SAG-0.9, the variation during the reaction was [129-215] μ m for [77-129] μ m. The fibers of lengths greater than [359-599] μ m became smaller, thus increasing the concentration of fibers with lengths smaller than 359 μ m in the medium. For HE-SAG-0.5; HE-SAG-0.7; HE-SAG-0.9 the peak of greater density of thickness varied from [28-39] to [11-23] μ m and, for HE-SU20-0,9 and HE-SU40-0,9 that varied from [18-30] μ m to [14-18] μ m. The set of results indicated that the enzymes acted primarily from the fiber surfaces. Reactions using commercial *cellulases* and enzymes obtained from *Aspergillus sp.* fungus were performed using other substrates in addition to M-AgMec-50° (HE-SAG-0,5; H-*Aspergillus*-SAG-1,5), which were microcrystalline cellulose (HE-MICRO-0,5; H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) and filter paper (HE-PFT-0.5, H-*Aspergillus*-PFT-1,5). Out of the three substrates used, the filter paper showed a higher amount of hemicellulose, and therefore the highest concentration of reducing sugars (DNS) was observed in this sample for the two enzymes. For all the substrates, the fungal enzyme produced a much lower level of sugar than that obtained by using commercial enzyme. The enzymes were evaluated by electrophoresis of proteins. The bands of endoglucanases and exoglucanases were observed in the fungal enzymes, confirming that during the growth of the fungus there was the formation of *cellulase* enzymes. However, the respective bands of commercial *cellulases* showed that these enzymes are present in considerably higher concentration when compared to those obtained from the fungus *Aspergillus sp.* When comparing the results of Ic, MMvis, length and thickness for all the unreacted pulps using commercial and fungal enzymes under the conditions

considered in this study, it was observed that fungal enzymes acted significantly less intensely than the commercial ones. Studies involving fungal enzymes need deepening. Among the obtained results, there is a high conversion of the glucose pulp AgMec-M50 °, which indicated that the enzymatic hydrolysis of cellulosic pulps with features similar to the pulp used in the present study, has great potential for the production of sugars via enzymatic catalysis aiming at the production of ethanol.

Keywords: sisal, enzymatic hydrolysis, ethanol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Conversão enzimática da sacarose a glicose e frutose	24
FIGURA 2– Representação dos principais componentes da fibra vegetal (a), celulose (b), hemicelulose (c) e lignina (d).	28
FIGURA 3– Estrutura molecular da celulose	30
FIGURA 4– Representação esquemática das ligações de hidrogênio presentes entre as cadeias de celulose (intermoleculares em vermelho) e nas unidades de celobiose (intramoleculares em azul)....	31
FIGURA 5– Projeções das celas unitárias da célula I e II sob dois planos diferentes (a-b) e (b-c).....	33
FIGURA 6 -Estruturas de unidades de monossacarídeos presentes nas hemiceluloses (poliose)	35
FIGURA 7 -Composição da hemicelulose da fibra de sisal	36
FIGURA 8– Unidades presentes na lignina: (1) p-hidroxifenila, (2) guaiacila, (3) siringila	37
FIGURA 9 – Planta de sisal	38
FIGURA 10-Representação esquemática do rearranjo molecular das cadeias de celulose na mercerização.	42
FIGURA 11- Representação da estrutura da celulose I, mostrando possíveis interações dos íons sódio nas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares	43
FIGURA 12 - Algumas distâncias referentes ao arranjo os átomos no plano para celulose I (nativa) e celulose II (mercerizada).....	44
FIGURA 13- Representação esquemática da propagação das ondas ultrassônicas em um líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação.....	45
FIGURA 14– Possíveis reações que podem ocorrer a partir do processo de cavitação em meio aquoso.....	46
FIGURA 15– Representação da interação entre uma enzima <i>celulase</i> e a celulose, baseados em dados cristalográficos.	50
FIGURA 16 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a despolimerização da celulose por <i>celulases</i>	52
FIGURA 17– Representação do mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica com a inversão de configuração do carbono anomérico.....	54
FIGURA 18 –Representação do mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica com a retenção de configuração do carbono anomérico.....	55
FIGURA 19– Difratoograma típico de celulose de sisal sem tratamento	64
FIGURA 20– Analisador de fibras (MorFi Compact – Techpap).....	66
FIGURA 21 - Representação do equilíbrio entre β -D-glicose e D-glicose (a) e da reação desta última com ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) (b).....	77
FIGURA 22 - Variação do teor de α -celulose para o tratamento de mercerização realizado via agitação mecânica e ultrassom.	81
FIGURA 23- Variação do índice de cristalinidade em função dos tempos de tratamentos via agitação mecânica (M-AgMec-50°) (a) e via ultrassom (b) (M-US-20%; M-US-40%).....	82
FIGURA 24 - Variação da MMvis durante o tratamento de mercerização via agitação mecânica (a) e ultrassom utilizando as amplitudes de 20% e 40% (b).....	83

FIGURA 25 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura das fibras celulósicas presentes na polpa durante os tratamentos de mercerização realizados.	85
FIGURA 26 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as polpas celulósicas tratadas via mercerização sob agitação mecânica e ultrassom.....	86
FIGURA 27 - Valores de massa molar média viscosimétrica (MMvis) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas <i>celulases</i> comercial, usando diferentes escalas, (a) e (b)	90
FIGURA 28 - Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas <i>celulases</i> comercial.	92
FIGURA 29–Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas <i>celulases</i> comercial.....	93
FIGURA 30 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas <i>celulases</i> comercial.....	97
FIGURA 31–Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas <i>celulases</i> comercial	99
FIGURA 32 - Massa molar média viscosimétrica (MMvis) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude, usando diferentes escalas, (a) e (b).....	101
FIGURA 33- Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.	102
FIGURA 34–Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.	103
FIGURA 35 - Mapas de densidade referente aos valores de comprimento e espessuras das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.....	107
FIGURA 36 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.	110
FIGURA 37 - Curva padrão: Absorbância (540nm) versus concentração de glicose (R ² =0,989).....	112
FIGURA 38- (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais para as concentrações de 0,5; 0,7 e 0,9 mL complexo enzimático.g ⁻¹ polpa celulósica. O maior e o menor erro observado foram de $\pm 8,3.10^{-3}$ (HE-SAG-0,9, 11h), e $5,7.10^{-5}$ (HE-SAG-0,5, 30 min), respectivamente. (b) Concentração de glicose (HPLC) O maior e o menor erro observado foi de $\pm 0,20$ (HE-SAG-0,9, 1h), e 0,0014 (HE-SAG-0,7, 13h), respectivamente. (c) Sobreposição das curvas (a) e (b).	113

FIGURA 39 - Concentração glicose (HPLC) das reações utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais para a concentração de 0,9 mL complexo enzimático.g ⁻¹ celulose utilizando polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) com adições de 1g de polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°) e 0,5mL de complexo enzimático após 15h de reação.....	117
FIGURA 40 - (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais para a concentração de 0,9 mL complexo enzimático.g ⁻¹ polpa celulósica utilizando polpa celulósica de sisal sob tratamentos diferentes (M-AgMec-50°, M-US-20%, M-US-40%). O maior e o menor erro observado foram de $\pm 0,02$ (HE-SU20-0,9_15h) e $\pm 3,4.10^{-3}$ (HE-SU40-0,9_1h). (b) Concentração de glicose (HPLC). O maior e o menor erro observado foram de $\pm 3.10^{-3}$ (HE-SU20-0,9_23h) e $\pm 2.10^{-3}$ (HE-SU20-0,9_8h) (c) Sobreposição das curvas (a) e (b).....	118
FIGURA 41 - Teores de xilose detectados pelo método HPLC para as alíquotas provenientes da hidrólise enzimática das polpas celulósicas de sisal tratadas via ultrassom (H-SU20-0,9; H-SU40-0,9).O maior e o menor erro são $\pm 0,01$ (H-SU40-0,9_48h) e $\pm 1.10^{-4}$ (H-SU20-0,9_3h).....	120
FIGURA 42 - Teores de açúcares redutores (via DNS) das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50) utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i>	126
FIGURA 43 - Massa molar média viscosimétrica (MMvis)das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5). Em (a) é apresentada a escala em x até 50 para HE-SAG0,5 e HE-PFR-0,5, em (b) é apresentada a escala em x até 16 para HE-SAG0,5 e HE-PFR-0,5, em (c) é apresentada a escala em x até 50 para HE-MICRO-0,5 e em (d) é apresentada a escala em x até 16 para HE-MICRO-0,5.	128
FIGURA 44- Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).	129
FIGURA 45 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).	131
FIGURA 46 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura médios das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).	135
FIGURA 47 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).	138
FIGURA 48 - Variação da massa molar média viscosimétrica (MMvis) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i> . (1,5mL caldo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica) Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.	139
FIGURA 49– Índice de cristalinidade (Ic) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i> . A concentração utilizada foi de 1,5mL caldo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica. Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose	

microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.	141
FIGURA 50 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp.</i> (1,5mL caldo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.	142
FIGURA 51 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessuras médios para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp.</i> (1,5mL caldo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.	146
FIGURA 52 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp.</i> (1,5mL caldo enzimático. g ⁻¹ polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos. Os tempos das amostras são 0, 8, 23 e 48h.	148
FIGURA 53 - (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais para (0,5 mL complexo enzimático.g ⁻¹ polpa celulósica) utilizando como substrato a polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5). O maior e o menor erro são: $\pm 0,01$ (HE-PFT-0,5_11h) e $\pm 2.10^{-3}$ (HE-MICRO-0,5_15h) respectivamente (b) Concentração de glicose (HPLC). O maior e o menor erro são: $\pm 0,02$ (HE-PFT-0,5_9h) e $\pm 5.10^{-3}$ (HE-MICRO-0,5_6h) (c) Sobreposição das curvas (a) e (b).	150
FIGURA 54 – Concentração de xilose (via HPLC) obtida durante a reação de hidrólise enzimática do papel filtro utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais (0,5mL de complexo enzimático.g ⁻¹ polpa celulósica) (HE-PFT-0,5). O maior erro e o menor erro são, $\pm 0,01$ (11h) e $\pm 2.10^{-4}$ (1h).	151
FIGURA 55 - Variação da produção de açúcar redutor (DNS) para alíquotas provenientes das reações de hidrólise enzimática utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp.</i> Como substrato, foram utilizados a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5). O maior e o menor erro são, $\pm 0,01$ (H-Aspergillus-PFT-1,5_23h) e $\pm 2.10^{-3}$ (H-Aspergillus-MICRO-1,5) respectivamente.	154
FIGURA 56–Teores de açúcares redutores(DNS) para as alíquotas provenientes das reações de hidrólise enzimática utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i> e utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais. Os substratos utilizados foram a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5, HE-SAG-0,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5, HE-MICRO-0,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5, HE-PFT-0,5)..	156
FIGURA 57 – Gel de policrílamida proveniente da eletroforese padrão de escoamento de proteínas (a), das enzimas <i>celulases</i> comerciais (b) e obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i> (c).	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores referentes aos ângulos 2θ utilizados nos cálculos de índice de cristalinidade para as polpas celulósicas de partida e mercerizadas (LACERDA et al., 2013).....	64
TABELA 2 – Códigos referentes às condições de mercerização (M) da polpa celulósica de sisal.....	80
TABELA 3- Teor de α -celulose, MMvis e Ic para as polpas celulósicas utilizadas nas reações de hidrólises enzimática.....	87
TABELA 4 - Códigos usados para denominar as reações estudadas (50°C) de acordo com as condições empregadas	88
TABELA 5 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,5; HE-SAG-0,7; HE-SAG-0,9 após 15h e 48h de reação.	115
TABELA 6 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,9; HE-SU20-0,9; HE-SU40-0,9 após 15h e 48h de reação.....	121
TABELA 7- Valores das atividades de celulasas totais para as enzimas obtidas em diferentes meios de crescimento do fungo <i>Aspergillus sp</i> e do complexo enzimático comercial.	124
TABELA 8 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,5; HE-MICRO-0,5; HE-PFT-0,5 após 15h e 48h de reação.....	152
TABELA 9-Valores de glicose máximo, açúcar redutor detectado e rendimentos para as reações utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus sp.</i> , após 15h e 48h de reação	155

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
1.1 GERAÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DE BIOMASSA.....	23
1.2 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	27
2.1.1 Celulose	28
2.1.1.1 Composição química e estrutura da celulose	29
2.1.1.2 Cristalinidade e polimorfismo da celulose	31
2.1.1.3 Reatividade da celulose	34
2.1.2 Hemicelulose	34
2.1.3 Lignina.....	37
2.2 SISAL.....	38
2.2.1 Processo Kraft.....	39
2.3 PRÉ TRATAMENTO DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL.....	41
2.3.1 Mercerização	41
2.3.1.1 Ultrassom de alta intensidade.....	45
2.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL.....	47
2.2.1 Enzimas.....	49
2.2.1.1 Celulases: mecanismo e estrutura	50
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 OBJETIVO GERAL.....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4. EXPERIMENTAL.....	59
4.1 MATERIAIS.....	59
4.2 MÉTODOS.....	60
4.2.1 Caracterização da polpa de partida	60
4.2.1.1 Teor de α -celulose e hemiceluloses.....	60
4.2.1.2 Massa Molar Média viscosimétrica (MMvis).....	61
4.2.1.3 Determinação do Índice de Cristalinidade por difração de raios-X (Ic)	63
4.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
4.2.1.5 Comprimento e espessura médios das fibras	65

4.2.2 Mercerização	66
4.2.2.1 Caracterização das polpas celulósicas mercerizadas	68
4.2.3 Hidrólise enzimática	68
4.2.3.1 Hidrólise enzimática utilizando complexo enzimático Accellerase 1500	68
4.2.3.2 Hidrólise enzimática utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus</i> sp.	70
4.2.3.2.1 Obtenção das enzimas fúngicas	70
4.2.3.2.2 Reações de hidrólise enzimática	74
4.2.3.3 Caracterização dos produtos gerados nas reações de hidrólises	76
4.2.3.3.1 Caracterização das polpas não reagidas	76
4.2.3.3.2 Caracterização dos licores	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
5.1 ESTUDO DA MERCERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL	79
5.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA VISANDO PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS	87
5.2.1 Hidrólise enzimática utilizando polpa celulósica de sisal e complexo <i>celulases</i> comercial	89
5.2.1.1 Caracterização da polpa celulósica não reagida	89
5.2.1.1.1 Polpa mercerizada via agitação mecânica	89
5.2.1.1.2 Polpas mercerizadas via ultrassom	100
5.2.1.2 Caracterização dos produtos de reação gerados nas reações de hidrólise enzimática utilizando complexo <i>celulases</i> comercial	111
5.2.2 Hidrólises enzimáticas de enzimas <i>celulases</i> comerciais e fúngicas perante diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina)	123
5.2.2.1 Caracterização da polpa celulósica residual (não reagida)	127
5.2.2.1.1 Hidrólise enzimática de diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina) utilizando enzimas <i>celulases</i> comerciais	127
5.2.2.1.2 Hidrólise enzimática de diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina) utilizando enzimas <i>celulases</i> obtidas a partir do crescimento do fungo <i>Aspergillus</i>	139
5.2.2.2 Caracterização dos produtos de reação gerados nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas <i>celulases</i> fúngicas perante diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina)	149
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS	161

I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

I.1 GERAÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DE BIOMASSA

Desde a revolução industrial de meados do século XVIII até século XIX, a energia se tornou um fator crucial para o crescimento econômico da humanidade. Desde então, o consumo energético vem aumentando (ATABANI *et al.*, 2012). Entre as principais fontes energéticas, estão os combustíveis não renováveis, como o petróleo. Entre os fatores negativos da utilização do petróleo como fonte energética, pode-se citar o esgotamento da mesma e a liberação de altos índices de CO₂ a partir de sua combustão, prejudicando o meio ambiente. Em 2012 a Agência Internacional de Energia indicou que a produção de CO₂ mundial, proveniente da utilização de combustíveis fósseis, atingiu o seu pico (CRAIG e ALLEN, 2014), impulsionando ainda mais o aumento de pesquisas visando a busca de fontes alternativas de energia.

O Brasil, com sua grande variedade de recursos naturais, apresenta grande potencial para produzir combustíveis a partir de fonte renováveis. Porém, para o desenvolvimento de novas tecnologias é necessário grandes investimentos. O país tem demonstrado a intenção de intensificar a participação de fontes renováveis na matriz energética brasileira, por exemplo criando mecanismos para incentivar a promoção de tais alternativas, como energia eólica, pequenas hidrelétricas e aproveitamento da celulose e da hemicelulose presentes no bagaço de cana de açúcar (LINS *et al.*, 2012) para gerar açúcares fermentescíveis, conforme descrito posteriormente.

O etanol pode ser produzido a partir da sacarose da cana-de-açúcar, da sacarina da beterraba, do amido de milho, de trigo, ou de mandioca. Assim, o etanol é uma fonte de energia natural, limpa, renovável e sustentável (FILHO e PESSANHA, 2012).

A produção brasileira de etanol representa um terço de todo etanol consumido no mundo, sendo que o Brasil possui um potencial de produção de 16 bilhões de litros, porém, a média anual é de 12 bilhões de litros. Dois tipos de etanol são produzidos para uso como combustível: o anidro, misturado à gasolina, e o hidratado, usado como combustível puro (AZEVEDO *et al.*, 2012). Grande parte desse etanol produzido é proveniente da fermentação da sacarose retirada da cana de açúcar, via processo conhecido e de custo relativamente baixo

(LACERDA, 2012). Neste processo, primeiramente, açúcares como glicose e frutose são produzidos pela hidrólise da sacarose, com enzimas (Invertases também chamadas de Sacarases) produzidas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FIGURA 1). A fermentação desses açúcares também é realizada com enzimas obtidas dessa levedura, que finaliza o processo de obtenção do etanol (JUTAKANOKI *et al.*, 2012).

FIGURA 1 – Conversão enzimática da sacarose a glicose e frutose

Quando comparado aos combustíveis fósseis, o etanol obtido de cana de açúcar, beterraba ou milho, apresenta custos relativamente altos, pois para produção em larga escala necessita ampla área plantada. Adicionalmente, como a matéria-prima também pode ser utilizada na produção de alimentos, a produção de etanol compete com o setor alimentício (SUN e CHENG, 2002).

Outra forma de obtenção do etanol é o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, proveniente dos resíduos do processo tradicional de obtenção do etanol, como do bagaço de cana de açúcar, ou de outras fontes lignocelulósicas. A biomassa lignocelulósica, tem três componentes majoritários: a celulose, as hemiceluloses e a lignina, que variam em proporções dependendo da matéria prima e das condições de produção da mesma (RUBIN, 2008).

O processo de obtenção do etanol proveniente de biomassa lignocelulósica (etanol celulósico ou de segunda geração) envolve primeiramente a colheita e transporte da biomassa, seguido da desconstrução da parede celular para a extração da lignina e isolamento da celulose e hemicelulose, sendo estes polissacarídeos submetidos a processos de sacarificação (produção de açúcares simples a partir de polissacarídeos) para obtenção de açúcares fermentescíveis, cuja fermentação leva à produção de etanol (RUBIN, 2008).

Considerando a perspectiva energética, as plantas podem ser vistas como sistemas coletores de energia solar e armazenadores de energia química, sendo que a última pode ser acessada via conversões químicas ou enzimáticas. Assim, a biomassa lignocelulósica, que é uma

fonte renovável abundante, pode ser usada como matéria prima para produção de etanol, visando a geração de energia (LACERDA, 2012).

1.2 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO

No grupo de *Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas* (Instituto de Química de São Carlos) estudos têm sido desenvolvidos para a valorização de fibras lignocelulósicas. Nestes estudos, têm sido considerados processos de obtenção de compósitos de matrizes poliméricas reforçadas com fibras lignocelulósicas (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; RAMIRES *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2012; RAMIRES *et al.*, 2013), de derivatização de celulose para o desenvolvimento de biocompósitos provenientes desses derivados (DE PAULA *et al.*, 2008; MORGADO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013), e de sacarificação de material lignocelulósico, visando à produção de etanol (DE PAULA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2013).

O presente estudo está inserido em projeto que visa à sacarificação de fibras lignocelulósicas, com ênfase para a polpa celulósica oriunda da fibra de sisal (DE PAULA, 2009; LACERDA, 2012), a qual apresenta alto teor de celulose, uma propriedade importante para o processo de sacarificação.

A fibra de sisal foi escolhida no presente estudo também por ser o Brasil o maior produtor e exportador das fibras e manufaturados de sisal, com 57% da produção e 70% da exportação mundial (SINDIFIBRAS, 2012).

A obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, como o sisal, provavelmente não substituirá totalmente as fontes de energia tradicionalmente utilizadas, porém, mostra-se uma alternativa economicamente viável para evitar e/ou minimizar o esgotamento das reservas de energia não renováveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose, hemiceluloses e lignina. A celulose e a hemicelulose são macromoléculas constituídas de diferentes açúcares e a lignina é uma macromolécula aromática sintetizada a partir de precursores fenilpropanóides (SÁNCHEZ, 2009). Como componentes minoritários, também pode ocorrer a presença de compostos orgânicos chamados de extrativos (ésteres, álcoois, esteróides e outros) e inorgânicos (principalmente sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio) (JENKINS *et al.*, 1998;). As proporções destes componentes químicos podem variar de espécie para espécie, e também podem sofrer alterações significativas durante o ciclo de vida da planta (VASSILEV *et al.*, 2012; VASSILEV *et al.*, 2013).

A FIGURA 2 mostra uma representação esquemática dos três principais componentes da biomassa lignocelulósica, lignina, hemicelulose e celulose. Estes três componentes formam uma estrutura rígida e resistente, que só é possível devido as interações e/ou ligações covalentes existentes entre estes (BARTON II, 1988; VASSILEV *et al.*, 2012).

FIGURA 2– Representação dos principais componentes da fibra vegetal (a), celulose (b), hemicelulose (c) e lignina (d).

FONTE: Adaptado de <http://www.ceres.net/aboutus/AboutUs-Biofuels-Carbo.html>.

A celulose encontra-se como fibrilas dispostas em espirais, concedendo força e flexibilidade à fibra, sendo envolvida por lignina, que tem como função aumentar a resistência da estrutura a ataques, tanto químicos quanto enzimáticos. Já a hemicelulose têm como função atuar como elo químico entre a celulose e a lignina (FIGURA 2-c). As interações entre estes três componentes resultam em materiais altamente resistentes a tratamentos químicos (SANTOS *et al.*, 2012).

2.1.1 Celulose

Em 1838, Anselme Payer descobriu e isolou a partir de plantas verdes, uma substância que levou o nome de celulose, sendo que a mesma nunca pode ser encontrada na natureza em sua forma pura. Desde então, essa substância se tornou de grande interesse e vem sendo constantemente investigada (NEVELL e ZERONIAN, 1985; PRESTON, 1986; LAVOINE *et al.*, 2012).

A celulose é muito importante para o setor industrial mundial, podendo ser utilizada para obtenção de produtos como papel, têxteis, construção, compósitos e plásticos. A partir da mesma, vem crescendo o interesse na produção de “energia verde”, buscando-se a valorização dessa fonte abundante no meio ambiente, como alternativa sustentável em um mundo dependente de recursos não renováveis (KEIJSERS *et al.*, 2013).

A celulose está presente em grande parte das estruturas vegetais. A madeira do eucalipto apresenta cerca de 40-45% em sua composição e esta é a fonte mais utilizada na geração de energia via combustão. Tanto para a madeira de eucalipto como para qualquer outra fonte lignocelulósica, para a obtenção de etanol, a partir destas fontes, é necessário tratamentos químicos para a desconstrução da estrutura vegetal, exigindo assim, elevado consumo energético. A celulose também pode ser produzida a partir de *Acetobacter xylinum*, que é a única espécie de microrganismo conhecida capaz de produzir celulose em quantidades comerciais (JONAS e FARAH, 1998).

2.1.1.1 Composição química e estrutura da celulose

A celulose é composta por aproximadamente 44% de carbono, 6% de hidrogênio e 50% de oxigênio, o que é equivalente a uma fórmula empírica de $C_6H_{10}O_5$ e a uma massa molar de 162 g.mol^{-1} (NEVELL e ZERONIAN, 1985).

Consiste de um homopolissacarídeo linear composto de unidades de β -D-glicopiranoose, também conhecida como glicose. Essas unidades são ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4), que se formam pela condensação de duas unidades de β -D-glicopiranoose, com eliminação de uma molécula de água entre as hidroxilas dos carbonos 1 e 4 (DKESHWANI, 2010).

A celulose pode apresentar de aproximadamente 5000 a 10000 unidades de glicose, sendo que a unidade repetitiva ao longo da cadeia consiste de duas unidades anidras de β -D-glicopiranoose. Estas unidades são também chamadas de anidroglicose, ligadas entre si e levam o nome de celobiose, apresentando um comprimento de 1,03 nm (NEVELL e ZERONIAN, 1985; MOHAN *et al.*, 2006).

As unidades de β -D-glicopiranoose estão em conformação de cadeira e os substituintes HO-2, HO-3 e CH_2OH estão orientados equatorialmente (FIGURA 3). Os grupos hidroxilas

estão no plano da cadeia e os átomos de hidrogênio estão posicionados perpendicularmente (SJÖSTRÖM, 1981). As diferentes reatividades dos grupos hidroxilas nas extremidades, conferem à celulose dois terminais, um redutor e outro não redutor (KLEMM *et al.*, 1998).

FIGURA 3– Estrutura molecular da celulose

FONTE: KLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WANGENKNECHT, W. *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods*. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.

A molécula é linear e tem uma grande tendência para formar ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (SJÖSTRÖM, 1981). Os grupos OH são os responsáveis pela a formação dessas ligações hidrogênio.

As ligações hidrogênio intramoleculares ocorrem entre grupos OH de unidades de glicose adjacentes de uma mesma molécula, sendo elas responsáveis por uma rigidez considerável das cadeias individuais de celulose. Já as ligações hidrogênio intermoleculares ocorrem entre grupos OH de cadeias de celulose adjacentes, que levam a formação de estruturas supramoleculares (FENGEL e WEGENER, 1989). A FIGURA 4 representa as ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares da celulose.

FIGURA 4– Representação esquemática das ligações de hidrogênio presentes entre as cadeias de celulose (intermoleculares em vermelho) e nas unidades de celobiose (intramoleculares em azul)

Existe uma forte tendência das cadeias de celulose se agregarem em entidades estruturais altamente ordenadas, devido a sua constituição química e a sua conformação espacial. Essa tendência ocorre devido a existência da rede estendida de ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (DKESHWANI, 2010), (FIGURA 4). Essa ordenação estrutural gera regiões de alta ordenação, ou cristalinas, e regiões de menor ordenação, ou seja, não cristalinas. O grau de cristalinidade é usualmente avaliado através do padrão de difração de raios X, sendo que esse grau varia de acordo com a origem e o pré-tratamento realizado na amostra de celulose (LACERDA, 2012).

2.1.1.2 Cristalinidade e polimorfismo da celulose

Diferentes estruturas de empacotamento das cadeias de celulose podem ser geradas a partir das diferentes conformações que o grupo hidroximetila ($-\text{CH}_2\text{OH}$) assume na extensão da cadeia da celulose. São conhecidos sete polimorfos de celulose (I_α , I_β , II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II}),

dentre as quais, as formas mais encontradas são I e II (O'SULLIVAN, 1997; JARVIS, 2003; LACERDA, 2012).

Na natureza, a celulose é encontrada na forma polimórfica I, apresentando-se como uma mistura de estruturas cristalinas I_α e I_β . A celulose II, que é estudada extensivamente, pode ser obtida a partir de tratamentos como a regeneração. Este tratamento consiste na solubilização da celulose I em um solvente apropriado, seguido por precipitação ou coagulação em água. Outra alternativa é a mercerização, que é um tratamento realizado com solução aquosa de hidróxido de sódio (12% a 20%) consistindo no intumescimento intracristalino das fibras da celulose, seguido de lavagem ocorrendo a mudança na estrutura cristalina (O'SULLIVAN, 1997). A mercerização foi usada no presente estudo e será detalhada na sequência deste texto.

A FIGURA 5 apresenta as projeções das celas unitárias da celulose I e celulose II. Na celulose I, os grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$, de cadeias adjacentes, se encontram na mesma conformação e as cadeias se tornam paralelas, sendo essa a característica desta celulose. Já na celulose II, os grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$, das cadeias adjacentes, apresentam posições diferentes, fazendo com que a estrutura seja antiparalela (ZHAO *et al.*, 2006) (FIGURA 5).

FIGURA 5– Projeções das celas unitárias da célula I e II sob dois planos diferentes (a-b) e (b-c)

FONTE: 1 KROON-BATENBURG, L. M. J.; KROON, J. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate Journal*, v. 14, n. 5, p. 677-690, 1997. 2 O'SULLIVAN, A. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, v. 4, n. 3, p. 173-207, 1997.

A celulose II é a forma termodinamicamente mais estável, apesar dela não ser encontrada na natureza. Seu empacotamento antiparalelo permite que suas ligações hidrogênio apresentem maior extensão, formando arranjos em escala tridimensional que fazem com que a estrutura seja mais estável e tenha uma menor energia. Essa é uma das explicações para o fato de a celulose II não se reverter a celulose I (KROON-BATENBURG e KROON, 1997).

2.1.1.3 Reatividade da celulose

A reatividade química da celulose é governada tanto pela estrutura química como pelos arranjos formados em sua estrutura supramolecular, pois a reatividade está diretamente ligada à acessibilidade dos grupos hidroxilas presentes em sua composição. Quando mais acessível um grupo hidroxila, mais suscetível ele estará a reagentes e/ou catalisadores químicos, para formação de um derivado, ou a solventes, quando se refere à dissolução deste polissacarídeo (LACERDA, 2012).

Nas regiões não cristalinas o acesso aos grupos é facilitado, comparativamente às regiões cristalinas, pois regiões menos ordenadas estão mais suscetíveis a interação com reagentes, catalisadores ou solventes. (MORGADO, 2009).

Outro fator corresponde ao tamanho médio das cadeias de celulose, quanto maior a cadeia maior é a influência das interações entre os grupos hidroxilas e mais difícil pode ser a aproximação de reagentes e/ou catalisadores aos grupos reativos. Assim, celulosas de baixa massa molar média tendem a ser mais acessíveis frente ao ataque de reagentes químicos (DE PAULA, 2009).

A anidroglicose, unidade repetitiva da celulose, possui três grupos hidroxilas reativos: dois álcoois secundários, em C2 e C3, e um primário em C6 (FIGURA 3). A ordem de reatividade desses grupos hidroxilas mais citada na literatura é: C6-OH >> C2-OH > C3-OH (ASS *et al.*, 2006). O C6-OH está ligado a um carbono primário, com menor impedimento estérico, o que no geral o torna mais reativo, e o C3-OH está envolvido em ligação hidrogênio intramolecular, o que o torna menos acessível.

2.1.2 Hemicelulose

Hemicelulosas (ou polioses) correspondem a uma cadeia linear constituída por unidades de diversos açúcares, não cristalina e com massa molar média relativamente baixa (JIANG *et al.*, 2014). O termo hemicelulose não designa um composto químico mas uma classe de componentes poliméricos (D'ALMEIDA, 1981). É composta de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose). A cadeia principal da

hemicelulose, em muitos vegetais, é constituída principalmente por unidades de xilose, ligada por ligações β -1-4-glicosídica em que os grupos hidroxila dos açúcares pode ser parcialmente substituído por arabinose, ácidos urônicos (ácidos β -D-glicurônico, α -D-4-O-metil-glicurônico e α -D-galacturônico) (EGÜÉS *et al.*, 2013). Uma representação de alguns destes açúcares se encontra na FIGURA 6.

FIGURA 6 -Estruturas de unidades de monossacarídeos presentes nas hemiceluloses (poliose)

Na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses se encontram nos contornos das microfibrilas da celulose, conferindo um isolamento das microfibrilas ao ataques biológicos (enzimas e/ou microrganismos) e de alguns agentes químicos (PENG e SHE, 2014). Também ocorre a interação da hemicelulose com a lignina, atuando como agente de ligação com a celulose, e conferindo rigidez à parede celular da biomassa.

Um dos principais constituintes da hemicelulose, nos materiais lignocelulósicos, é a xilana. Ela consiste de resíduos de β -1,4-D-xilanopiranosose ligados em um esqueleto linear com ramificações, que podem conter grupos acetila, arabinosila e glicoronosila dependendo da fonte botânica (EBRINGEROVÁ e HEINZE, 2000; LACERDA, 2012). A FIGURA 7 mostra as porcentagens das unidades de monossacarídeos da hemicelulose presente na fibra de sisal

(MEGIATTO JR *et al.*, 2007), a qual correspondeu a matéria prima que originou a polpa celulósica usada no presente estudo.

FIGURA 7 -Composição da hemicelulose da fibra de sisal

FONTE: MEGIATTO JR, J. D.; HOAREAU, W.; GARDRAT, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Sisal fibers: Surface chemical modification using reagent obtained from a renewable source; characterization of hemicellulose and lignin as model study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 21, p. 8576-8584, 2007.

O isolamento dos componentes das hemiceluloses é dificultado pela estrutura complexa das fibras vegetais e da integração das estruturas das macromoléculas presentes. Assim, as hemiceluloses, dependendo do processo de polpação que é empregado, são completa ou parcialmente degradadas juntamente com a lignina, o que limita uma melhor exploração das características químicas e estruturais das hemiceluloses em trabalhos científicos e tecnológicos (SILVA *et al.*, 2009).

2.1.3 Lignina

A lignina consiste em de uma macromolécula tridimensional, amorfa e altamente ramificada. Apresenta inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos, ligados por meio de diferentes tipos de ligações, como do tipo éter ou carbono-carbono (FENGEL e WEGENER, 1989; RAMIRES, 2010).

A lignina pode ser dividida em duas classes: ligninas guaiacila e ligninas guaiacila-siringila. Ligninas guaiacila são compostas principalmente por unidades guaiacilas, enquanto ligninas guaiacila-siringila são compostas por quantidades aproximadamente iguais de unidades guaiacila e siringila. As duas classes de lignina apresentam, em proporções menores, unidades de *p*-hidroxifenila (RAZERA, 2006). A FIGURA 8 apresenta as unidades presentes nas macromoléculas de lignina.

FIGURA 8– Unidades presentes na lignina: (1) *p*-hidroxifenila, (2) guaiacila, (3) siringila

A lignina é o último componentes na estrutura da célula vegetal, envolvendo as microfibrilas celulósicas, fortalecendo e enrijecendo a parede celular, conferindo às plantas resistência mecânica. Ela também auxilia no transporte de água e nutrientes das plantas, além de proteger os tecidos vegetais da degradação química e/ou biológica (FENGEL e WEGENER, 1989; CANILHA *et al.*, 2010). Por esse motivo, a lignina é um dos interferentes na obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa vegetal. A fibra de sisal, que originou a polpa celulósica considerada no presente estudo, apresenta baixo teor de lignina, comparativamente a outras fibras lignocelulósicas (MEGIATTO JR *et al.*, 2007)

2.2 SISAL

O sisal (FIGURA 9), *Agave sisalana* Perré a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo e seu nome popular provem de uma planta denominada Zizal-Xiu (SINDIFIBRAS, 2012).

FIGURA 9 – Planta de sisal

FONTE: SINDIFIBRAS. O sisal do Brasil. 2012. Disponível em: <
<http://www.brazilianfibres.com/portal/index.php/pt/publicacoes>>. Acesso em: 26 set. 2012.

O sisal é originário do México e amplamente cultivado em regiões semiáridas. No Brasil, os primeiros bulbos (que nos termos da botânica, é um caule que sustenta diversas folhas, e que pode servir para originar outras plantas da mesma espécie), foram trazidos da Florida em 1903 e enviados para os estados da Bahia e de Pernambuco, onde nos anos 40 houve uma expansão da cultura. Atualmente o Brasil é o maior produtor da fibra no mundo, sendo sua produção concentrada nos estados semiáridos nordestinos, geralmente em áreas de pequenos produtores, e regiões que apresentam condições climáticas inadequadas para outras culturas. Os estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte são os principais produtores, responsáveis por, respectivamente, 93,5%, 3,5% e 3,0% da produção nacional (LACERDA, 2012; SINDIFIBRAS, 2012).

Entre as aplicações das fibras de sisal pode-se destacar a fabricação de cordas, barbantes, cabos marítimos, tapete, sacos, vassouras, estofamentos e artesanatos, além da

aplicação na indústria automotiva, de móveis e na construção civil. Elas ainda podem ser utilizadas na preparação de pasta celulósica para produção do papel Kraft de alta resistência, e de outros tipos de papeis finos, como para cigarro, filtro, absorvente higiênico, fralda, entre outros (DE PAULA, 2009; SINDIFIBRAS, 2012).

As fibras de sisal apresentam três constituintes principais: celulose (70-78%), hemicelulose (10-13%) e lignina (7-11%) que são responsáveis pelas propriedades da fibra, e apresentam também em torno de 2% de pectina e ceras, e 0,1% de cinzas como parte inorgânica da mesma (MWAIKAMBO e ANSELL, 2002; MEGIATTO JR *et al.*, 2007; LACERDA, 2012).

O material de partida usado no presente estudo, foi obtido a partir da fibra de sisal, a qual sofreu o processo Kraft na empresa cedente da fibra (LACERDA, 2012).

2.2.1 Processo Kraft

O processo Kraft consiste na degradação da lignina de fibras lignocelulósicas deixando nas mesmas, principalmente, a celulose e as hemiceluloses, no geral visando aplicação da polpa obtida na fabricação de papel (DAS *et al.*, 2013).

Nos processos químicos Kraft, as fibras lignocelulósicas (ou cavacos quando se trata de madeira), são tratadas em vasos de pressão, denominados digestores, com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, visando dissolver a lignina, preservando a resistência das fibras, com rendimento entre 50 a 60% (HAMAGUCHI *et al.*, 2012).

Entre as vantagens do processo Kraft está a produção de polpas de alta qualidade com excelentes propriedades de resistência (Kraft significa forte em alemão), com grande flexibilidade em relação às fontes lignocelulósicas em que pode ser aplicado, e um eficiente sistema de recuperação de reagentes químicos e energia. Entre as principais desvantagens está o alto custo de investimento na construção de estruturas para aplicação do processo, ligado ao baixo rendimento de polpação e ao alto custo de branqueamento da polpa inicial (LACERDA, 2012).

Os mecanismos das reações que ocorrem no processo Kraft são complexos, podendo-se considerar, de forma simplificada, que a lignina incrustada nas fibras (ou cavacos de madeira) é quimicamente fragmentada em decorrência da reação com íons hidroxí (OH^-) e

hidrossulfitos (SH^-) presentes no licor de polpação, sendo então dissolvida como íons fenolato ou carboxilato. A hemicelulose e a celulose também podem ser quimicamente atacadas e dissolvidas em alguma extensão. O processo pode levar a diminuição de mais de 80% da lignina, 50% de hemiceluloses e 10% de celulose presentes nas fibras de partida (DAS *et al.*, 2013).

No presente trabalho o estudo de hidrólise foi realizado partindo-se de polpa celulósica, proveniente da fibra de sisal, que possui em torno de 7-11% de lignina (PAIVA e FROLLINI, 2006). Esta foi deslignificada a partir dos processos Kraft e branqueamento, ambos realizados na empresa concedente da polpa.

Para que a eficiência do processo de hidrólise de biomassa aumente é necessário a realização de um processo de pré-tratamento adequado que envolve a destruição da matriz lignocelulósica, ou seja a separação da hemicelulose e lignina da celulose (quando o material de partida corresponde à fibra lignocelulósica) No presente estudo, a polpa celulósica de partida usada foi obtida como produto do processo Kraft aplicado à fibra lignocelulósica, conforme já mencionado.). Ainda, a quebra das ligações hidrogênio, alterando a estrutura cristalina da celulose, o aumento da área de superfície e da porosidade da celulose podem exercer influência sobre o processo de hidrólise (LI *et al.*, 2010).

Além do processo Kraft, outros pré-tratamentos são usados para deslignificar a fibra lignocelulósica,, que incluem processos físicos (moagem, microondas e extrusão), químicos (alcalino, ácido, organosolve que utiliza mistura de solventes orgânicos-água para fazer a deslignificação de biomassa, ozonólise em que é utilizado o ozônio para oxidar as ligações duplas, formando compostos carbonílicos), físico-químico (explosão à vapor, tratamento líquido com água quente e explosão com CO_2) e biológicos (utilizando enzimas ou fungos) (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013).

Os pré-tratamentos químicos estão entre as principais tecnologias de pré-tratamento da biomassa, visando hidrólise da mesma. A maior parte destes pré-tratamentos diferem nos tipos de solventes e reagentes e mecanismos responsáveis pela modificação estrutural e química da parede celular, que resultam em uma acessibilidade maior ao catalisador responsável pela hidrólise, além de altos rendimentos (OGEDA e PETRI, 2010).

Os pré-tratamentos alcalinos utilizam temperaturas e pressões baixas quando comparadas a outras tecnologias de pré-tratamentos. Podem ser realizados em condições ambientais, porém o tempo é medido em termos de horas ou dias. Uma limitação é que as bases são convertidas em sais e/ou incorporadas como sais na biomassa através das reações

de pré-tratamento. Os mais comuns álcalis utilizados como agentes nos pré-tratamentos são o hidróxido de cálcio, amônia, sódio e ureia. (CHANG *et al.*, 1998).

2.3 PRÉ TRATAMENTO DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL

No presente trabalho, o material de partida correspondeu a polpa celulósica de sisal obtida após deslignificação da fibra lignocelulósica. A polpa foi submetida a pré-tratamento, visando aumentar a eficiência da etapa posterior, ou seja, da hidrólise. Para o pré-tratamento, foi utilizada solução aquosa de hidróxido de sódio, o que pode levar a alterações na morfologia e na cristalinidade da polpa, dentre outros aspectos, fazendo com ela apresente maior reatividade e/ou acessibilidade perante a solventes e reagentes.

2.3.1 Mercerização

O processo de mercerização é realizado nas fibras celulósicas para alterar propriedades como reatividade química, tração, rugosidade, entre outras, consiste em um *intumescimento limitado*, sendo as fibras celulósicas submetidas a um pré-tratamento com solução aquosa concentrada de uma base forte (SAMEI *et al.*, 2008).

O intumescimento (“swelling”) corresponde a interação física entre os grupos hidroxila da celulose e agentes químicos. O intumescimento interfere nas ligações hidrogênio intermoleculares, e pode diminuir a cristalinidade da celulose, sendo classificado como intercristalino e intracristalino (NEVELL e ZERONIAN, 1985).

O intumescimento *intercristalino* é caracterizado pela penetração de agentes intumescentes, por exemplo a água, nas regiões menos ordenadas, causando o inchamento das fibrilas da celulose. Já o intumescimento *intracristalino* ocorre nas regiões mais ordenadas e pode levar a mudanças na rede cristalina (NEVELL e ZERONIAN, 1985).

A mercerização depende do tempo, da temperatura, da concentração da solução de NaOH, da razão celulose/solução alcalina, e das propriedades da fonte da celulose utilizada.

Assim, a extensão com que as mudanças na estrutura da fibra celulósica ocorrem pode ser maior ou menor, variando essas condições (LACERDA, 2012).

Quando a celulose I (FIGURA 5) é submetida a agitação em uma solução aquosa de NaOH, ocorre o intumescimento, o que pode levar ao rearranjo das cadeias, resultando em mudanças de conformação da estrutura da celulose (FIGURA 10). Durante o intumescimento, os íons sódio interagem com as regiões de maior polaridade envolvendo os grupamentos hidroxilas. Essas interações influenciam nas rupturas e reposicionamentos das ligações hidrogênio (FIGURA 11) (FINK *et al.*, 1995).

FIGURA 10-Representação esquemática do rearranjo molecular das cadeias de celulose na mercerização.

FONTE: Adaptado de SARKO, A. Recent X-ray Cristallographic Studies of Cellulose. In: YOUNG, R. A. e ROWELL, R. M. (Ed.). Structure, Modification and Hydrolysis. New York: John Wiley, 1986. cap. 2, 379 p.

Como observado na FIGURA 11, o íon sódio pode interagir com OH-C(2) levando a ruptura da ligação hidrogênio intramolecular que ocorre com OH-C(6), influenciando também na ligação hidrogênio intermolecular dessa mesma hidroxila. Também pode ser observado a possível ruptura da ligação hidrogênio intramolecular entre as hidroxilas OH-C(3) e OH-C(5).

Com a ruptura da ligação hidrogênio intramolecular do OH-C(6), a rotação do grupo hidroximetila ($-\text{CH}_2\text{OH}$) é facilitada, levando a uma transição conformacional deste grupo na estrutura de cadeias paralelas (celulose I) para a estrutura de cadeias antiparalelas (celulose II) ou seja, tanto as cadeias adjacentes quanto os tais grupos tomam posições diferentes. Essas mudanças resultam em ligações hidrogênio de maior extensão e ordenação em uma estrutura mais estável (KROON-BATENBURG e KROON, 1997). Algumas distâncias referentes ao

arranjo dos átomos no plano para a celulose I (nativa) e celulose II (mercerizada) estão apresentadas na FIGURA 12 (KRÄSSIG, 1993).

FIGURA 11- Representação da estrutura da celulose I, mostrando possíveis interações dos íons sódio nas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares

FONTE: FINK, H. P.; WALENTA, E.; KUNKE, K.; MANN, G. Wide angle X-ray and soli state ^{13}C NMR studies of cellulose alkalization. In: KENNEDY, J. F.; PHILLIPS, G. O., *et al* (Ed.). Cellulose and cellulose derivatives: Physicochemical aspects and industrial applications. Cambridge: Woodhead Publishing, 1995. 523-528.

FIGURA 12 - Algumas distâncias referentes ao arranjo os átomos no plano para celulose I (nativa) e celulose II (mercerizada)

FONTE: KRÄSSIG, H. A. Cellulose: structure, accessibility and reactivity. Amsterdam: Gordon and Breach, 1993. 240 p.

Além do processo de mercerização aumentar a reatividade e a acessibilidade das cadeias de celulose presentes nas fibras celulósicas, ele pode promover a purificação da celulose, removendo hemiceluloses e impurezas como ceras, pectinas, restando. Quando o processo atinge eficiência máxima, gera apenas a α -celulose, que é a celulose pura (SHIBAZAKI *et al.*, 1997; STANA-KLEINSCHKEK *et al.*, 1999). O processo usualmente ocorre sob agitação mecânica, mas no presente estudo também foi investigado o efeito do uso de ultrassom.

2.3.1.1 Ultrassom de alta intensidade

O som de frequência que está além da sensibilidade do ouvido humano, e compreendido entre 20kHz e 100MHz, é chamado de ultrassom, que é o principal foco de estudos da sonoquímica, estudos. Entre suas principais utilizações estão, a síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise (formação de radicais livres), formação de sonogéis e preparação de catalisadores (DAVIDSON *et al.*, 1987; MASON e LORIMER, 1989).

A FIGURA 13 mostra uma representação esquemática do efeito das ondas sonoras de ultrassom de alta intensidade em um meio reacional.

FIGURA 13- Representação esquemática da propagação das ondas ultrassônicas em um líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação

FONTE: 1. MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. Chemical Society Reviews, v. 26, n. 6, p. 443-451, 1997. 2. SANTOS, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J.-L. The Power of Ultrasound. In: (Ed.). Ultrasound in Chemistry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. 1-16.

As ondas ultrassônicas geram energia sonora via uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas nas moléculas através do meio que atravessa. A propagação de ondas acústicas são definidas por sua frequência e amplitude, e geram energia mecânica que não é

absorvida pelas moléculas. Quando estas ondas acústicas são propagadas através de meios líquidos, é provocado o fenômeno conhecido como cavitação, que ocorre quando, durante o ciclo de rarefação, a energia aplicada for suficientemente elevada, podendo assim superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido formando as bolhas cavitacionais. Durante os ciclos sucessivos estas bolhas crescem e absorvem o vapor ou gás do meio até atingirem um ponto de equilíbrio, em que a frequência de ressonância da bolha é próxima à frequência aplicada. O campo acústico gerado para a bolha não é estável, o que pode levar a uma expansão súbita da bolha até um tamanho instável e seu colapso violento pode ocorrer em menos que 10^{-6} s, liberando grande quantidade de energia, levando a temperatura e pressões elevadas. (MASON, 1997; SANTOS *et al.*, 2008).

A aplicação da tecnologia de ultrassons deve ser considerado como uma fonte auxiliar de energia (como agitação ou aquecimento) em processos de extração sólido-líquido (GARCÍA *et al.*, 2011). Na aplicação como pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, pode-se considerar que ainda não está consolidada, porém já tem sido observado que o ultrassom pode melhorar a eficácia de tratamentos clássicos, tais como o tratamento alcalino (SUBHEDAR e GOGATE, 2014).

Como mencionado anteriormente, o processo de cavitação gera bolhas de gás com alta temperatura e pressão. Quando estas bolhas entram em colapso, grande quantidade de energia é liberada, fazendo com que ocorra, em solução aquosa, a formação de radicais hidroxila e de peróxido de hidrogênio (RIESZ *et al.*, 1985; BARTERI *et al.*, 2004). As possíveis reações que podem estar presentes no meio são apresentadas na FIGURA 14.

FIGURA 14– Possíveis reações que podem ocorrer a partir do processo de cavitação em meio aquoso

FONTE – 1 BARTERI, M.; DIOCIAIUTI, M.; PALA, A.; ROTELLA, S. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. *Biophysical Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 35-42, 2004.
2 RIESZ, P.; BERDAHL, D.; CHRISTMAN, C. L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environmental Health Perspectives*, v. VOL. 64, p. 233-252, 1985.

No meio, pode ocorrer um acúmulo dos radicais hidroxila e de peróxido de hidrogênio, e, no caso de contato com a biomassa lignocelulósica, podem auxiliar na remoção de lignina e hemiceluloses (SUL'MAN *et al.*, 2011). O impacto e a energia liberada durante esta colisão, podem acelerar a extração de lignina e de hemiceluloses, podendo levar a uma redução no tempo de processamento (ZHANG *et al.*, 2008).

(SUBHEDAR e GOGATE, 2014) obtiveram cerca de 80%, no rendimento de deslignificação via álcali utilizando 100W de potência e 70 min de tratamento. Cerca de 80% de tempo a mais foi utilizado no mesmo estudo, durante o tratamento via álcali sem ultrassom, para obter apenas 40% de deslignificação da biomassa.

(GARCÍA *et al.*, 2011) avaliou a eficácia de diferentes processos de deslignificação de biomassa lignocelulósica (organosolve, alcalino, e auto hidrólise) com a utilização de ultrassom. Todos os tratamentos foram aplicados a temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao final do estudo, foi concluído que a aplicação de ultrassom melhorou o rendimento e seletividade dos processos estudados, e que a lignina obtida não sofreu alterações significativas nas suas propriedades físico-químicas, quando comparadas as propriedades da lignina extraída pelos mesmos tratamentos sem ultrassom.

2.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL

Resíduos agrícolas são fontes ricas de celulose e hemiceluloses, sendo que, uma aplicação potencial destes componentes consiste na produção de combustíveis a partir dos mesmos.

Pesquisas para a conversão da celulose, principal componente do material lignocelulósico e mais abundante carboidrato da biosfera, em etanol podem ser desenvolvidas por diferentes processos. A sacarificação e a fermentação podem ser realizadas separadamente, em que os dois processos são separados fisicamente um do outro, ou seja, em um reator ocorre a sacarificação e em outro a fermentação. Outro processo é a sacarificação e fermentação simultânea, em que os dois processos ocorrem dentro do mesmo reator. Ainda pode-se utilizar um único organismo para produzir enzimas necessárias para executar tanto a hidrólise quanto a fermentação através de um bioprocessamento consolidado, sendo que para

este processo pode ser utilizado bactérias e/ou leveduras (XU *et al.*, 2009; VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

No presente trabalho, foram realizados estudos sobre a produção de açúcares a partir da polpa celulósica de sisal, os quais podem ser convertidos posteriormente em etanol. Neste estudo, somente a etapa de conversão a açúcares foi considerada.

A conversão da celulose em glicose pode ser feita sob catálise enzimática, como ocorreu no presente estudo.

Enzimas correspondem a um grupo de proteínas que possuem atividade catalítica, tendo alto grau de especificidade por seus substratos. Podem acelerar as reações químicas de forma significativa, e funcionar sob condições brandas de temperatura e pH (NELSON e COX, 2004). O grupo de enzimas utilizado para a realização da hidrólise enzimática da celulose é chamado de *celulases*, as quais podem ser produzidas tanto por bactérias como por fungos (BÉGUIN e AUBERT, 1994). A hidrólise enzimática corresponde a um sistema heterogêneo no qual *celulases* em solução reagem com a celulose insolúvel, que contém regiões altamente organizadas (regiões cristalinas) e outras com grau de organização intermediário (regiões não cristalinas), diminuindo assim, o comprimento e o diâmetro das fibras celulósicas (LACERDA, 2012).

Quando comparada à catálise ácida, a via ação enzimática envolve condições mais brandas, porém a biomassa lignocelulósica necessita ser pré-tratada, para que ocorra um aumento na acessibilidade das enzimas ao substrato, no caso a celulose. No presente estudo, a polpa celulósica, previamente deslignificada, foi submetida à mercerizada. As condições amenas de pH, temperatura e pressão, viabilizam a ação das enzimas *celulases* sobre a celulose, podendo resultar em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis e na ausência de subprodutos, devido à especificidade das enzimas (CARVALHO *et al.*, 2013).

A partir da conversão da celulose utilizando *celulases*, foram feitas investigações sobre as propriedades físico-químicas destas enzimas e os mecanismos envolvidos nos processos enzimáticos. Entre estudos, constam também buscas sobre o entendimento do método de obtenção das enzimas, e a relação entre substrato-enzima. As respostas a estas questões não atenderão apenas ao interesse acadêmico, já que apontam soluções para o consumo energético mundial (COUGHLAN, 1992; MODENBACH e NOKES, 2013).

2.2.1 Enzimas

As enzimas correspondem a biocatalisadores que são capazes de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado, que dará origem a um produto, aumentando a velocidade da reação (COELHO *et al.*, 2008; RAO *et al.*, 2014).

Para a obtenção das enzimas são utilizados processos que são classificados conforme a quantidade de água do meio: fermentação submersa (FSM), fermentação em estado sólido (FES) ou semi-sólido (FMSS).

As FSM são tradicionalmente utilizadas para produção de enzimas a partir de bactérias, pois há melhor controle de alguns parâmetros importantes do processo como pH e crescimento celular, além da recuperação de enzimas extracelulares ser facilitada (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A principal característica é a quantidade de água usada no meio de crescimento, que é superior a 95% em relação a massa presente no meio.

Já as FES e/ou FMSS se referem à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido (substrato ou meio umidificante) está ligado a ela, com um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células e, ao mesmo tempo, não exceda à máxima capacidade de ligação de água com a matriz sólida. A umidade desses meios geralmente não ultrapassa 70%, o que limita bastante o número de microrganismos que são capazes de adaptar-se a este processo. Porém, os fungos, na sua grande maioria filamentosos, são bastante tolerantes a esse ambiente (PANDEY, 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006). Neste trabalho, foi utilizada a técnica de fermentação no estado semi-sólido para a obtenção das enzimas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* As enzimas obtidas foram testadas em reações de hidrólise, a fim de comparar os resultados com aqueles obtidos com celulasas.

A característica mais marcante da catálise enzimática é que a enzima se liga especificamente aos seus substratos, e a reação ocorre nos limites do complexo enzima-substrato. Portanto, é necessário entender como a enzima atua, como é a estrutura da enzima nativa e também do complexo enzima-substrato (COELHO *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Celulases: mecanismo e estrutura

As enzimas utilizadas para a hidrólise da celulose são chamadas de celulases, as quais são compostas por domínios catalíticos e módulos de ligação à celulose (CBM, do inglês *carbohydrate-binding module*). A principal função do CBM é a imobilização da enzima na superfície polimérica aumentando, portanto, a concentração local do substrato e levando a uma catálise mais eficiente (ŠIROKÝ *et al.*, 2012). Quando ocorre a remoção do CBM, consequentemente ocorre diminuição da atividade enzimática na celulose devido à diminuição na capacidade de ligação do substrato com o domínio catalítico (MCLEAN *et al.*, 2002). Na FIGURA 15 é representado de forma esquemática a estrutura de uma enzima celulase interagindo com a celulose, mostrando o domínio catalítico, o ligante substrato-enzima e o CBM.

FIGURA 15– Representação da interação entre uma enzima *celulase* e a celulose, baseados em dados cristalográficos.

FONTE: BECKHAM, G. T.; MATTHEWS, J. F.; BOMBLE, Y. J.; BU, L.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; NIMLOS, M. R.; CROWLEY, M. F. Identification of Amino Acids Responsible for Processivity in a Family I Carbohydrate-Binding Module from a Fungal Cellulase. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 3, p. 1447-1453, 2010.

A FIGURA 16 apresenta um possível mecanismo para a hidrólise da celulose à glicose. Foi postulado que um componente desconhecido do sistema celulase, chamado de CI, fator de intumescimento, promove a abertura da matriz celulósica, viabilizando que as enzimas hidrolíticas despolimerizem a celulose. Ligado a este processo, foi criado o termo amorfogênese (*amorphogenesis*), para sugerir um mecanismo no qual ocorre o intumescimento do substrato celulósico, levando a uma redução do grau de agregação fibrilar e/ou da cristalinidade. Desta forma, uma superfície mais acessível é criada, ou seja, a amorfogênese aumenta a reatividade do substrato fibroso pois aumenta a quantidade de cadeias celulósicas acessíveis às enzimas, iniciando então a fragmentação da celulose (ARANTES e SADDLER, 2010).

FIGURA 16 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a despolimerização da celulose por celulasas.

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

As celulasas são compostas por três classes de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, que agem simultaneamente na degradação da celulose em glicose (FIGURA 16).

As endoglucanases são responsáveis pelo início da hidrólise da celulose e pela rápida solubilização dos fragmentos menores gerados (FIGURA 16). Tais enzimas hidrolisam regiões internas da estrutura não cristalina da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais nas cadeias, sendo um redutor e outro não redutor (FIGURA 3) (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996;).

As enzimas exoglucanases são divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucohidrolases (GHs). As CHs são capazes de liberar glicose diretamente da celulose, porém são raras. E as GBHs são responsáveis pela liberação de dímeros de glicose (celobiose) a partir das extremidades da celulose. As exoglucanases são responsáveis pela ruptura física da celulose tornando as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (JUTURU e WU, 2014).

As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis como a celobiose, gerada pela hidrólise da celulose, a glicose. Porém, essas enzimas não são consideradas como celulasas legítimas, uma vez que agem sobre substratos solúveis (LACERDA, 2012).

Esse sistema complexo de enzimas celulasas deve ser mantido estável para manter a atividade celulítica elevada. Enquanto a concentração de celobiose e glicose aumenta gradualmente no meio reacional, as atividades dessas enzimas são inibidas por estes produtos, tendo como resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo de sacarificação (ZHANG e LYND, 2004). Certas concentrações de glicose (1-14 mM) inibem a ação das β -glicosidases, aumentando a concentração de celobiose no meio reacional. Já a celobiose é um potente inibidor das exoglucanases, que resulta em limitações severas à hidrólise da celulose (CANILHA *et al.*, 2010).

O mecanismo de catálise no sítio ativo ocorre de maneira similar, tanto para as endoglucanases quanto para as exoglucanases, pois os aminoácidos constituintes dos sítios ativos atuam como ácidos e bases de Brønsted em reações ácido-base (MCCARTER e STEPHEN WITHERS, 1994).

São conhecidos dois mecanismos de hidrólise das ligações glicosídicas. Em um dos mecanismos, ocorre a inversão do carbono anomérico (carbono da ligação glicosídica), e em outro mecanismo, ocorre a retenção do mesmo. Em ambos os mecanismos é utilizado um par de ácidos carboxílicos no sítio ativo e a posição do doador de prótons é idêntica. O que difere é a distância das ligações hidrogênio do oxigênio glicosídico (MCCARTER e STEPHEN WITHERS, 1994; DAVIES e HENRISSAT, 1995).

Em sítios ativos em que a ligação hidrogênio apresenta comprimento entre 0,65nm e 0,95nm ocorre a inversão do carbono anomérico, gerando um anômero α , e a ligação é

hidrolisada em apenas uma etapa (MCCARTER e STEPHEN WITHERS, 1994). A FIGURA 17 apresenta a representação deste mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica para sítios ativos de 0,65-0,95nm.

FIGURA 17– Representação do mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica com a inversão de configuração do carbono anomérico

FONTE: Adaptado de MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994.

Como observado na FIGURA 17, a molécula de água presente no meio reacional é ativada pela base (-COO^-), atacando logo a seguir o carbono anomérico, ao mesmo tempo em que o par de elétrons da ligação glicosídica retira um próton do grupo ácido (-COOH). Esta substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}1$ produz um produto com a estereoquímica oposta ao substrato (DAVIES e HENRISSAT, 1995).

A FIGURA 18 mostra a representação deste mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica para sítios ativos de 0,55nm.

FIGURA 18 –Representação do mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica com a retenção de configuração do carbono anomérico

FONTE: Adaptado de MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Current Opinion in Structural Biology, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994.

Como observado na FIGURA 18, o grupo básico (-COO^-) ataca diretamente o carbono anomérico, enquanto o par de elétrons do átomo de oxigênio abstrai um próton do grupo ácido (-COOH), formando o intermediário enzima-carboidrato. Para o restabelecimento do sítio ativo, o grupo carboxilato ataca uma molécula de água do meio, cujo oxigênio ataca o carbono anomérico gerando um produto com a mesma estereoquímica que o substrato (MCCARTER e STEPHEN WITHERS, 1994; DAVIES e HENRISSAT, 1995).

A atuação conjunta das enzimas do complexo de celulasas apresenta um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, existe um efeito sinérgico. Estudos realizados sobre sinergia entre enzimas celulasas purificadas mostra que a sinergia depende da proporção individual das enzimas, da concentração e das propriedades químicas do substrato (WOODWARD, 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar a valorização da fibra lignocelulósica de sisal, abundante no país, a partir do aprofundamento de estudos sobre a hidrólise enzimática da polpa celulósica obtida a partir desta fibra

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Aprofundar estudos sobre o processo de mercerização, via agitação mecânica e via ondas de alta intensidade (ultrassom), como pré-tratamento da polpa de partida, visando obter uma polpa celulósica mais reativa e acessível aos catalisadores enzimáticos.

-Hidrólise da polpa celulósica mercerizada sob catálise enzimática, usando enzimas comerciais.

-Obtenção de catalisadores enzimáticos a partir do cultivo do fungos *Aspergillus sp*, visando aplicação na hidrólise da polpa celulósica mercerizada, para comparar com resultados obtidos usando celulase comercial.

-Análise dos licores de açúcares gerados pela hidrólise enzimática da polpa celulósica,

-Caracterização das fibras celulósicas remanescentes (não reagidas) visando investigar como as enzimas agem na polpa celulósica de sisal durante a reação de hidrólise.

4. EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

A polpa celulósica utilizada neste trabalho foi obtida a partir da fibra lignocelulósica de sisal, que possui entre 7-10% de lignina (PAIVA e FROLLINI, 2006), e foi gentilmente cedida pela empresa Lwarcell (Lençóis Paulista, SP). Nesta empresa, a fibra foi submetida a processo de polpação (ou deslignificação) do tipo Kraft (já descrito neste texto) e sequência de branqueamento do tipo ECF (Elemental Chlorine Free), o que levou a uma polpa com alvura ISO de 86%, comprimento e espessura médios de, respectivamente, 2,9 mm e 18,4 μ m, segundo informações da empresa. Nesta polpa, seguindo a norma TAPPI T222-om02, não foi detectada a presença de lignina Klason insolúvel (LACERDA, 2012).

Todas as amostras de polpa de celulose foram trituradas em moinho Marconi (MA048) e secas em estufa de circulação a 105°C por 4h, antes de serem utilizadas.

As polpas celulósicas utilizadas para as reações de hidrólises enzimáticas foram submetidas ao tratamento de mercerização. Este tratamento foi realizado para obter polpas com menores valores de índice de cristalinidade (Ic) e mais alto teor de α -celulose, comparativamente a polpa de partida. As condições de tratamento das polpas utilizadas estão descritas na TABELA 2. Também foram realizadas reações com celulose microcristalina comercial (PH 101- comprecel- Valdequímica) e papel filtro qualitativo comercial (Umifil), para avaliar a ação das enzimas nas reações de hidrólise usando celulosas com diferentes características. O uso de celulose microcristalina e papel filtro foi decidido durante o transcorrer deste estudo, como consequência de resultados obtidos na aplicação de enzimas fúngicas, não comerciais, conforme será posteriormente detalhado (Resultados e Discussão)

Como reagentes e solventes foram utilizados:

- Hidróxido de sódio em lentilhas (Qhemis), no processo de mercerização e teor de α -celulose;
- Ácido acético glacial (Mallinckrodt), na determinação do teor de α -celulose;
- Etilenodiamina cúprica (Cuen) 2%, (Qeel), na preparação de soluções de celulose para análises viscosimétricas, visando determinação de massa molar média;

- Citrato de sódio e ácido cítrico (Qhemis) para a preparação de tampão citrato, usado nas reações de hidrólise enzimática;
- Complexo enzimático Accellerase 1500 (Genencor), usado nas reações de hidrólise enzimática comercial;
- Na análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram usados: ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Merck Chemicals). Os padrões utilizados foram celobiose, D-glicose (Sigma-Aldrich), D-xilose (Sigma-Aldrich), L-arabinose (Sigma-Aldrich), ácido acético (49-51%, Sigma-Aldrich), ácido fórmico (49-51%, Sigma-Aldrich), todos de grau cromatográfico.
- Solução de ácido dinitrosalicílico utilizado nas determinações açúcares redutores pelo método Miller ou DNS (MILLER, 1959). A solução de ácido dinitrosalicílico foi preparada utilizando NaOH (Synth), tartarato duplo de sódio e potássio (Vetec) e ácido dinitrosalicílico (Vetec).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da polpa de partida

A polpa de partida foi caracterizada segundo o teor de α -celulose, hemiceluloses, índice de cristalinidade (Ic), massa molar média viscosimétrica (MMvis), comprimento e espessura médios, também sendo avaliada a superfície das fibras via microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os procedimentos utilizados nas caracterizações são descritos nos itens seguintes.

4.2.1.1 Teor de α -celulose e hemiceluloses

A celulose isenta de hemiceluloses é chamada de α -celulose e é insolúvel em solução de NaOH 17,5%. Nessa análise, em 1g de polpa celulósica foram adicionados 10 mL de solução 17,5% de NaOH, e deixados em repouso por 2 min a temperatura ambiente. A seguir, foram

adicionados mais 10 mL da mesma solução alcalina, misturando por 8 min e deixando em repouso por mais 20 min. Essa suspensão foi lavada com 40 mL de água e filtrada a vácuo, em cadinho de porosidade (40 a 100µm). Logo a seguir, o resíduo foi lavado com 200 mL de uma solução de ácido acético diluído (20%) para neutralizar a base residual e 200 mL de água para eliminar os sais da amostra. O filtro foi levado à estufa a 105° C por 4h e pesado. A diferença entre a massa inicial e a final é equivalente à massa de α-celulose na polpa. O teor de hemiceluloses foi obtido pela diferença entre a massa total menos a massa de α-celulose, encontrada na amostra de polpa celulósica. Esta análise foi realizada em triplicata.

4.2.1.2 Massa Molar Média viscosimétrica (MMvis)

O método viscosimétrico é baseado na resistência ao fluxo de uma solução através de um capilar. Os valores de massa molar média (MMvis) e grau de polimerização médio (GP) da celulose podem ser determinados a partir do tempo de escoamento da solução. Os valores de MMvis e GP são valores médios, devido ao fato que as cadeias da celulose apresentam comprimentos diferentes entre si, e portanto se tratar de uma mistura de macromoléculas polidispersas (KLEMM *et al.*, 1998).

O grau médio de polimerização, para a celulose, representa o número de unidades de β-D-glicose presentes nas cadeias e pode variar dependendo da fonte da qual se extraiu o polissacarídeo, e também depende do tratamento realizado na celulose (HALLAC e RAGAUSKAS, 2011).

Segundo a lei de Hagen-Poiseuille (COLLINS *et al.*, 1973) o coeficiente de viscosidade de um líquido através de um capilar pode ser expresso por:

(1)

$$\eta = \frac{\pi \times r^4 \times t \times P}{8VL}$$

sendo P a pressão hidrostática sobre o líquido, V o volume do líquido, t o tempo em que o líquido flui através do capilar de raio r e de comprimento L.

Ainda, $P = h \cdot \rho \cdot g$; com h = altura da coluna de líquido, ρ = densidade do líquido e g = aceleração da gravidade.

A lei de Hagen-Poiseuille, quando aplicada a um líquido de viscosidade desconhecida e a um líquido padrão, resulta na seguinte equação que permite determinar a viscosidade relativa da solução:

(2)

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_1}{\eta_0} = \frac{\rho_1 \times t_1}{\rho_0 \times t_0}$$

sendo que η_1 e η_0 são as viscosidades da solução e do solvente, ρ_1 e ρ_0 são as densidades da solução e do solvente, e t_1 e t_0 são os tempos de escoamento da solução e do solvente, respectivamente.

Em soluções diluídas, como as utilizadas no presente trabalho, em que as densidades do solvente e a da solução são aproximadamente iguais, a viscosidade relativa, η_{rel} , corresponde aproximadamente à razão entre o tempo de escoamento da solução de polímero e o tempo de escoamento do solvente (MANO, 1985).

(3)

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_1}{\eta_0} \cong \frac{t_1}{t_0}$$

Sendo: η_1 = viscosidade da solução; t_1 = tempo de escoamento da solução; η_0 =viscosidade do solvente; t_0 = tempo de escoamento do solvente;

Partindo-se do valor obtido para viscosidade relativa, o valor da viscosidade intrínseca é calculado através da equação de Martin (IPT, 1996):

(4)

$$\log \frac{\eta_{sp}}{c} = \log[\eta] + k \times [\eta] \times c$$

em que c é a concentração da solução do polímero; η_{sp} é a viscosidade específica, igual a $(\eta_{rel} - 1)$; $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca; k corresponde a uma constante, que para o sistema celulose/cuproetilenodiamina é igual a 0,13.

O grau de polimerização pode ser obtido a partir da viscosidade intrínseca, com o auxílio da seguinte equação (BILLMEYER JUNIOR, 1984):

(5)

$$GP^{0,905} = 0,75 [\eta]$$

A massa molar da anidroglicose é 162 g.mol⁻¹, tem-se, portanto que 162 x GP leva à massa molar média viscosimétrica da celulose:

(6)

$$MM_{visc} = 162 \times GP$$

As massas molares médias das polpas foram determinadas pelo método viscosimétrico. Assim, mediu-se o tempo de escoamento do solvente e, em seguida, o tempo de escoamento de uma solução de celulose 0,004 g.mL⁻¹ utilizando um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, f=0,63 mm), AVS -350 da marca SchottGeräte, a 25°C, e o sistema de solventes Cuen/água (1:1).

Os escoamentos foram realizados em triplicata e, a partir dos valores dos tempos de escoamento, pode-se calcular o grau de polimerização e a massa molar média viscosimétrica da celulose.

4.2.1.3 Determinação do Índice de Cristalinidade por difração de raios-X (I_c)

A relação entre as regiões cristalinas e não cristalinas de um polímero pode ser determinado por difração de raios X, sendo esta relação usualmente chamada de grau ou índice de cristalinidade (I_c).

Para a determinação do índice de cristalinidade foi utilizado um Difrátometro Universal de raios X modelo URD-6, CARL ZEISS JENA, a potência 40 kV/20 mA e λ(CuKα) = 1,5406 Å. As amostras de polpa celulósica foram previamente secas em estufa de circulação a 105°C por 4h e analisadas, obtendo-se os difratogramas de raios-X. A partir dos difratogramas de raios X foi possível observar a presença de picos característicos da celulose, referente aos planos cristalográficos, ângulos de Bragg (2θ). O índice de cristalinidade pode ser calculado utilizando-se a equação descrita por Buschle-Diller e Zeronian(BUSCHLE-DILLER e ZERONIAN, 1992):

(7)

$$I_c = 1 - \frac{I_1}{I_2}$$

Sendo: I_c = índice de cristalinidade;

I_1 = intensidade do mínimo de difração;

I_2 = intensidade do máximo de difração

I_1 corresponde ao valor da linha base do difratogramas referente à parte não cristalina da celulose, e I_2 ao valor do pico de difração referente à parte cristalina (FIGURA 19).

FIGURA 19– Difratograma típico de celulose de sisal sem tratamento

FONTE: DE PAULA, M. P. Hidrólise ácida de polpa de sisal: características do processo heterogêneo e estudo das reações correlatas. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

A TABELA I apresenta os valores referentes aos ângulos 2θ utilizados como base para o cálculo do índice de cristalinidade da polpa celulósica de partida.

TABELA I – Valores referentes aos ângulos 2θ utilizados nos cálculos de índice de cristalinidade para as polpas celulósicas de partida e mercerizadas (LACERDA *et al.*, 2013).

	I_1 (2θ)	I_2 (2θ)
Celulose de partida	18° a 19°	22° a 23°
Celulose mercerizada	13° a 15°	18° a 22°

4.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para investigar a morfologia dos materiais. O microscópio eletrônico possui uma coluna que opera em alto vácuo, consistindo de uma fonte de elétrons, lentes eletromagnéticas e bobinas de varredura. A fonte de elétrons normalmente corresponde a um filamento de tungstênio, que produz elétrons que são acelerados a uma energia na faixa de 1 a 40 KeV. Assim, ao incidir na superfície da amostra, ocorre uma interação e parte do feixe é refletida e coletada por um detector, que converte este sinal em imagem (DEDAVID *et al.*, 2007).

Para esta análise foi utilizado o equipamento LEO-440, com filamento de tungstênio para gerar elétrons. As amostras foram secas em estufa com circulação de ar por 4h, colocadas em suporte e recobertas com uma fina camada de ouro. Devido à celulose não ser um material condutor de elétrons, é necessária uma aplicação de uma fina camada de material condutor sobre a amostra, no caso, ouro.

4.2.1.5 Comprimento e espessura médios das fibras

A variação do comprimento e espessura médios das fibras presentes na polpa de partida, assim como das não reagidas durante o processo de hidrólise, conforme posteriormente descrito, foi acompanhada com o uso de um equipamento MorFi Compact (Techpap), que detecta fibras com dimensões na escala de micrômetros.

A análise acontece em ambiente restrito apenas às fibras, o que permite uma medição estatística confiável de milhares de fibras em alta velocidade, e com determinação precisa das características relevantes de sua forma. Assim, as polpas celulósicas foram suspensas em água e analisadas usando o equipamento descrito na FIGURA 20, que apresenta alta resolução em sua análise de fibras em geral, incluindo as lignocelulósicas.

FIGURA 20– Analisador de fibras (MorFi Compact – Techpap)

Os dados obtidos por esse equipamento provêm da análise de milhões de fibras que, podem gerar gráficos de densidade de ocorrência ($\text{milhões.grama}^{-1}$), o que torna possível a construção de um mapa de densidade, ou seja, um gráfico em três dimensões que apresenta as seguintes características: no eixo x é apresentado o comprimento médio, no eixo y a espessura média e no eixo z os valores correspondentes à densidade de ocorrência das fibras.

4.2.2 Mercerização

Visando melhorar a eficiência da reação de hidrólise enzimática, com o aumento da acessibilidade das cadeias de celulose ao catalisador, por exemplo devido a diminuição da cristalinidade da celulose, a polpa celulósica de sisal foi submetida à mercerização (LACERDA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2013).

Em estudos anteriores (DE PAULA *et al.*, 2012), o tempo de tratamento foi diversificado, usando 20 g de polpa celulósica de sisal, mantida em suspensão sob agitação mecânica, em 1L de solução 20% de hidróxido de sódio a 50°C. Foi observado que em 3h de tratamento ocorreu uma extensiva, porém não total, extração de hemicelulose, assim como

a diminuição da cristalinidade e da massa molar média. No presente estudo, estas condições foram mantidas.

Visando avaliar o efeito do uso de ultrassom, em substituição à agitação mecânica durante a mercerização, o material celulósico também foi submetido ao efeito de ultrassom.

Para o tratamento de mercerização utilizando agitação mecânica, as seguintes condições foram empregadas: 20g de polpa celulósica foram agitadas em 1L de solução de hidróxido de sódio 20%, a uma temperatura de 50° C, durante 3h.

Visando incrementar o conhecimento já adquirido em estudos anteriores, amostras de polpa celulósica foram retiradas de 20 min em 20 min e caracterizadas em relação a α -celulose, índice de cristalinidade, massa molar viscosimétrica, comprimento e espessura, e avaliação da superfície das fibras via MEV, conforme descrito anteriormente para a polpa de partida (item 4.2.1).

Para o tratamento de mercerização utilizando ultrassom foram empregadas as seguintes condições: 20g de polpa celulósicas foram submetidas ao efeito das ondas sonoras de alta intensidade em 1L de solução de hidróxido de sódio 20%, a temperatura ambiente. Como o processo faz com que a temperatura seja alterada, a temperatura do meio variou entre 5 e 6°C acima da temperatura ambiente, esta variação foi observada usando um termômetro. O tempo de tratamento via ultrassom totalizou 1h, sendo que alíquotas foram retiradas de 10 em 10 min e caracterizadas conforme descrito para a polpa mercerizada via agitação mecânica.

O equipamento da Sonics Vibra-cell, usado no presente estudo, apresenta uma frequência máxima de 20kHz e potência de 500W, sendo que foram utilizadas amplitudes de 20% e 40% neste estudo. As condições foram escolhidas após explorar as possibilidades oferecidas pelo equipamento, assim como considerando a resistência do equipamento às condições selecionadas, sem que ocorressem danos ao mesmo, conforme ocorreu em estudos anteriores.

4.2.2.1 Caracterização das polpas celulósicas mercerizadas

As polpas celulósicas mercerizadas foram caracterizadas segundo o teor de α -celulose e hemiceluloses (4.2.1.1), massa molar média (MMvis) (4.2.1.2), cristalinidade (Ic) (4.2.1.3), valores médios de comprimento e espessura (4.2.1.4). A superfície foi avaliada via microscopia eletrônica de varredura (MEV) (4.2.1.5).

4.2.3 Hidrólise enzimática

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas visando à produção de açúcares fermentescíveis, que corresponde à primeira etapa da produção do bioetanol. Para este fim, foi usado o complexo enzimático Accellerase I 500 de *Trichoderma reesi* (Genencor). De acordo com o fabricante este complexo contém exoglucanases, endoglucanases, β -glicosidases e hemicelulases, possuindo melhor estabilidade operacional entre 50° e 65° C, em uma faixa de pH de 4,0 e 5,0¹.

Também foi utilizado o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* O cultivo do fungo e a obtenção das enzimas não comerciais foram realizados no Grupo de Química Orgânica e Biocatálise (Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo), sob supervisão do professor Dr. André Meleiro Porto, visando a produção de celulasas necessárias para o estudo da hidrólise da polpa celulósica de sisal, como alternativa ao uso de celulasas comerciais. A produção e extração deste caldo utilizado é descrito na sequência deste texto.

4.2.3.1 Hidrólise enzimática utilizando complexo enzimático Accellerase I 500

Todas as reações de hidrólise enzimática foram realizadas em frascos de 250 mL (Shott). Para cada 1g de polpa celulósica foram utilizados 50 mL de tampão de citrato 0,01

¹http://www.genencor.com/fileadmin/user_upload/genencor/documents/ACCELLERASE_R__BG_0020209.pdf

mol.L⁻¹, concentração que proporciona um pH 5. A suspensão (polpa celulósica e tampão) foi previamente esterilizada em autoclave (Marconi) (121°C, 20 min)(LACERDA, 2012). Após esterilizada a suspensão, esta foi mantida a 50°C em uma câmara incubadora com agitação orbital (Marconi MA410). Este pH e temperatura foram escolhidos dentro da faixa recomendada pelo fornecedor do complexo enzimático (ph 4-6, T 50-65°C). Depois de estabilizada a temperatura, foi adicionada ao sistema as enzimas.

As reações, foram monitoradas por 48h, em que foram retiradas alíquotas de 10min em 10min nos primeiros 30min de reação, e depois de 30min em 30min até que a reação completasse um total de 6h. Nas 3h seguintes foram retiradas alíquotas de 1h em 1h, depois de 2h em 2h nas próximas 6h e, por fim, de 8h em 8h até completar o tempo de 48h de reação. As reações foram repetidas duas vezes.

Nas reações utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica, foram utilizadas três concentrações diferentes do complexo enzimático (0,5, 0,7 e 0,9 mL do complexo enzimático comercial.g⁻¹ de polpa celulósica mercerizada). Para a escolha destas concentrações, novamente, foram seguidas as informações na ficha técnica fornecida pela empresa concedente.

Ainda, utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica, como consequência de resultados obtidos, duas outras condições foram consideradas. Estas duas reações foram realizadas com 1g de polpa celulósica de sisal mercerizada e a concentração de enzima 0,9 mL de complexo enzimático.g⁻¹polpa celulósica durante 48h de reação a 50°C. Porém, após 15h de reação, aos frascos da primeira reação foram adicionados mais 1g de polpa celulósica de sisal, e aos frascos da segunda reação mais 0,5mL de complexo enzimático comercial.

Reações utilizando a polpa celulósica tratada via ultrassom, 20% e 40% de amplitude, também foram realizadas. Para estas foi utilizado apenas a de concentração de 0,9mL do complexo enzimático comercial.g⁻¹ de polpa celulósica mercerizada. Esta condição foi escolhida a partir dos resultados obtidos para a polpa que foi mercerizada sob agitação mecânica (descritos em Resultados e Discussão).

Ainda, em decorrência dos resultados obtidos usando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, reações utilizando papel filtro e celulose microcristalina foram realizadas com a concentração de 0,5mL do complexo enzimático comercial g⁻¹ de polpa celulósica, mantendo-se as demais condições já descritas para a hidrólise

enzimática (48h, 50° C), a fim de viabilizar comparação com resultados obtidos para hidrólise da polpa de sisal mercerizada, usando complexo enzimático comercial.

Todas as alíquotas foram filtradas, separando o licor da polpa celulósica não reagida. A polpa não reagida foi lavada com água destilada, seca a 105°C e caracterizada em relação a MMvis, Ic, comprimento e espessura e avaliada a morfologia via MEV (4.2.3.3.1). O licor foi caracterizado via CLAE e DNS (4.2.3.3.2).

4.2.3.2 Hidrólise enzimática utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

4.2.3.2.1 Obtenção das enzimas fúngicas

4.2.3.2.1.1 Cultivo do fungo em meio de cultura contendo extrato de malte

O meio sólido foi preparado utilizando-se extrato de malte (30,0 g.L⁻¹), ágar (15,0 g.L⁻¹) em água de mar artificial. O pH do meio foi ajustado com auxílio de um pHmetro, previamente calibrado, utilizando soluções de HCl 0,5 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,7 mol.L⁻¹. Posteriormente, a solução foi autoclavada a 120 °C durante 20 min. Foram vertidos 25 mL de meio em cada placa de Petri, previamente esterilizada em autoclave. As placas vedadas permaneceram durante 24 h em estufa a 34 °C para verificar se não foram contaminadas, o que é indicado pela proliferação de alguma espécie de fungo.

Composição da água do mar artificial utilizada: CaCl₂.2H₂O (1,36 g.L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (9,68 g.L⁻¹), KCl (0,61 g.L⁻¹), NaCl (30,0 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,140 g.L⁻¹), Na₂SO₄ (3,47 g.L⁻¹), NaHCO₃ (0,170 g.L⁻¹), KBr (0,10 g.L⁻¹), SrCl₂.6H₂O (0,04 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0,03 g.L⁻¹) (MOUAD, 2009).

O meio de cultura de extrato de malte foi preparado para obter as colônias puras dos fungos. O meio de cultura do *Aspergillus sp.* também foi preparado em água do mar artificial devido à presença de vários sais que favorecem o crescimento microbiano.

Posteriormente, o fungo *Aspergillus* sp. foi inoculado nos meios de cultura de extrato de malte, e incubados em estufa a 34 °C durante cerca de 7 dias.

Todas as manipulações dos meios de cultura e dos micro-organismos foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente limpa e esterilizada com solução de hipoclorito de sódio 2 %, etanol 70 % e lâmpada UV.

4.2.3.2.1.2 Cultivo do fungo em meio de cultura semi-sólido

O meio semi-sólido foi preparado utilizando-se farelo de trigo e polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (3h, 50°C) (5,0 g, nas seguintes condições: 100% farelo de trigo, 50% de farelo de trigo + 50% de polpa celulósica, 100% polpa celulósica.) em 10 mL de uma solução aquosa contendo ureia (0,30 g.L⁻¹), peptona (0,75 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,40 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,30 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,40 g.L⁻¹), ZnSO₄ (1,40 mg.L⁻¹), FeSO₂.7H₂O (5,00 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,00 mg.L⁻¹) e MnSO₄.5H₂O (1,60 mg.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 6 com auxílio de um pHmetro, previamente calibrado, utilizando soluções de HCl 0,5 M ou NaOH 0,7 M. Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 min.

Em seguida, o fungo *Aspergillus* sp. foi inoculado em frascos Schott, com capacidade de 250 mL e incubados em estufa a 34 °C durante 48h.

4.2.3.2.1.3 Extração do caldo enzimático

Após de 48h de crescimento do fungo *Aspergillus* sp. foi realizada a extração das enzimas adicionando-se aos frascos Schott tampão acetato de sódio (0,2 mol.L⁻¹, pH 4,5) na relação 10 mL de tampão para 1 g de substrato (biopolímeros). Em seguida, utilizando-se um agitador magnético, a solução foi agitada vigorosamente durante 60 min.

Após 60 min, a mistura foi filtrada a vácuo para a retirada dos esporos/micélios que são formados durante a fermentação. Logo a seguir, também foi centrifugada por 10 min a

6000 rpm utilizando tubos Falcon de 15,0 mL. A solução resultante foi transferida para tubos e armazenada em congelador a -4 °C para posterior avaliação da atividade enzimática.

4.2.3.2.1.4 Determinação da atividade de celulases totais (Fpase)

Esse método é utilizado para determinar a atividade total de celulases presentes no meio de cultura. Para obtenção da atividade, é necessário determinar a concentração de açúcares redutores liberados durante o processo de degradação do substrato. Nesse caso, o substrato utilizado foi uma tira de papel filtro Whatman nº 1 de 1cm x 6cm (MILLER, 1959; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011). Este procedimento foi seguido de acordo com a metodologia padrão IUPAC (GHOSE, 1987).

A tira de papel foi enrolada em formato espiral e colocada dentro de tubos de ensaio com 2mL de tampão citrato de sódio (50mmol/L, pH 4,8). Em seguida, adicionou-se 1mL do extrato enzimático, obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, ao tubo de ensaio. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho termostatzado (50°C) durante o período de 60min, para que ocorresse a reação.

Posteriormente, os tubos foram resfriados e retirou-se uma alíquota de 1mL da solução, a qual adicionou-se 3mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e 1mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 10 min. Em seguida, resfriou-se a solução e essa foi analisada em um espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959). O método Miller (DNS) será descrito a seguir no presente texto.

A atividade da celulase (Fpase) é importante para avaliar a ação conjunta (sinérgica) das enzimas celulases, mostrando assim a atuação das enzimas em substratos com regiões não cristalinas e cristalinas, nesse caso papel filtro. A atividade da celulase (Fpase) foi calculada tanto para o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* quanto para o complexo enzimático comercial, para fins comparativos.

O cálculo da atividade enzimática (GHOSE, 1987) foi realizado através da seguinte equação:

(8)

$$UI = \frac{D \times C \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times V_t (\text{mL})}{T (\text{min})}$$

D – diluição (somente se necessário diluir a solução enzimática)

C – concentração encontrada a partir do método DNS

V_t – Volume total da reação

T – Tempo de reação

4.2.3.2.1.5 Eletroforese em gel de Policriálamida 15%

A eletroforese em gel de policriálamida foi realizada, neste trabalho, para avaliar a formação de celulasas e a concentração das mesmas nos caldos enzimáticos obtidos a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Para efeito comparativo, também foi realizada a eletroforese do complexo enzimático comercial (laboratório sob a responsabilidade de Prof^a. Dr^a. Fernanda Canduri no Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos - IQSC-USP).

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. A eletroforese em gel de policriálamida ou agarose é comumente usada na eletroforese de proteínas (DA SILVA JÚNIOR, 2001).

Os poros característicos dos géis levam a separações moleculares, como consequência de efeitos de peneiramento (tamanho e forma) e de mobilidade eletroforética (carga elétrica). O meio da eletroforese deve apresentar um pH alto (em torno de 9), para que estejam presentes espécies com grupos com cargas negativas em número suficiente para percorrer o gel em direção ao ânodo, onde a voltagem é aplicada. O movimento dos íons ocorre em bandas, ou seja, aqueles de tamanho e carga similares movem-se como uma banda única através do gel. A mobilidade de íons pequenos é maior que a de maiores com a mesma densidade de carga (VOET et al., 2008).

O caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* e o complexo enzimático comercial foram submetidos a eletroforese em gel de policrílamida, visando a avaliar a concentração das celulasas no meio.

O caldo enzimático (*Aspergillus sp.*) foi concentrado utilizando o concentrador com membranas semipermeáveis 3kDa. Pela membrana, apenas moléculas com massa molecular menor que 3kDa conseguem passar, ficando retidas na membrana moléculas com massa molecular superior a 3kDa. O sobrenadante que permaneceu na membrana foi analisado e o restante descartado. Este procedimento não foi realizado para enzima comercial devido ao sua alta concentração.

Os volumes utilizados para as enzimas foram de 2 μ L (comercial) e 20 μ L (enzima fúngica). À amostra foi adicionado 20 μ L de tampão de amostra 2x(tris-HCl 0,188 mol.L⁻¹, pH 6,8 contendo SDS 6%, EDTA 6mmol.L⁻¹, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,01% e β -mercaptoetanol 10%). Posteriormente, estas amostras foram aquecidas por, aproximadamente, 10 min para a desnaturação das proteínas. Após o aquecimento, foram utilizados 20 μ L de cada mistura, as quais foram aplicadas no gel de policrílamida 15% na presença de um marcador de massa molecular entre 14.000 e 60.000 Da (Sigma), que foi utilizado como parâmetro de comparação para a análise das bandas do gel.

A voltagem inicial aplicada foi de 100V até a entrada da amostra no gel de resolução, depois, a voltagem foi elevada a 120V, por cerca de 1h. Após esta etapa, o gel foi mantido no corante azul de Coomassie durante, aproximadamente, 10min e em seguida foi descorado em água destilada para a visualização da distribuição das bandas. O método utilizado, durante a análise, foi descrito por (LAEMMLI, 1970).

4.2.3.2.2 Reações de hidrólise enzimática

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas em frascos de 250 mL (Shott). Para cada 1g de polpa celulósica foram utilizados 50 mL de tampão de citrato 0,01 mol.L⁻¹, concentração que proporciona um pH 5. A suspensão (polpa celulósica e tampão) foi previamente esterilizada em autoclave (Marconi) (121°C, 20 min) (LACERDA, 2012). Após esterilizada, a suspensão foi mantida a 50°C em uma câmara incubadora com agitação orbital

(Marconi MA410). Depois de estabilizada a temperatura, as enzimas foram adicionadas ao sistema.

As reações, foram monitoradas por 48h, sendo retiradas alíquotas de 10min em 10min nos primeiros 30min de reação, e depois de 30min em 30min até que a reação completasse um total de 6h. Nas 3h seguintes foram retiradas alíquotas de 1h em 1h, depois de 2h em 2h nas próximas 6h e, por fim, de 8h em 8h até completar o tempo de 48h de reação. As reações foram repetidas duas vezes.

Inicialmente, foi realizada a reação utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica. Para cada 1g de polpa foram utilizados 0,5 mL de caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Em função da baixa concentração dos licores obtidos, foi triplicada esta concentração de caldo enzimático utilizado, ou seja, passou a ser usado, para cada 1g de polpa celulósica, 1,5 mL de caldo enzimático.

Um estudo do comportamento do caldo enzimático obtido a partir do fungo *Aspergillus sp.* Perante diferentes substratos foi realizado. Foram utilizados, além da polpa celulósica de sisal, a celulose microcristalina e o papel filtro. A celulose microcristalina foi utilizada por ser composta exclusivamente de celulose e, o papel filtro por ser um material utilizado na avaliação de atividades F_{pase} de enzimas *celulases* (GHOSE, 1987). Para cada 1g de substrato (polpa celulósica de sisal, celulose microcristalina e papel filtro) utilizado, foi adicionado 1,5mL de caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

Todas as alíquotas foram filtradas, separando o licor da polpa celulósica não reagida. A polpa não reagida foi lavada com água destilada, seca a 105°C e caracterizada em relação a MMvis, Ic, comprimento e espessura e avaliada a morfologia via MEV (4.2.3.3.1). O licor foi caracterizado via CLAE e DNS (4.2.3.3.2).

4.2.3.3 Caracterização dos produtos gerados nas reações de hidrólises

4.2.3.3.1 Caracterização das polpas não reagidas

As polpas celulósicas não reagidas, isoladas por filtração a partir das alíquotas retiradas durante as reações, foram analisadas em relação a MMvis (4.2.1.2), Ic (4.2.1.3), MEV (4.2.1.4) e tamanho e espessura médios das fibras (4.2.1.5)

4.2.3.3.2 Caracterização dos licores

Os licores foram caracterizados quanto ao teor de açúcares redutores pelo método Miller, conhecido por DNS, e quanto aos teores de glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, via CLAE, conforme descrito nas sessões a seguir.

4.2.3.3.2.2 Método Miller

Este método é baseado no fato que, em solução aquosa, existe um equilíbrio entre a β -D-glicose (cíclica, chamada de cadeia fechada) e a forma de cadeia aberta (D-glicose) (FIGURA 21–a). A reação desta última com o ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS, que gera uma solução amarelada) leva à redução do grupo nitro do DNS a um grupo amino ($-\text{NH}_2$), gerando o ácido 3-amino-5nitro salicílico (solução *marrom-avermelhada*), mais o ácido glicônico (gerado pela oxidação do grupo aldeído da D-glicose) (FIGURA 21–b). Esta reação leva a uma mudança de cor da solução de amarelo para *marrom-avermelhado*, e a uma banda no espectro de radiação eletromagnética na região visível, com máximo a 540 nm. Assim, a absorbância medida a 540nm é indicativa da concentração de D-glicose presente no meio, e que foi consumida pela reação com DNS. Conforme a D-glicose é consumida nesta reação, o equilíbrio envolvendo cadeia fechada/cadeia aberta se desloca no sentido cadeia aberta (D-

glicose), o que assegura uma conversão quantitativa do reagente, ou seja, a conversão de $\underline{n}$ mols de DNS equivale a presença inicial de $\underline{n}$ mols de glicose no meio (MILLER, 1959).

FIGURA 21 - Representação do equilíbrio entre β -D-glicose e D-glicose (a) e da reação desta última com ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) (b)

Os monossacarídeos, tais como glicose e xilose, são açúcares redutores por possuírem um grupo carbonílico e cetônico livres, que são capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (SILVA *et al.*, 2003). Os monossacarídeos presentes no meio podem interferir na análise, e o resultado pode não refletir somente o teor de glicose presente.

Para construção da curva analítica foram utilizadas soluções de glicose com concentrações 0,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 90,0 e 100,0 mg.dL⁻¹. Para a obtenção da curva adicionou-se um 1mL de amostra-padrão (de 0 a 100mg.dL⁻¹ de glicose) a 3mL do reagente DNS e 1mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria (água em ebulição) por 5min. Em seguida, resfriou-se a solução, sendo esta analisada em um espectrofotômetro, avaliando-se a absorbância à 540nm. A amostra controle (branco) consistiu de 2mL de água destilada e 3mL de DNS (MILLER, 1959; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011).

4.2.3.3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os licores foram analisados quanto ao teor de glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético em um equipamento SHIMADZU equipado com detector de índice de refração (RID-6A SHIMADZU) e coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO-RAD). A mistura eluente foi composta de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ em um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Temperatura do forno (CTO-10A SHIMADZU) foi mantida a 45°C e a pressão da bomba (LC-10AD SHIMADZU) variou entre 60 e 80 kg.f.cm⁻². As amostras foram previamente filtradas em filtros MILLEX 0,45 µm da marca Millipore com a finalidade de reter material em suspensão (PASQUINI *et al.*, 2005).

Durante a última etapa do trabalho, houve a necessidade de usar outro equipamento, devido a necessidade de substituição no detector de índice de refração do equipamento SHIMADZU utilizado. Então, na última etapa foi utilizado o equipamento HPLC (SCL-10A SHIMADZU) alocado no Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos, no Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Carlos (DEQ-UFSCar), gentilmente disponibilizado por Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli. As condições de análises e a coluna foram as mesmas nos dois equipamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ESTUDO DA MERCERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA DE SISAL

Como mencionado anteriormente, um dos objetivos do presente trabalho é a hidrólise da celulose de sisal, visando à produção de açúcares fermentescíveis para a obtenção de etanol de segunda geração.

A biomassa lignocelulósica é um composto natural formado, principalmente, por três biopolímeros: celulose, hemiceluloses e lignina, além da presença de outros compostos em menor quantidade (ex: ceras) (SINGH *et al.*, 2014). Nos materiais lignocelulósicos não há presença de monossacarídeos livres que podem ser facilmente convertidos a etanol, porém contém polissacarídeos como celulose e hemiceluloses que podem ser degradados a estes açúcares para uma posterior fermentação e obtenção do etanol.

Um dos principais problemas da biomassa lignocelulósica é o fato de que a celulose e hemiceluloses estão intimamente associadas à lignina, e esta impede o acesso dos agentes hidrolíticos necessários para a degradação desses polissacarídeos. Assim, é necessária a remoção ou a modificação da lignina por métodos químicos e/ou biológicos (FREER e DETROY, 1982). Neste trabalho, foi utilizada uma polpa celulósica obtida a partir da fibra de sisal, que foi submetida, industrialmente, ao processo de polpação (ou deslignificação) do tipo Kraft (já descrito neste texto) seguida de branqueamento do tipo ECF (Elemental Chlorine Free). Nesta polpa celulósica não foi detectada presença de lignina insolúvel (LACERDA *et al.*, 2012). Porém, o índice de cristalinidade (Ic), e o teor de hemiceluloses podem ser diminuídos, aumentando assim a reatividade e acessibilidade das cadeias de celulose, através do tratamento via NaOH (mercerização) (DE PAULA *et al.*, 2012).

Embora este tratamento já tenha sido aplicado em estudos anteriores (DE PAULA *et al.*, 2012), no presente estudo o tratamento foi acompanhado de forma mais detalhada, caracterizando-se amostras isoladas durante o período de mercerização. A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o estudo de mercerização via agitação mecânica e via ultrassom.

Durante o tratamento (mercerização) da polpa celulósica ocorre a solvatação dos grupos hidroxilas da celulose pelos íons sódio presentes na solução utilizada, causando o

intumescimento da polpa. Depois do intumescimento da celulose com a solução, podem ocorrer processos como a hidrólise alcalina das ligações glicosídicas e grupos acetila (presentes nas hemiceluloses), além da degradação e decomposição dos fragmentos hidrolisados a monossacarídeos solúveis (FENGEL e WEGENER, 1989). A ocorrência destas reações pode ser a explicação para a perda de 20%, em massa, da polpa mercerizada em relação a polpa celulósica de partida.

A TABELA 2 apresenta os códigos utilizados para a identificação das condições utilizadas no tratamento de mercerização aplicado na polpa celulósica de sisal.

TABELA 2 – Códigos referentes às condições de mercerização (M) da polpa celulósica de sisal

CÓDIGO	CONDIÇÃO	TEMPERATURA	TEMPO (min)
M-AgMec-50°	Agitação mecânica	50°C	180
M-US-20%	Ultrassom 20% de amplitude	ambiente	60
M-US-40%	Ultrassom 40% de amplitude	ambiente	60

Alíquotas foram retiradas do meio durante as 3h de mercerização via agitação mecânica e durante a 1h de mercerização via ultrassom. As polpas celulósicas provenientes destas alíquotas foram caracterizadas para determinar o teor de α -celulose, o índice de cristalinidade (Ic), a massa molar média viscosimétrica (MMvis), o comprimento e espessura das fibras de celulose, e também, foram avaliadas as suas superfícies via microscopia eletrônica de varredura (MEV). Destaca-se que não foi usado um tempo superior a 1h para o tratamento de ultrassom com o objetivo de preservar o bom funcionamento do equipamento, o qual apresentou problemas quando tempos superiores a 1h foram testados.

A FIGURA 22 mostra a variação no teor de α -celulose durante os tratamentos de mercerização via agitação mecânica e via ultrassom.

Observa-se que os maiores teores de α -celulose obtidos foram para os pontos referentes à mercerização via agitação mecânica (M-AgMec-50°) (FIGURA 22). Já no início do tratamento observou-se um aumento significativo no teor de α -celulose, sendo que após 60 min de tratamento essa variação não foi significativa, com valores próximos quando os erros são considerados.

Para o tratamento via ultrassom observou-se que para a amplitude de 20% as polpas celulósicas (M-US-20%) apresentaram maiores teores de α -celulose, quando comparados aos teores obtidos com amplitude de 40% (M-US-40).

Também pode ser observado que a partir de 10 min de tratamento via ultrassom não ocorre variação significativa nos teores obtidos. Assim, o uso de 1h como intervalo de tempo não limitou a observação do efeito de ultrassom sobre o teor de α -celulose, ou seja, provavelmente tempos superiores não levariam a alterações significativas nesta propriedade.

FIGURA 22 - Variação do teor de α -celulose para o tratamento de mercerização realizado via agitação mecânica e ultrassom.

As hemiceluloses presentes na fibra de sisal são constituídas principalmente por xilanas (MEGIATTO JR *et al.*, 2007). As xilanas apresentam grupos acetila responsáveis pela solubilidade das mesmas em água, mas são removidos durante tratamentos alcalinos (KUMAR *et al.*, 2009). Assim, o aumento no teor de α -celulose é dado pela eliminação das hemiceluloses presentes na polpa celulósica inicial. A FIGURA 22 também mostra que durante os tratamentos realizados as hemiceluloses passíveis de serem eliminadas o foram em 40 e 10 min, para os tratamentos via agitação mecânica e ultrassom, respectivamente.

Para a posterior etapa de hidrólise, busca-se uma polpa celulósica com menor índice de cristalinidade. Por este motivo, foi avaliado o índice de cristalinidade das polpas celulósicas obtidas durante os variados tempos (FIGURA 23).

FIGURA 23- Variação do índice de cristalinidade em função dos tempos de tratamentos via agitação mecânica (M-AgMec-50°) (a) e via ultrassom (b) (M-US-20%; M-US-40%).

A cristalinidade da polpa celulósica antes do tratamento era de 74%. Após 20min de mercerização, via agitação mecânica, o índice de cristalinidade não variou. Depois de 40min diminui, mantendo-se entre 71 e 70% até 160min. Ao finalizar o tratamento, em 180min, a cristalinidade da polpa obtida foi de 68%. O álcali interage com as hemiceluloses, que está presente na região não cristalina ocorrendo a hidrólise parcial destas, formando açúcares que se dissolvem no meio. O álcali interage também com cadeias presentes na região não cristalina e, finalmente pode penetrar na região cristalina, menos acessível, devido ao empacotamento das cadeias. No início a cristalinidade foi pouco afetada e na sequência se manteve aproximadamente constante, devido ao balanceamento destes efeitos. Nos estágios posteriores do processo, a penetração nas regiões cristalinas pode ocorrer em maior extensão, levando a diminuição da cristalinidade observada na FIGURA 23-a. Considerando as FIGURAS 22 e 23-a, nota-se que, embora 40min de mercerização via agitação mecânica, tenha sido suficiente para eliminar a maior parte da hemicelulose presente, somente após 140min foi possível observar diminuição significativa na cristalinidade.

O tratamento realizado via ultrassom, tanto a 20% quanto a 40% de amplitude, levou a uma diminuição do índice de cristalinidade já nos primeiros 10 min de tratamento. A partir desse tempo o índice de cristalinidade manteve-se praticamente constante durante o tempo restante de tratamento (FIGURA 23-b). Estes resultados indicam que no tratamento via ultrassom o balanceamento entre a eliminação das hemiceluloses, interação com domínios não cristalinos e cristalinos da celulose, levou à diminuição inicial na cristalinidade, mas posteriormente, até 60 min, a interação do álcali com os domínios cristalinos foi dificultada, talvez sendo necessário um tempo maior de tratamento para se observar nova queda, à semelhança do ocorrido no processo via agitação mecânica (FIGURA 23-a).

A FIGURA 24 apresenta os valores para a massa molar viscosimétrica (MMvis) durante os tratamentos de mercerização realizados na polpa celulósica.

FIGURA 24 - Variação da MMvis durante o tratamento de mercerização via agitação mecânica (a) e ultrassom utilizando as amplitudes de 20% e 40% (b).

Na FIGURA 24 é possível observar, que a MMvis tende a diminuir com o processo de mercerização. Para a mercerização via agitação mecânica, a diminuição ocorre até 80 min e depois praticamente se mantém constante ao longo do tratamento. Estes resultados mostram que o tratamento de mercerização pode levar a uma diminuição da MMvis, o que pode ser consequência da eliminação de hemiceluloses, que em solução podem interagir com cadeias de celulose, o que pode levar a alterações nas conformações das cadeias, no volume hidrodinâmico e, portanto, na respectiva viscosidade intrínseca. Ainda, a hidrólise parcial das cadeias de celulose presentes na polpa celulósica, principalmente nos domínios não cristalinos, pode levar a este resultado. No intervalo de tempo considerado, os resultados mostram que

a hidrólise das cadeias presentes nos domínios cristalinos foi dificultada, permanecendo a MMvis praticamente constante, aproximadamente em $95\ 000\ \text{gmol}^{-1}$, a partir de aproximadamente 80 min (FIGURA 24-a).

Para o tratamento realizado via ultrassom utilizando a amplitude de 20%, a MMvis diminui para $90\ 000\ \text{gmol}^{-1}$ nos primeiros 30 min de tratamento. Apresentando pouca variação até o final do tratamento. Quando utilizada a amplitude de 40%, nota-se que um comportamento similar ao da amplitude 20%, porém com uma diminuição de MMvis para aproximadamente $70\ 000\ \text{gmol}^{-1}$ após 30 min, ou seja, com uma degradação parcial mais intensa das cadeias de celulose.

A FIGURA 25 apresenta os mapas de densidade referentes à espessura e comprimento das fibras da polpa celulósica de sisal isoladas do meio durante os processos de mercerização, via agitação mecânica e ultrassom. Os valores referentes às maiores densidades de comprimento e espessura médio das fibras variaram entre [26-359] e [18-30] μm respectivamente.

Em relação aos mapas de densidade das polpas celulósicas tratadas via agitação mecânica, observou-se que a densidade referentes aos valores de comprimento e espessura diminui com o transcorrer do tratamento. A hidrólise alcalina parcial que ocorre na polpa celulósica, parece envolver o ataque dos reagentes tanto pelas extremidades como pela superfície das fibras. Assim, as fibras de maior comprimento e espessura que passaram por estas reações apresentaram valores menores. As fibras de menores valores iniciais, após as reações podem ter apresentado dimensões que o equipamento não consegue detectar.

Este comportamento pode ser observado quando se compara o mapa referente a 40min e o mapa referente a 100min de tratamento (FIGURA 25 – seta alaranjada). O pico estreito em 40 min (densidade 6) não é observado em 120 min (densidade 5), fazendo com que a maior densidade corresponda a uma região mais extensa.

Para os mapas de densidade das fibras tratadas via ultrassom a 20% de intensidade, é possível ser observado um pico de densidade em 20 min, e neste se encontram as fibras de menor comprimento e espessura (FIGURA 25 – seta azul). O surgimento deste pico pode ser proveniente, como resultante da possível hidrólise alcalina, das fibras de maior comprimento e espessura que passaram por esta reação. Após 40 min de tratamento foi possível observar que ocorreu a diminuição deste pico, e a completa eliminação do mesmo em 60 min. Já para as fibras tratadas via ultrassom a 40% de intensidade, com o aumento do tempo de tratamento, ocorre a evidência deste mesmo pico (FIGURA 25 – seta rosa).

FIGURA 25 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura das fibras celulósicas presentes na polpa durante os tratamentos de mercerização realizados.

Durante o tratamento, o ataque do álcali envolve a superfície das fibras. As mudanças na superfície são observadas nas imagens de MEV (FIGURA 26). Observa-se que durante o tratamento, as fibras tornaram-se mais rugosas. Pode ser observado, ainda, a presença de maior quantidade de fragmentos aderidos à superfície, principalmente nas fibras tratadas via ultrassom.

FIGURA 26 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as polpas celulósicas tratadas via mercerização sob agitação mecânica e ultrassom

As polpas obtidas após os tratamentos descritos foram usadas para a etapa seguinte, ou seja, hidrólise enzimática.

5.2 Hidrólise enzimática visando produção de açúcares fermentescíveis

As reações de hidrólise enzimática, como mencionado anteriormente, visaram a produção de açúcares fermentescíveis. A partir destes açúcares fermentescíveis é possível produzir o etanol de segunda geração. Nesta parte do estudo foram utilizadas enzimas celulases comerciais (Genencor 1500) e enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* durante as reações de hidrólises.

Para as reações de hidrólise enzimática foram utilizadas a polpa celulósica de sisal, que foi submetida ao tratamento de mercerização via agitação mecânica (50°C, 3h; M-AgMec-50°) e via ultrassom (temperatura ambiente, 1h) nas amplitudes de 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%). Em outra etapa do estudo, além de M-AgMec-50°, papel filtro comercial e celulose microcristalina também foram considerados. A utilização do papel filtro e da celulose microcristalina visou avaliar o comportamento da enzima perante diferentes fontes de substrato, com o objetivo de comparar com os resultados obtidos com as enzimas preparadas a partir do fungo *Aspergillus*, conforme descrito posteriormente

As polpas celulósicas utilizadas foram avaliadas quanto ao teor de α -celulose, quanto a MMvis e quanto ao Ic (TABELA 3), conforme descrito previamente.

TABELA 3- Teor de α -celulose, MMvis e Ic para as polpas celulósicas utilizadas nas reações de hidrólises enzimática

	α -celulose (%)	MMvis (g.mol ⁻¹)	Ic (%)
M-AgMec-50°	97,4±2*	94618,0±300*	68
M-US-20%	95,0±1,8*	87581,6±190*	68
M-US-40%	91,2±1,1*	81786,9±223*	66
Microcristalina	100	22104,2±20	79
Papel Filtro	80,3±1,5*	98530±357	63

* Referem-se ao erro,

Para nomear as reações realizadas foram criados códigos, que estão expostos na TABELA 4, visando diferenciar as polpas celulósicas utilizadas, tratamentos realizados nas polpas e a quantidade de complexo enzimático utilizado.

TABELA 4 - Códigos usados para denominar as reações estudadas (50°C) de acordo com as condições empregadas

SIGLA	POLPA CELULÓSICA	TRATAMENTO REALIZADO	CONCENTRAÇÃO (mL.g⁻¹)	ENZIMA
HE-SAG-0,5	Sisal	Mercerização – agitação mecânica	0,5	Comercial
HE-SAG-0,7	Sisal	Mercerização – agitação mecânica	0,7	Comercial
HE-SAG-0,9	Sisal	Mercerização – agitação mecânica	0,9	Comercial
HE-SU20-0,9	Sisal	Mercerização – ultrassom 20%	0,9	Comercial
HE-SU40-0,9	Sisal	Mercerização – ultrassom 40%	0,9	Comercial
HE-MICRO- 0,5	Microcristalina	Nenhum	0,5	Comercial
HE-PFT-0,5	Papel filtro	Nenhum	0,5	Comercial
H-Aspergillus- SAG-0,5	Sisal	Mercerização – agitação mecânica	0,5	Não comercial
H-Aspergillus- SAG-1,5	Sisal	Mercerização – agitação mecânica	1,5	Não comercial
H-Aspergillus- MICRO-1,5	Microcristalina	Nenhum	1,5	Não comercial
H-Aspergillus- PFT-1,5	Papel filtro	Nenhum	1,5	Não comercial

5.2.1 Hidrólise enzimática utilizando polpa celulósica de sisal e complexo celulasas comercial

5.2.1.1 Caracterização da polpa celulósica não reagida

5.2.1.1.1 Polpa mercerizada via agitação mecânica

As polpas celulósicas obtidas por filtração das alíquotas retiradas do meio reacional, em diferentes intervalos de tempo durante a reação, foram caracterizadas quanto ao índice de cristalinidade (difração de raios X, Ic), massa molar média por viscosimetria (MMvis), comprimento e espessura médios das fibras. A morfologia da superfície das polpas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Destaca-se que nem todas as alíquotas foram analisadas por todas essas técnicas, devido a fatores como tempo de equipamento que seria necessário para tal e/ou custo das análises.

Primeiramente, foram realizadas as reações de hidrólises enzimática, utilizando o complexo enzimático comercial, com as polpas celulósicas de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°). A quantidade de enzima usada foi proporcional a 0,5; 0,7 e 0,9 mL complexo enzimático. g⁻¹ celulose.

A FIGURA 27 apresenta a variação de MMvis em função do tempo de hidrólise da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°).

FIGURA 27 - Valores de massa molar média viscosimétrica (MMvis) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas *celulases* comercial, usando diferentes escalas, **(a)** e **(b)**

A hidrólise enzimática da celulose depende diretamente do contato da enzima com o substrato, no caso a celulose (ARANTES e SADDLER, 2011). Assim, quanto maior a área de superfície exposta à enzima maior é o ataque das enzimas às cadeias de celulose e mais degradada ela é, e menor será a massa molar média (MMvis). O aumento da quantidade do complexo enzimático utilizado, necessariamente não leva a uma diminuição maior da MMvis no início da reação, como observado na FIGURA 27. Isso se deve ao fato que quanto maior a quantidade de enzimas, mais difícil pode se tornar a interação entre *celulase*-celulose (enzima-substrato). Deve-se destacar que em se tratando de reações enzimáticas, a relação entre superfície do substrato e a degradação da celulose algumas vezes é contraditória, e em muitos casos inconclusivas (ARANTES e SADDLER, 2011).

O mecanismo da hidrólise enzimática da celulose pode ser dividido em três etapas, adsorção, complexação e reação, necessitando da ação conjunta (sinergia) das enzimas, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases e exoglucanases competem para interagirem com o substrato, enfraquecendo assim, a sinergia entre elas e diminuindo a eficiência enzimática da reação (LEVINE *et al.*, 2010; ROBERTS *et al.*, 2011).

As proporções relativas de exoglucanases (que atuam nos finais de cadeia, levando a uma diminuição lenta e gradual na massa molar média) e endoglucanase (atua nas partes internas da cadeia, levando a uma diminuição significativa na massa molar média), assim como as características da celulose sendo hidrolisada, definem as alterações de massa molar média observadas durante a reação. Foi observado que exoglucanases apresentam acentuada preferência por substratos com baixa massa molar média (ZHANG e LYND, 2004).

Os resultados apresentados na FIGURA 27 indicam que inicialmente as endoglucanases atuaram sobre a celulose, levando a uma diminuição na massa molar média (MMvis). Desta forma, o número de finais de cadeia aumentou, favorecendo a atuação das exoglucanases. Os resultados indicam que nesta etapa principalmente as cadeias de baixa massa molar média reagiram, levando a produtos que se solubilizaram no meio. Como consequência, a celulose que permaneceu no meio sem reagir, cuja MMvis foi avaliada, apresentou maior MMvis, comparativamente às alíquotas retiradas nos tempos iniciais, devido ao consumo de cadeias de menor massa molar média. Na sequência, se observa uma tendência frente à diminuição de MMvis e estabilização até o final da reação.

A FIGURA 28 apresenta a variação do índice de cristalinidade para as polpas celulósicas residuais (não reagidas) em função do tempo de hidrólise. Devido a questões de custo/ acesso ao equipamento, e ao alto número de amostras analisadas, a análise via difração de raios X foi repetida somente para algumas amostras, obtendo-se um erro em torno de $\pm 3\%$.

Nota-se que na reação utilizando de 0,7mL complexo enzimático. g⁻¹ celulose (HE-SAG-0,7), o índice de cristalinidade é praticamente o mesmo nas primeiras 15h (considerando o erro). Observa-se uma tendência de aumento do índice de cristalinidade em estágios posteriores da reação, quando comparado com a cristalinidade do material de partida, que apresenta o valor de 68%. Este aumento, não muito significativo, no índice de cristalinidade é consequência da hidrólise de regiões não cristalinas. Como regiões não cristalinas são eliminadas devido à hidrólise, a cristalinidade aumenta. Para HE-SAG-0,5 e HE-SAG-0,7 observa-se um pequeno aumento no índice de cristalinidade nas primeiras horas da reação, com algumas oscilações no transcorrer da mesma (FIGURA 28). Muitos estudos têm sido desenvolvidos sobre o comportamento da cristalinidade do substrato durante a hidrólise enzimática (ZHANG e LYND, 2004), sendo encontrados resultados tanto no sentido de aumento como de não variação na cristalinidade durante a conversão a açúcares (HALL *et al.*, 2010), dependendo o comportamento em muito das propriedades do substrato de partida.

FIGURA 28 - Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas *celulases* comercial.

A FIGURA 29 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura das polpas celulósicas residuais (não reagidas) obtidas a partir das reações de hidrólise enzimática realizadas com *celulases* comerciais, (0,5; 0,7 e 0,9 mL complexo enzimático/ g celulose)

FIGURA 29—Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas *celulases* comercial.

POLPA INICIAL

HE-SAG-0,5

HE-SAG-0,7

HE-SAG-0,9

30 min

4 horas

Observando as imagens superiores (20µm) não é possível perceber alterações significativas nas superfícies das fibras em nenhuma das condições usadas e tempos considerados. Nas imagens inferiores (2µm) é possível ver alterações nas superfícies (FIGURA 29). Assim, pode-se observar que a hidrólise enzimática age de forma branda nas fibras, no

início da reação (30 min) (FIGURA 29). A medida que a reação ocorre, o ataque das enzimas fica mais visível, porém apenas após 4h se pode observar alterações significativas nas superfícies. Após 4h de reação, (HE-SAG-0,7 e HE-SAG-0,9), a superfície das fibras já apresenta algumas “fendas”, as quais se intensificaram com o passar do tempo, sendo seguidas da fragmentação dos feixes fibras, conforme visualizado nas imagens mostradas a partir de 31h de reação (FIGURA 29).

A FIGURA 30 apresenta os mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras das polpas celulósicas residuais (não reagidas). A partir desses mapas pode-se acompanhar a variação tanto do comprimento como da espessura (em μm) das fibras durante a hidrólise enzimática com enzimas celulasas comerciais, em um período de 48 h.

FIGURA 30 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas *celulases* comercial

O mapa da polpa de partida apresenta uma intensidade maior de comprimento em [129-215] μm e de espessura em [28-39] μm . Este mapa também apresenta pico de fibras menos espessas a [6-11] μm com intervalo de comprimento a [17-28] μm . A partir dele é possível observar as mudanças nos comprimentos e espessuras das fibras durante a reação de hidrólise. Para HE-SAG-0,5, 30 min, é observado um aumento no pico referente as fibras de menor espessura e comprimento. Para HE-SAG-0,7 e HE-SAG-0,9 este aumento do pico para a menor espessura e comprimento ocorre somente após 4 h. O pico de maior densidade se desloca para [77-129] e [11-23] μm para o comprimento e espessura respectivamente para todos os carregamentos de enzima após 4h de reação. Observa-se que a variação na quantidade das enzimas não levou a diferenças significativas entre as mudanças de comprimento e espessura das fibras da polpa celulósica não reagida.

Usando os dados descritos na figura anterior, gráficos em barras para o comprimento e espessura foram plotados para as polpas referentes a 0 (polpa de partida – M-AgMec-50°) 8, 23 e 48 h de reação (FIGURA 31).

FIGURA 31–Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), utilizando o complexo de enzimas *celulases* comercial

No geral, para todas as condições consideradas (HE-SAG-0,5, HE-SAG-0,7, HE-SAG-0,9), após 8h de reação diminuiu a densidade de fibras mais espessas (a partir [18-23] μm), e consequentemente aumentou a densidade de fibras menos espessas no meio. Este resultado é consequência do ataque das enzimas a partir da superfície das fibras (FIGURA 31).

Para todas as condições consideradas, as densidades das fibras de menor comprimento praticamente não foram alteradas até 48h de reação, o mesmo sendo observado para fibras com comprimentos superiores a [359-599] μm . A partir de [46-77] μm se observa certo aumento na densidade de fibras, comparativamente à polpa de partida, o que é intensificado para o intervalo de maior comprimento posterior a este. Este aumento foi alimentado pelo ataque as fibras de maior comprimento, o que levou a diminuição na densidade de fibras com comprimentos em intervalos superiores, até [359-599] μm (FIGURA 31).

O conjunto de resultados mostrou que variações mais significativas ocorreram na espessura das fibras, comparativamente ao comprimento das mesmas, indicando um ataque preferencial das enzimas a partir das superfícies das fibras.

5.2.1.1.2 Polpas mercerizadas via ultrassom

Reações de hidrólise enzimática foram realizadas para as polpas mercerizadas via ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% de amplitude (M-US-40%), visando comparar os resultados com os obtidos para a polpa mercerizada sob agitação mecânica (M-AgMec-50°). Para esta parte, somente o carregamento de 0,9 mL complexo enzimático. g^{-1} celulose foi considerado.

A FIGURA 32 apresenta a variação de MMvis em função do tempo de hidrólise da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9), e via ultrassom nas amplitudes de 20% (HE-SU20-0,9) e 40% (HE-SU40-0,9).

Deve ser ressaltado que os valores iniciais para MMvis nas polpas utilizadas são diferentes, sendo que, os valores para as polpas celulósicas tratadas via ultrassom (87581,6 g.mol^{-1} para M-US-20% e 81786,9 g.mol^{-1} M-US-40%) são menores que o valor para a polpa mercerizada via agitação mecânica (94618,0 g.mol^{-1} para M-AgMec-50°) (TABELA 3). Esta variação no valor inicial de MMvis deve-se a diferença nos processos de mercerização utilizados.

Para todas as reações, após 30 min ocorreu a diminuição nos valores de MMvis (FIGURA 32), após, para todas as reações, até 4-5h, ocorreu um aumento nos valores de MMvis. Na reação utilizando a polpa celulósica de sisal tratada via ultrassom a 20% de amplitude (HE-SU20-0,9), foi observado um padrão constante nos valores de MMvis a partir de 9h de reação. Já a reação utilizando a polpa celulósica de sisal tratada via ultrassom a 40% de amplitude (HE-SAG-0,9), a partir de 5h, ocorre a diminuição dos valores até cerca de 23h de reação, em que ocorre um leve aumento, com oscilações a partir daí.

Quando são comparadas as variações nas três reações realizadas (HE-SAG-0,9; HE-SU20-0,9; HE-SU40-0,9), observa-se que os valores de MMvis que são obtidos durante a hidrólise da polpa celulósica de sisal mercerizada via ultrassom a 20% de amplitude (HE-US20-0,9), após aproximadamente 5h de reação, são menores que os valores das outras duas polpas celulósicas utilizadas. Este resultado deve ser melhor investigado.

FIGURA 32 - Massa molar média viscosimétrica (MMvis) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude, usando diferentes escalas, (a) e (b)

A FIGURA 33 apresenta o gráfico referente aos valores de Ic para as polpas não reagidas referente as reações utilizando as polpas mercerizadas via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) e ultrassom a 20% (HE-SU20-0,9) e a 40% (HE-SU40-0,9). Deve-se ressaltar que os Ic iniciais são diferentes para as diferentes polpas usadas, sendo que para HE-SAG-0,9 o valor inicial de Ic é 68%, para HE-SU20-0,9 é 68% e para HE-SU40-0,9 é 66% (TABELA 3). Em relação a reação utilizando a polpa mercerizada via ultrassom a 20% de intensidade (HE-SU-20%) observa-se que, até 15h de reação o Ic permaneceu aproximadamente constante, e na sequência diminuiu até chegar, em 48h, a 63%, indicando a hidrólise de cadeias presentes nos domínios cristalinos. Já a reação utilizando polpa celulósica de sisal mercerizada via ultrassom

a 40% de amplitude (HE-SU40-0,9), sofreu um aumento em relação ao Ic de 60% até 73% nas primeiras 8h de reação, indicando o consumo de cadeias presentes nos domínios não cristalinos neste intervalo de tempo. A partir das 8h de reação, o Ic diminui até 68% em 48h, indicando consumo de cadeias presentes nos domínios cristalinos. Estas diferenças observadas no comportamento das duas polpas mercerizadas via ultrassom pode ter contribuído para as diferenças observadas na variação de MMvis (FIGURA 32). As polpas não reagidas obtidas a partir da reação com polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) apresentaram uma tendência de aumento em seu Ic ao longo da reação (de 68% até 73%, 48h), mais significativo no início e nas etapas finais da reação. Os resultado indicaram um certo favorecimento na hidrólise de cadeias dos domínios não cristalinos para esta polpa, mas sem variações intensas na cristalinidade.

FIGURA 33- Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g⁻¹polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.

A FIGURA 34 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de polpas celulósicas não reagidas obtidas durante as reações de hidrólise enzimática utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) e via ultrassom a 20% (HE-SU20-0,9) e 40% (HE-SU400-0,9) de amplitude. É necessário ressaltar

que as imagens referentes as polpas não reagidas via agitação mecânica já foram apresentadas neste presente texto na FIGURA 29, porém para efeito de comparação, novamente, elas são apresentadas na FIGURA 34.

FIGURA 34—Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.

Na FIGURA 34, é observado que após 4h de reação, as fibras das polpas tratadas via ultrassom (HE-SU20-0,9; HE-SU40-0,9) apresentaram aspecto de maior fragmentação que as tratadas via agitação mecânica (HE-SAG-0,9). A intensidade desta fragmentação aumentou a medida que o tempo de reação aumenta. Somente após 15h de reação a polpa celulósica tratada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) apresentou aspecto mais fragmentado, o que foi intensificado a partir deste ponto. Para as três polpas foi observado que, a partir de 31h de

reação, as fibras apresentaram fendas ao longo de sua extensão. Após 48h de reação, as fibras provenientes da polpa celulósica tratada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) foram as que mais apresentaram os efeitos do ataque das enzimas, comparativamente às fibras das polpas tratadas via ultrassom (HE-SU20-0,9; HE-SU40-0,9).

A FIGURA 35 apresenta os mapas de densidade referentes aos valores de comprimento e espessura das fibras das polpas celulósicas não reagidas para as reações HE-SAG-0,9, HE-SU20-0,9 e HE-SU40-0,9.

FIGURA 35 - Mapas de densidade referente aos valores de comprimento e espessuras das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g^{-1} polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.

Comparando as fibras iniciais pode-se observar que a maior densidade referente ao comprimento em todas está contido no intervalo de [77-129] μm . Já em relação a espessura das fibras iniciais, a polpa celulósica tratada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9) apresentou picos nos intervalos de [6-8] μm , [14-18] μm e [18-30] μm sendo que este último apresentou maior densidade. A polpa tratada via ultrassom a 20% (HE-SU20-0,9) apresentou um pico de maior densidade no intervalo de [18-30] μm , e a polpa tratada via ultrassom a 40% (HE-SU40-0,9) apresentou picos em [6-8] μm e em [18-30] μm .

A medida que as reações progridem é possível observar que, as enzimas atacaram preferencialmente a superfície e não as extremidades das fibras, pois os valores mais alterados foram os referentes aos intervalos de espessura. Para o comprimento, o pico de maior densidade manteve-se em [77-129] μm em todos os tempos de reação. Tanto para HE-SAG-0,9 quanto para HE-SU20-0,9, após 30min já foi possível observar que o pico de maior densidade referente ao intervalo de espessura diminuiu de [18-30] μm para [14-18] μm , e a medida que a reação progride este fica mais evidente. Para HE-SU40-0,9 a diminuição de intervalo do pico de maior densidade ocorreu a partir de 4h de reação, de [18-30] μm para [14-18] μm e este se manteve constante ao longo de toda a reação. O que diferencia esta das outras reações é o fato que, apenas após 48h foi possível observar um pico de menor densidade referente a fibras de menores espessuras, o que significa que o ataque na superfície foi menos intenso que em HE-SAG-0,9 e em HE-SU20-0,9.

Os dados que geraram a FIGURA 35 foram usados para construir gráficos em barras (fibras de partida, 8, 23 e 48 h de reação) para comprimento e espessura (FIGURA 36).

FIGURA 36 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas, proveniente das reações de hidrólise enzimática (0,9mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica), utilizando as polpas celulósicas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude.

Na FIGURA 36 observa-se que após 8h, para HE-SU20-0,9 e HE-SU40-0,9, as fibras com intervalo de espessura acima de [18-23] μm estavam presentes em menor quantidade no meio, devido às reações ocorridas, o que levou a um aumento na densidade de fibras com espessuras contidas em intervalos de valores menores. Em relação ao comprimento, observa-se que para HE-SU20-0,9 ocorreu uma maior variação nos valores de comprimento, logo em 8h de reação, quando comparada com os valores de comprimento para HE-SU40-0,9. Esta variação deslocou as fibras de valores >215μm para regiões <129μm. Quando comparados os comportamentos entre os tratamentos agitação mecânica (HE-SAG-0,9) e ultrassom (HE-SU20-0,9 e HE-SU40-0,9), observa-se que as fibras provenientes do tratamento via ultrassom são mais suscetíveis a mudanças no comprimento. Em relação a espessura, todas as fibras tendem a apresentar valores de espessuras menores quando comparados aos valores da polpa inicial utilizada.

5.2.1.2 Caracterização dos produtos de reação gerados nas reações de hidrólise enzimática utilizando complexo celulasas comercial

A alta especificidade das enzimas (*celulasas*) que estão presentes no complexo enzimático permite que a reação de hidrólise de celulose leve à formação de glicose, celobiose e celo-oligosacarídeos, sem que ocorra a formação de produtos de decomposição (YOON *et al.*, 2014). Assim, o licor resultante da hidrólise é predominantemente composto por glicose, celobiose, celo-oligosacarídeos e também, quando a polpa celulósica apresenta teores altos de hemiceluloses, açúcares como xilose e arabinose. A celobiose e os celo-oligosacarídeos as vezes, encontram-se em pequenas quantidades que não são passíveis de detecção. A alta concentração de glicose, que é o produto alvo, no licor é de grande valia devido à possibilidade de geração de etanol a partir da mesma.

No presente trabalho, os licores proveniente das reações de hidrólise foram caracterizados por dois métodos. O método Miller ou DNS, que é utilizado para a determinação de açúcares redutores, ou seja, todo e qualquer tipo de açúcar que apresenta uma extremidade redutora pode ser detectado. Este método permite a obtenção de resultados rapidamente, tendo sido muito útil para uma primeira avaliação da eficiência da reação. Adicionalmente, a avaliação dos teores de glicose por HPLC tornou possível comparar os resultados das duas análises (Método Miller e HPLC), conforme será discutido posteriormente.

Para a determinação da concentração dos açúcares redutores foi obtida uma curva padrão (concentração de glicose *versus* absorbância) que está apresentada na FIGURA 37.

FIGURA 37 - Curva padrão: Absorbância (540nm) versus concentração de glicose ($R^2=0,989$)

O segundo método utilizado foi a cromatografia de alta eficiência (HPLC), que permite determinar a concentração individual dos açúcares presentes no licor.

Nas reações de hidrólise enzimática usando *celulases* comerciais foram usadas as polpas de sisal tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom utilizando as amplitudes de 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-20%). Todos estes substratos apresentaram altos teores de celulose (TABELA 3).

A FIGURA 38 apresenta os resultados obtidos para as concentrações de açúcares redutores pelo método DNS (FIGURA 38 – a) e para a concentração de glicose obtido por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (FIGURA 38 – b) para as reações utilizando a polpa celulósica tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e variando as concentrações das enzimas *celulases*. A FIGURA 38 – c corresponde à sobreposição das curvas obtidas pelos dois métodos (DNS e HPLC).

FIGURA 38- (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas *celulases* comerciais para as concentrações de 0,5; 0,7 e 0,9 mL complexo enzimático.g⁻¹ polpa celulósica. O maior e o menor erro observado foram de $\pm 8,3.10^{-3}$ (HE-SAG-0,9, 11h), e $5,7.10^{-5}$ (HE-SAG-0,5, 30 min), respectivamente. **(b)** Concentração de glicose (HPLC) O maior e o menor erro observado foi de $\pm 0,20$ (HE-SAG-0,9, 1h), e 0,0014 (HE-SAG-0,7, 13h), respectivamente. **(c)** Sobreposição das curvas (a) e (b).

Analisando-se os gráficos de teores de açúcares redutores (FIGURA 38 – a) e glicose (FIGURA 38 – b) observa-se que os resultados são muito próximos. Ao sobrepor as curvas (FIGURA 38 – c), observa-se que os valores obtidos encontram-se dentro dos erros dos resultados. Este resultado é muito importante, pois atesta a validade de o método Miller ser usado para avaliação da concentração de glicose produzida por hidrólise enzimática de polpa celulósica, por exemplo a polpa de sisal usada no presente estudo. A ausência de produtos de decomposição na hidrólise enzimática, os quais podem influenciar os resultados obtidos, favorece o uso do método Miller.

Apenas os resultados gerados por HPLC serão discutidos, sendo que a partir dos mesmos foram calculados os respectivos rendimentos.

A maior produção de glicose observada foi para a concentração de 0,9 mL complexo enzimático.g⁻¹celulose, cerca de 21 g.L⁻¹de glicose (erro ±0,012), após 48 h de reação. Para as concentrações de 0,5 e 0,7 mL complexo enzimático.g⁻¹celulose, os teores de glicose, após 48 h, foram de aproximadamente 19 (erro ±0,010) e 18 g.L⁻¹(erro ±0,24) respectivamente. Nas três concentrações de complexo enzimático, o maior aumento no teor glicose, em média cerca de 67% do total obtido, ocorreu nas primeiras 15h de reação, aumentando na sequência em proporções menores (FIGURA 38 - c).

Desprezando a presença de hemiceluloses e considerando apenas o total de α-celulose presente na massa inicial de polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) (TABELA 3), é possível calcular o rendimento das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal para as três concentrações de complexo enzimático utilizado. Para isso foi calculado a glicose potencial que seria obtida, se toda celulose presente na polpa celulósica fosse hidrolisada a glicose. Para o cálculo da glicose potencial (glicose máxima) foram utilizadas as Equações 9 e 10.

(9)

$$[glicose]_{m\acute{a}x} = \frac{Mi. \%cel. q}{V}$$

Sendo:

(10)

$$q = \frac{MM \text{ glicose}}{MM \text{ anidroglicose}} = \frac{180 \text{ g/mol}}{162 \text{ g/mol}} = 1,1$$

- “q” é um fator de conversão necessário para calcular o quanto de glicose seria formada a partir da celulose inicial, já que na celulose, glicose está na forma anidra, ou seja, difere, em massa, por uma molécula de água;
- Mi = Massa inicial de polpa celulósica (para todos os casos Mi = 1g)
- V = volume da solução (para todos os casos V = 0,05 L)
- %cel. = porcentagem de celulose na polpa.

Estes cálculos forneceram o valor máximo de 21,4 g.L⁻¹ de glicose que poderia estar presente no licor, ou seja, se toda a celulose da polpa celulósica fosse convertida em glicose este valor seria detectado via HPLC (ou DNS).

Assim, a partir deste valor, é possível calcular, o rendimento das reações estudadas. Para este cálculo foram considerados os valores de concentração de glicose gerados após 15 e 48h de reação, em cada condição reacional. A porcentagem de celulose hidrolisada foi calculada pela razão entre glicose detectada no licor, e a concentração máxima de glicose (que seria obtida se toda celulose fosse hidrolisada em glicose). Para a realização desses cálculos foi utilizada a Equação 11.

(11)

$$\% \text{ de celulose hidrolisada} = \frac{[\text{glicose}]_{\text{detectada}}}{[\text{glicose}]_{\text{máxima}}} \times 100$$

sendo [glicose]_{máxima} = 21,4 g.L⁻¹

A TABELA 5 apresenta os rendimentos obtidos para as três concentrações de enzimas utilizadas nas hidrólises enzimáticas

TABELA 5 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,5; HE-SAG-0,7; HE-SAG-0,9 após 15h e 48h de reação.

		HE-SAG-0,5	HE-SAG-0,7	HE-SAG-0,9
15h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	14±0,07*	14±0,08*	15±0,2*
	% de celulose hidrolisada	66	66	70
48h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	19±0,001*	18±0,24*	21±0,01*
	% de celulose hidrolisada	89	85	98

* Referem-se ao erro, considerando os dois resultados obtidos.

Durante as reações de hidrólise, tipicamente, depois de uma “explosão” na produção de açúcares, as taxas de produção tendem a diminuir (LEVINE *et al.*, 2010). Isto foi observado no presente estudo, após 15 h de reação, em que entre 66 e 70% de celulose foi hidrolisada à glicose para todas as concentrações de complexo enzimático comercial (TABELA 5). A partir de 15h a porcentagem de celulose hidrolisada aumenta, porém de forma mais lenta.

Considerando os erros informados (TABELA 5), observa-se que os rendimentos podem ser considerados diferentes. Portanto, o maior rendimento ocorreu para a reação

utilizando a concentração de 0,9mL de complexo enzimático.g⁻¹ polpa celulósica de sisal (HE-SAG-0,9).

O mecanismo de reação da hidrólise enzimática da celulose, ainda não totalmente compreendido, concentra-se na ação de um complexo enzimático sobre um substrato heterogêneo, o que aumenta a dificuldade do estudo cinético da hidrólise enzimática da celulose (LEVINE *et al.*, 2010). A diminuição da taxa de hidrólise após certo tempo pode estar ligado a fatores associados a enzimas, como a desnaturação ou desativação da mesma, a inibição do produto, redução do sinergismo ou a superlotação de enzimas na superfície da celulose. Pode também estar ligada a fatores associados aos substratos, como a diminuição da reatividade e acessibilidade do substrato, as mudanças no grau de polimerização, cristalinidade e outras propriedades físicas do substratos que levam a ligações não produtivas (YE e BERSON, 2011; MONSCHEIN *et al.*, 2013; STAUNER *et al.*, 2013). Neste contexto, no presente estudo alguns experimentos complementares foram realizados.

Na FIGURA 39 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações de glicose, obtido por HPLC, para as reações utilizando polpa celulósica tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) com a concentração de 0,9mL de enzima. g⁻¹ polpa celulósica. Estas reações foram realizadas sem adições suplementares de enzima ou polpa, com a adição de 1g de polpa celulósica, e com a adição de 0,5mL de enzima. As adições foram realizadas após 15h de reação.

FIGURA 39 - Concentração glicose (HPLC) das reações utilizando enzimas *celulases* comerciais para a concentração de 0,9 mL complexo enzimático.g⁻¹ celulose utilizando polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) com adições de 1g de polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°) e 0,5mL de complexo enzimático após 15h de reação.

Como observado na FIGURA 39, a produção de glicose não é alterada com a adição de enzimas. Pode-se afirmar que a adição de mais complexo enzimático ao meio é improdutivo, pois não leva a produção de mais glicose. Já com a adição de polpa celulósica ocorre um aumento considerável (cerca de 7g.L⁻¹) no teor de glicose, mostrando que as enzimas não perderam atividade, mas que a concentração do substrato era baixa, já que após 15h grande parte da celulose do meio já sofreu hidrólise.

Também foi avaliada a produção de açúcares a partir da polpa celulósica de sisal tratada via ultrassom a 20% (M-US-20%) e 40% (M-US-40%) de amplitude, comparando-se os resultados com aqueles obtidos para polpa tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°). Para estas reações foi utilizada a concentração de 0,9mL de complexo enzimático. g⁻¹polpa celulósica. Esta concentração foi escolhida pelo fato de que nesta concentração foram observadas as maiores mudanças na fibra celulósica em relação a cristalinidade (de 68% para 73%), MMvis (de 94 618 g.mol⁻¹ para 64 737 g.mol⁻¹) e comprimento (pico de maior densidade:

de [77-215 μm] para [77-129 μm]) e espessura (pico de maior densidade: de [18-23 μm] para [14-18 μm]).

Na FIGURA 40 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações de açúcares redutores pelo método DNS (FIGURA 40– a) e para a concentração de glicose obtido por HPLC (FIGURA 40– b) para as reações utilizando apenas a polpa celulósica tratadas via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e via ultrassom (M-US-20% e M-US-40%). A concentração utilizada foi de 0,9mL de enzima. g⁻¹ polpa celulósica. E a FIGURA 40 – c apresenta o gráfico de sobreposição dos valores das curvas obtidas pelos dois métodos (DNS e HPLC).

FIGURA 40 - (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas *celulases* comerciais para a concentração de 0,9 mL complexo enzimático.g⁻¹polpa celulósica utilizando polpa celulósica de sisal sob tratamentos diferentes (M-AgMec-50°, M-US-20%, M-US-40%). O maior e o menor erro observado foram de $\pm 0,02$ (HE-SU20-0,9_15h) e $\pm 3,4.10^{-3}$ (HE-SU40-0,9_1h). **(b)** Concentração de glicose (HPLC). O maior e o menor erro observado foram de $\pm 3.10^{-3}$ (HE-SU20-0,9_23h) e $\pm 2.10^{-3}$ (HE-SU20-0,9_8h) **(c)** Sobreposição das curvas (a) e (b).

Como apresentado na TABELA 3, os teores de α -celulose são diferentes para as três polpas celulósicas utilizadas. As polpas celulósicas provenientes do tratamento via ultrassom a 20% e 40% de amplitude (M-US-20%; M-US-40%) apresentaram teor de hemicelulose igual a 5% e 9% respectivamente. A polpa celulósica tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) apresentou um teor aproximadamente de hemicelulose igual a 3%. Isto é repercutido nos gráficos da FIGURA 40. Os teores de açúcares redutores para as reações das três polpas celulósicas utilizadas (HE-SAG-0,9; H-SU20-0,9; H-SU40-0,9) se sobrepõem (FIGURA 40-a), e o contrário é observado quando analisada a curva de glicose (FIGURA 40-b).

Durante as análises de HPLC, não foram detectados outros açúcares para as alíquotas provenientes da hidrólise da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,9). Para as alíquotas provenientes da hidrólise das polpas celulósicas tratadas via ultrassom (H-SU20-0,9; H-SU40-0,9), foram detectados teores de xilose (FIGURA 41). A xilose é proveniente da decomposição da xilana, que é o principal componente de hemiceluloses (cerca de 68%) do sisal (MEGIATTO JR *et al.*, 2007).

FIGURA 41 - Teores de xilose detectados pelo método HPLC para as alíquotas provenientes da hidrólise enzimática das polpas celulósicas de sisal tratadas via ultrassom (H-SU20-0,9; H-SU40-0,9). O maior e o menor erro são $\pm 0,01$ (H-SU40-0,9_48h) e $\pm 1.10^{-4}$ (H-SU20-0,9_3h).

Para os cálculos de rendimento, foram considerados os teores de glicose obtidos pelo método HPLC, neste caso também devido ao fato de as análises. As equações 9, 10 e 11 foram utilizadas nos cálculos. Os rendimentos máximos para os tempos de reação 15h e 48h obtidos estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,9; HE-SU20-0,9; HE-SU40-0,9 após 15h e 48h de reação.

		HE-SAG-0,9	HE-SU20-0,9	HE-SU40-0,9
	Glicose máxima (g.L⁻¹)	21,4	20,9	20,1
15h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	15±0,2*	12,4±0,005*	11,7±0,01*
	% de celulose hidrolisada	70	59	58
48h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	21±0,01*	15,3±0,004*	14,7±0,003*
	% de celulose hidrolisada	98	73	73

* Referem-se ao erro, considerando os dois resultados obtidos.

A polpas celulósicas de sisal após os tratamentos de mercerização via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e ultrassom a 20% de amplitude (M-US-20%) apresentaram Ic de 68%, e a polpa mercerizada via ultrassom a 40% de amplitude (M-US-40%) apresentou Ic de 66% (TABELA 3). A massa molar média também afeta a eficiência na hidrólise enzimática da polpa sisal, pois quanto menor o valor da MMvis, menores são as cadeias de celulose e mais acessíveis frente as enzimas elas se tornam. Por este fato, seria esperado que as hidrólises das polpas celulósicas de sisal tratadas via ultrassom (H-US20-0,9; H-US40-0,9) levassem a rendimentos maiores, já que as polpas celulósicas tratadas via ultrassom (M-US-20%; M-US-40%) apresentaram valores de MMvis menores ($87581,6 \pm 190 \text{ g.mol}^{-1}$ e $81786,9 \pm 223 \text{ g.mol}^{-1}$ respectivamente) que a polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) que apresentou o valor de $94618,0 \pm 300 \text{ g.mol}^{-1}$ (TABELA 3).

A eliminação de xilanas, presentes nas hemiceluloses, vem sendo apontada como um fator muito importante no que se refere à eficiência da sacarificação das cadeias celulósicas. As hemiceluloses, principalmente constituída por xilanas, dificultam o acesso das celulasas às cadeias de celulose, diminuindo o rendimento da conversão à glicose. Em alguns casos, a remoção de hemiceluloses se mostrou mais importante que a remoção de ligninas, no que se refere ao rendimento de glicose, principalmente para fibras com baixo teor de ligninas (LEU e ZHU, 2013), como é o caso do sisal. No presente estudo, os resultados mostram que a menor eliminação de hemiceluloses, e portanto de xilanas, na mercerização via ultrassom (FIGURA 41) teve um impacto significativo na conversão da celulose a glicose, quando comparado com a mercerização via agitação mecânica (TABELA 6), que levou a maior eliminação de

hemiceluloses. A polpa de sisal mercerizada via agitação mecânica se mostrou um ótimo substrato para a hidrólise enzimática, tendo em vista a excelente conversão a glicose (TABELA 6).

Estudos de hidrólise da polpa celulósica de sisal via catálise ácida foram realizados pelo Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas (DE PAULA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2013). O maior rendimento em relação a produção de glicose correspondeu a hidrólise da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (NaOH 20%, 3h, 50°C), sob catálise ácida (100°C, 4, 6mol.L⁻¹ H₂SO₄, 6h), e foi de 47%. Durante a hidrólise ácida da polpa celulósica de sisal pode ocorrer a formação de produtos de decomposição, como furfural e hidroximetilfurfural, diminuindo o teor de glicose gerado. Ainda, estes produtos de decomposição interferem na etapa de fermentação, diminuindo, assim, o rendimento de etanol produzido (LACERDA *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, a hidrólise enzimática apresenta vantagens como as condições amenas de pH, pressão e temperatura e a não produção de produtos de decomposição. No trabalho desenvolvido por MORETTI *et al.* (2014), que realizou sobre a hidrólise do bagaço de cana de açúcar tratado com microondas, cerca de 10g de bagaço de cana de açúcar foi misturado em 30 mL, usando diferentes soluções (água destilada, ácido fosfórico e glicerol), a qual foi deixada repousando por 24h e depois submetida a microondas de 2450MHz durante 5min sob refluxo. O melhor resultado referente a eliminação de hemicelulose e lignina foi obtido com o glicerol, em que o teor de hemicelulose e lignina diminui em 5,4% e 11,3% respectivamente. O teor de celulose aumentou em 13%. As reações de hidrólise enzimática foram realizadas com 0,1g do bagaço tratado em 20mL de tampão de acetato (pH 5; 0,1M). A enzima comercial utilizada foi a Celluclast 1.5L (Novozymes) em duas proporções. A primeira proporção utilizada foi de 47,0 U / g de endoglucanase, 14,6 U / g β -glicosidase e 7,3 U / g de xilanases, e a segunda foi de 500,0 U / g de endoglucanase, 156,6 U / g de β -glicosidases e de 78,3 U / g de xilanases. As misturas foram incubadas a 55°C durante 24h. Os licores obtidos foram analisados. Os resultados mostraram que o aumento no teor de celulose e o aumento na proporção das enzimas aumenta o rendimento da reação. Neste estudo em questão, o melhor rendimento obtido (40%) foi referente a maior proporção de enzimas (500,0 U / g de endoglucanase, 156,6 U / g de β -glicosidases e de 78,3 U / g de xilanases) e o bagaço que sofreu maior eliminação de lignina e hemicelulose (tratado com glicerol) (MORETTI *et al.*, 2014).

Em outro estudo (ZHANG e WU, 2014), foi realizado o tratamento do bagaço de cana de açúcar com CO₂ supercrítico, variando a pressão (0-7Mpa), tempo (20-100min) e temperatura (140-180°C). Cerca de 45g de bagaço de cana de açúcar foram adicionados ao reator utilizado com 300mL de água, a seguir, uma certa quantidade de CO₂ foi carregado no reator até atingir a pressão desejada. Durante todo o processo, o bagaço em suspensão foi agitado a 300 rpm. As reações de hidrólise enzimática foram realizadas usando 2g de bagaço de cana de açúcar em 100mL tampão de acetato (pH 4,8) a 50°C, durante os tempos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h. Para cada grama de substrato seco, 1mL de enzima foi adicionada em todas as reações. O maior rendimento de glicose (94,7%) obtido após 72h de hidrólise, correspondeu a reação que utilizou o bagaço de cana de açúcar tratado em CO₂ supercrítico a 180°C, sob pressão de 8,3MPa durante 100min. O melhor rendimento obtido por (ZHANG e WU, 2014) para bagaço de cana de açúcar se aproxima do obtido no presente estudo para a polpa de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°).

5.2.2 Hidrólises enzimáticas de enzimas *celulases* comerciais e fúngicas perante diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina)

Parte do presente estudo foi voltado para a avaliação de enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Para isto, foram realizadas reações correlacionando os resultados obtidos utilizando as enzimas comerciais e fúngicas.

A escolha do fungo *Aspergillus sp.* foi pelo fato, de que o mesmo pode levar a produção de enzimas necessárias para a degradação de polissacarídeos. Por isto, este fungo é de grande importância para a indústria alimentar, têxtil e de papel e celulose. A produção de enzimas a partir deste fungo também é considerada para a obtenção de açúcares para a produção de etanol (DE VRIES e VISSER, 2001; ARO *et al.*, 2005).

Foi realizado, em colaboração com o Grupo de Biocatálise Orgânica (IQSC-USP) um estudo introdutório sobre o crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Este estudo consistiu na variação do meio de crescimento do fungo visando obter enzimas *celulases* para posterior uso na reação de hidrólise da polpa celulósica de sisal. O crescimento do fungo foi realizado em três meios, 100% de farelo de trigo, 50% farelo de trigo + 50% polpa celulósica de sisal e 100% polpa celulósica de sisal. O farelo de trigo foi escolhido por seu alto teor de nutrientes

necessários para o crescimento do fungos (celulose, lignina e hemicelulose). Já a polpa celulósica de sisal foi utilizada por ser o substrato principal deste trabalho. Após obtidas as enzimas *celulases*, foi investigada a atividade de celulases totais (Fpase).

A atividade de celulases totais (Fpase) mede a atividade conjunta das enzimas exoglucanases e endoglucanases, a partir da reação de hidrólise em meio tamponado (citrato, pH~5) de uma tira de papel filtro após 1h. A determinação da atividade de celulases totais (Fpase) é importante, pois é necessário comparar a ação das enzimas comerciais com a daquelas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp* em seus diferentes meios de cultivo.

Após realizadas as reações de hidrólises do papel filtro (material usado de acordo com normas para esta avaliação (GHOSE, 1987) com as enzimas fúngicas e comerciais, foram determinados os teores de açúcares redutores, pelo método DNS, e calculada as atividades Fpase das enzimas utilizando a Equação 8. Os valores referentes as atividades das enzimas produzidas nos diferentes biopolímeros e para a enzima comercial estão representados na TABELA 7.

TABELA 7- Valores das atividades de celulases totais para as enzimas obtidas em diferentes meios de crescimento do fungo *Aspergillus sp* e do complexo enzimático comercial.

Enzima	Atividade de celulases totais ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Celulase comercial	$14.10^{-2} \pm 1^*$
100% Farelo de trigo	$9,5.10^{-2} \pm 1^*$
1:1 Farelo de trigo: polpa celulósica de sisal	$9,8.10^{-2} \pm 1^*$
100% celulose de sisal	$1,8 .10^{-2} \pm 0,6^*$

* Referem-se ao erro, considerando as três medidas feitas.

A atividade do complexo enzimático comercial (TABELA 7), como esperado, apresenta maior valor que as demais. Em relação as atividades das enzimas obtidas pelo crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, observa-se que o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo em meio de farelo de trigo e celulose apresentou maior valor de atividade, embora os erros aproximem os valores. O crescimento do fungo em polpa celulósica de sisal não gerou um caldo com atividade significativa, quando comparado aos outros meios

Em termos de atividade, estes resultados iniciais obtidos, indicaram que as enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* apresentaram valores promissores para um estudo inicial. No entanto, deve-se ressaltar que esta parte do estudo deverá ser aprofundada, por exemplo avaliando a atividade em função do pH, a fim de avaliar se o pH considerado no teste feito é adequado para o caldo enzimático obtido.

Para a realização das reações de hidrólises enzimáticas, foram utilizadas as enzimas obtidas a partir do fungo *Aspergillus sp.* em meio 100% de farelo de trigo, pois as atividades observadas neste meio e em 1:1 Farelo de trigo: polpa celulósica de sisal são próximas, e também devido à facilidade de obtenção de farelo de trigo, para o caso de aplicação em qualquer parte do mundo. A polpa celulósica de sisal utilizada foi a tratada via agitação mecânica (M-AgMec-50°). Inicialmente, o volume do caldo enzimático utilizado, foi de 0,5mL caldo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica (H-*Aspergillus*-SAG-0,5). Porém este volume levou a um baixo teor de conversão a açúcares, por isto, foi triplicado o volume utilizado, que passou a ser 1,5mL caldo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica(H-*Aspergillus*-SAG-1,5). A FIGURA 45 apresenta os resultados referentes aos teores de açúcares redutores obtidos para as duas condições.

FIGURA 42 - Teores de açúcares redutores (via DNS) das reações de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50) utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp*

Como pode ser observado, mesmo com o aumento do volume do caldo enzimático utilizado, os teores de açúcares redutores obtidos foram menores que 1g em 48h de reação. Os resultados iniciais obtidos para as atividades das enzimas fúngicas (TABELA 7), geraram uma expectativa no sentido que o teores seriam maiores que os apresentados, e não tão distantes dos obtidos usando a enzima comercial. Para adquirir mais informações, foi feito o estudo descrito a seguir, em que o papel filtro, usado para avaliar a atividade das enzimas, correspondeu a um dos substratos. Adicionalmente, celulose microcristalina, que pode ser considerada como celulose pura, também foi submetida à hidrólise. Para fins comparativos, a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°) e as enzimas comerciais também foram consideradas.

Portanto, nas reações utilizando caldo enzimático fúngico, foram utilizados 1g de substrato [polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), papel filtro e celulose microcristalina], 50 mL de tampão citrato e 1,5 mL de enzimas *celulases* fúngicas. Nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas comerciais, foram utilizados 1g dos mesmos substratos 50 mL de tampão citrato e 0,5 mL de enzimas *celulases* comerciais.

Esta concentração de enzima foi escolhida para melhor avaliar resultados envolvendo a menor quantidade de enzima comercial usada no presente estudo, tendo em vista que este fator é importante para uma aplicação em larga escala.

5.2.2.1 Caracterização da polpa celulósica residual (não reagida)

5.2.2.1.1 Hidrólise enzimática de diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina) utilizando enzimas *celulases* comerciais

Para estas reações foram utilizados os substratos: polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (M-AgMec-50°), papel filtro e celulose microcristalina comercial. Os valores referentes a MMvis, Ic e α -celulose estão apresentados na TABELA 3. A concentração de enzimas *celulases* comerciais utilizada foi a de 0,5mL de complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica.

A FIGURA 43 apresenta o gráfico referente aos valores obtidos para a MMvis das polpas celulósicas não reagidas para as reações HE-SAG-0,5, HE-MICRO-0,5 e HE-PFT-0,5.

FIGURA 43 - Massa molar média viscosimétrica (MMvis) das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5). Em (a) é apresentada a escala em x até 50 para HE-SAG0,5 e HE-PFR-0,5, em (b) é apresentada a escala em x até 16 para HE-SAG0,5 e HE-PFR-0,5, em (c) é apresentada a escala em x até 50 para HE-MICRO-0,5 e em (d) é apresentada a escala em x até 16 para HE-MICRO-0,5.

Como mencionado anteriormente, a ação conjunta das enzimas exoglucanases e endoglucanases pode levar à alterações na MMvis das polpas celulósicas durante as reações de hidrólise (ZHANG e LYND, 2004). As endoglucanases são responsáveis pela quebra das cadeias maiores em cadeias menores, e as exoglucanases pela solubilização destas cadeias presentes no meio.

A partir dos resultados de MMvis apresentados na FIGURA 43, observa-se que para a polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°), ocorre inicialmente a diminuição da MMvis pela ação das endoglucanases. Logo a seguir ocorre a solubilização de produtos destas cadeias menores, pela ação das exoglucanases, levando a um aumento no valor de MMvis, já que a polpa isolada

do meio não contem mais as cadeias menores isoladas nos tempos anteriores. O mesmo comportamento foi observado durante a reação utilizando papel filtro. A FIGURA 43-d mostra para a celulose microcristalina uma alteração semelhante a dos outros substratos nos valores de MMvis durante as reações de hidrólise enzimáticas, embora a variação observada seja menos intensa, devido ao fato de as cadeias iniciais serem curtas. Assim, a uma tendência de queda, ocorrida até aproximadamente 1,5 h, segue uma tendência de aumento, até aproximadamente 4h de reação. A partir daí se observa uma tendência frente à queda de MMvis, devido à hidrólise das cadeias presentes no meio após 4h de reação. Esta tendência se mantém até aproximadamente 40h de reação, quando então se observa tendência frente a estabilização, embora se tenha somente um ponto após 40h (FIGURA 43-c).

A FIGURA 44 apresenta os gráficos referentes a variação da cristalinidade em função do tempo para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática para as polpas celulósicas de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), para a celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e para o papel filtro (HE-PFT-0,5).

FIGURA 44- Índice de cristalinidade (Ic) das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g⁻¹polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).

A celulose microcristalina é obtida a partir de hidrólise de polpa celulósica, sob condições controladas, que levam a destruição das regiões não cristalinas, e a celulose passa a apresentar uma estrutura composta principalmente de regiões cristalinas. Assim, a cristalinidade inicial da celulose microcristalina (79%) é maior que a cristalinidade da polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°, 68%) e do papel filtro (63%). Como a acessibilidade das enzimas ao substrato é dificultada pela alta cristalinidade, a variação na cristalinidade da celulose microcristalina foi menor, quando comparada às outras polpas celulósicas (FIGURA 44).

O papel filtro apresenta cristalinidade inicial (63%) menor que as cristalinidades da polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°) (68%) e da celulose microcristalina (79%). O papel filtro apresenta maior quantidade de hemicelulose em sua composição perante os outros substratos (TABELA 3). Este fato pode explicar o significativo aumento da cristalinidade do papel filtro, logo no início da reação. A reação inicia com as cadeias de celulose e hemiceluloses presentes na região não cristalina sendo hidrolisadas pelas enzimas (*celulases* e *hemicelulases*), seguidas pelas regiões cristalinas. Na sequência ocorre uma menor variação na cristalinidade, no sentido de diminuição, indicando que algumas regiões cristalinas podem ter sido atingidas, embora a acessibilidade das enzimas às regiões cristalinas seja reduzida, comparativamente a não cristalina. A cristalinidade do papel filtro, após 48h, é de 77% (FIGURA 44).

A FIGURA 45 apresenta as imagens de MEV para as polpas celulósicas residuais referente as reações de hidrólise enzimática (0,5mL de complexo enzimático. g⁻¹ celulose) para o substratos de polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5).

FIGURA 45 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).

A superfície inicial dos substratos celulósicos são bem diferentes umas das outras. A polpa celulósica de sisal (HE-SAG-0,5) apresenta ranhuras, a microcristalina (HE-MICRO-0,5) apresenta feixes de fibras separados, lembrando que a mesma é obtida da hidrólise ácida de polpas celulósicas, e a utilizada no presente trabalho apresentou aspecto fibroso. O papel filtro (HE-PFT-0,5) apresentou superfície mais lisa.

A medida que a reação ocorre, os feixes de fibras se separaram gradativamente, o que ocorreu de forma menos intensa para as fibras do papel filtro. A polpa de sisal é produto de polpação (ocorrida na indústria cedente) e de mercerização, realizada no presente trabalho, e a celulose microcristalina é obtida no geral como produto de polpação seguida de hidrólise ácida. Estes aspectos devem ter favorecido a fragmentação destes materiais, comparativamente ao papel filtro, durante a hidrólise realizada no presente estudo.

A FIGURA 46 apresenta os mapas de densidade referente aos comprimentos e espessuras médios das polpas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando 0,5mL complexo enzimático.g⁻¹celulose para as polpas celulósicas de sisal tratada (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel de filtro (HE-PFT-0,5).

FIGURA 46 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura médios das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PTF-0,5).

Analisando os mapas de densidade observa-se que o ataque das enzimas é mais visível para a celulose microcristalina. Esta inicia com pico de maior densidade no intervalo de comprimento [77-215] μm e logo com 30min de reação passa para [46-77] μm . Em relação a espessura, ela inicia apresentando grande parte das suas fibras no intervalo de [>39] e um pequeno pico em [6-8] μm . Em 30min, o seu maior pico de espessura passa para o intervalo de [30-39] μm . A partir de 4h de reação o pico de maior densidade vai diminuindo e ocorre a formação de outro pico referente ao intervalo de [14-18] μm . Em 15h o pico de [14-18] μm se torna um pico no intervalo de [18-23] μm , ou seja, as fibras que estavam contidas em [14-18] μm diminuem de espessura e passam a estar contidas no intervalo de [6-8] μm e as fibras que estavam contidas no pico de maior densidade passam a estar contidas no grupo [18-24] μm . A partir de 39h, existem apenas o pico de maior densidade em [39-50] μm que diminui com o tempo de reação e o pico em [6-8] μm que aumenta até o fim da reação.

Em relação as polpas não reagidas provenientes da reação de hidrólise enzimática utilizando papel filtro, o comprimento é pouco alterado durante toda a reação, pois o pico de maior densidade permanece desde o início até o fim da reação no intervalo de [77-215] μm . Em relação a espessura das fibras, observa-se que o maior pico de densidade inicia no intervalo de [14-18] μm e ao longo da reação este passa ser o [18-23] μm . A partir de 4h há a presença de um pico em [6-8] μm que significa que as fibras diminuíram sua espessura ao longo da reação.

Parte dos resultados previamente descritos também foram usados para construir gráficos de barra (tempos de 0, 8, 23 e 48h) referente ao comprimento e espessura das fibras não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* comerciais e como substrato a polpa celulósica de sisal (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5) estão apresentados na FIGURA 47.

FIGURA 47 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura das polpas celulósicas não reagidas das reações de hidrólise enzimática (0,5mL complexo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica) utilizando a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5).

Analisando a FIGURA 47, é possível observar que para as reações HE-SAG-0,5 e HE-MICRO-0,5, no geral, durante a reação ocorreu a diminuição da densidade das fibras mais espessas, aumentando assim a densidade das fibras de menores valores de espessura. Esta proporção é melhor visualizada na reação HE-SAG-0,5. Em relação ao comprimento, as alterações nas densidades foram menos significativas. Para a celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5), é observado que as fibras apresentaram densidades praticamente iguais para todos os valores de comprimento, após 48 h de reação, exceto para o intervalo em [77-129] μm que apresenta uma densidade maior. Para HE-PFT-0,5 as alterações foram muito pequenas quando comparadas as outras reações (HE-SAG-0,5; HE-MICRO-0,5).

5.2.2.1.2 Hidrólise enzimática de diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina) utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus*

As reações de hidrólises enzimática utilizando as enzimas fúngicas foram realizadas utilizando 1,5mL de caldo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica. Como substrato foi utilizado a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) e a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5).

A FIGURA 48 apresenta o gráfico referente a variação da MMvis para as polpas celulósicas não reagidas a partir das hidrólises enzimáticas utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus* sp.

FIGURA 48 - Variação da massa molar média viscosimétrica (MMvis) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus* sp. (1,5mL caldo enzimático. g⁻¹polpa celulósica) Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) como substratos.

Em reações de hidrólise enzimática, a partir da ação conjunta das enzimas *celulases*, inicialmente são consumidas as cadeias da região não cristalina. Isto pode levar a uma diminuição da MMvis nos primeiros momentos de reação. A posterior fragmentação e

dissolução de cadeias menores (oligômeros) no meio pode levar ao aumento da massa molar média observada para H-*Aspergillus*-SAG-I,5 e H-*Aspergillus*-PFT-I,5 (FIGURA 48). Para este último a diminuição foi maior que para H-*Aspergillus*-SAG-I,5, devido ao maior teor de hemiceluloses no papel filtro, as quais podem ser hidrolisadas no início da reação por possíveis enzimas (*hemicelulases*) presentes no caldo enzimático obtido. Para a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-I,5), observa-se uma certa tendência à queda até aproximadamente 2,5 h, seguida de aumento, mantendo-se aproximadamente constante até o final da reação (FIGURA 48).

A FIGURA 49 apresenta os índices de cristalinidades para as polpas celulósicas não reagidas retiradas durante as hidrólises enzimáticas utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* A cristalinidade diminuiu inicialmente e depois se manteve aproximadamente constante, com oscilações, durante a reação da polpa celulósica de sisal (H-*Aspergillus*-SAG-I,5). Para a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-I,5) se observou tendência frente a aumento inicialmente, indicando consumo de cadeias presentes nas regiões não cristalinas, mantendo-se aproximadamente constante até o final. Para o papel filtro, ocorreu um aumento na cristalinidade após 4h de reação e na sequência se manteve constante. O aumento inicial deve ser decorrente da eliminação de hemiceluloses presentes nas regiões não cristalinas do papel filtro, conforme já mencionado.

FIGURA 49– Índice de cristalinidade (I_c) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* A concentração utilizada foi de 1,5mL caldo enzimático. g^{-1} polpa celulósica. Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) como substratos.

A FIGURA 50 apresenta as imagens de MEV para as polpas celulósicas não reagidas a partir das hidrólises enzimáticas utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

FIGURA 50 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus* sp. (1,5mL caldo enzimático. g⁻¹ polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.

Durante as reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* comerciais, foi possível observar que, para a polpa celulósica de sisal (M-AgMec-50°) e para a celulose microcristalina, a fragmentação das fibras levou ao aumento das ranhuras nas fibras. Para o papel filtro as alterações em sua superfície foram menos evidentes (FIGURA 45). Já para as fibras retiradas do meio durante as reações de hidrólise enzimática utilizando as enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, não foi possível observar alterações significativas nas respectivas superfícies (FIGURA 50), um indicativo que a ação das enzimas obtidas a partir do *Aspergillus sp.* foi menos efetiva, comparativamente às *celulases* comerciais.

Os mapas de densidades referente ao comprimento e espessura médios das fibras das polpas celulósicas não reagidas são apresentados na FIGURA 51. Como observado, nem o comprimento e nem a espessura são alterados de forma significativa durante toda a reação. O pico de maior densidade referente ao comprimento da polpa celulósica de sisal permanece no intervalo de [46-129] μm , e o pico de maior densidade, em relação a espessura, permanece no intervalo de [18-23] μm . Para a celulose microcristalina, os picos de maior densidade apareceram nos intervalos de [46-77] μm e [30-50] μm , para o comprimento e espessura respectivamente. O pico de maior densidade para o comprimento, do papel filtro, encontra-se no intervalo de [129-215] μm e de espessura em [18-23] μm . Durante a hidrólise enzimática, destes mesmos substratos, utilizando enzimas *celulases* comerciais, observou-se que os valores foram alterados, principalmente para a espessura das fibras (FIGURA 46), mostrando que a ação das enzimas comerciais é consideravelmente mais intensa que a enzima obtida a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

FIGURA 51 - Mapas de densidade referente ao comprimento e espessuras médios para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus* sp. (1,5mL caldo enzimático. g⁻¹polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-Aspergillus-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-Aspergillus-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-Aspergillus-PFT-1,5) como substratos.

H-Aspergillus-SAG-1,5 15 horas

H-Aspergillus-MICRO-1,5 15 horas

H-Aspergillus-PFT-1,5 15 horas

H-Aspergillus-SAG-1,5 23 horas

H-Aspergillus-MICRO-1,5 23 horas

H-Aspergillus-PFT-1,5 23 horas

H-Aspergillus-SAG-1,5 31 horas

H-Aspergillus-MICRO-1,5 31 horas

H-Aspergillus-PFT-1,5 31 horas

H-Aspergillus-SAG-1,5 39 horas

H-Aspergillus-MICRO-1,5 39 horas

H-Aspergillus-PFT-1,5 39 horas

H-Aspergillus-SAG-1,5 48 horas

H-Aspergillus-MICRO-1,5 48 horas

H-Aspergillus-PFT-1,5 48 horas

Parte dos resultados descritos anteriormente foram usados para construir gráficos de barras. A FIGURA 52 apresenta os gráficos de barras para o comprimento e espessura das fibras presentes nas polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando as enzimas obtidas durante o crescimento do fungo *Aspergillus sp* (0, 8, 23 e 48 h de reação).

FIGURA 52 - Gráficos em barras para o comprimento e espessura para as polpas celulósicas não reagidas nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp*. (1,5mL caldo enzimático. g⁻¹polpa celulósica). Foram utilizadas a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) como substratos. Os tempos das amostras são 0, 8, 23 e 48h.

Durante as reações utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp*. a polpas de sisal (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) não apresentaram alterações significativas em seu comprimento e espessura, pois a variação das densidades não foi

significativa. Observa-se que o ataque das enzimas *celulases* comerciais foi muito mais evidente que o observado para as enzimas *celulases* fúngicas, pois com as enzimas comerciais ocorreram maiores variações nas densidades referentes a espessura das fibras utilizadas.

5.2.2.2 Caracterização dos produtos de reação gerados nas reações de hidrólise enzimática utilizando enzimas *celulases* fúngicas perante diferentes substratos (polpa celulósica de sisal, papel filtro e celulose microcristalina)

A eficiência de uma hidrólise, utilizando *celulases*, pode variar pela natureza da enzima e do substrato (REYES *et al.*, 1998). Por isto, para avaliar a eficiência das enzimas *celulases* utilizadas, foi realizado um estudo utilizando como substrato a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5; H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5; H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (HE-PFT-0,5; H-*Aspergillus*-PFT-1,5). Neste estudo foram utilizadas as enzimas *celulases* comerciais (GENENCOR - Accellerase 1500) e as enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

Os resultados para as concentrações de açúcares redutores pelo método DNS estão apresentados na FIGURA 53-a e para as concentrações de glicose obtidas por HPLC na FIGURA 53 -b. A sobreposição das duas curvas obtidas pelos dois métodos está expressa na FIGURA 53 -c.

FIGURA 53 - (a) Concentração de açúcares redutores (DNS) utilizando enzimas *celulases* comerciais para (0,5 mL complexo enzimático.g⁻¹ polpa celulósica) utilizando como substrato a polpa celulósica de sisal tratada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5), celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e papel filtro (HE-PFT-0,5). **O maior e o menor erro são: $\pm 0,01$ (HE-PFT-0,5_11h) e $\pm 2.10^{-3}$ (HE-MICRO-0,5_15h) respectivamente** **(b)** Concentração de glicose (HPLC). **O maior e o menor erro são: $\pm 0,02$ (HE-PFT-0,5_9h) e $\pm 5.10^{-3}$ (HE-MICRO-0,5_6h)** **(c)** Sobreposição das curvas (a) e (b).

Como observado na FIGURA 53-a, em relação a produção de açúcares redutores, os maiores valores foram obtidos para o papel filtro (HE-PFT-0,5), seguido este pela polpa celulósica de sisal (HE-SAG-0,5) e depois pela celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5). Já em relação a concentração de glicose obtida (FIGURA 53-b), os maiores valores foram para a polpa celulósica de sisal (HE-SAG-0,5), seguida pela celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5) e depois pelo papel filtro (HE-PFT-0,5). Isto ocorreu devido ao maior teor de hemiceluloses presente no papel filtro que foi o único, dentre os três materiais de partida avaliados nesta parte, que gerou xilose suficiente para a detecção via HPLC (FIGURA 54). A xilose produzida foi detectada como açúcar redutor (DNS), levando ao resultado mostrado na FIGURA 53-a. Assim, considerando os resultados obtidos via HPLC, a reação que produziu mais glicose corresponde a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5,

FIGURA 53-b). A FIGURA 53-c mostra que o método DNS é adequado para avaliar teor de glicose em licores produzidos por hidrólise enzimática de substratos celulósicos com baixo teor de hemiceluloses (polpa celulósica de sisal – HE-SAG-0,5) ou com ausência de hemiceluloses (celulose microcristalina – HE-SAG-0,5). Para estes substratos celulósicos as curvas obtidas via DNS e HPLC praticamente se superpõe, enquanto que as curvas correspondentes ao papel filtro mostram diferenças significativas (FIGURA 53-c).

FIGURA 54 – Concentração de xilose (via HPLC) obtida durante a reação de hidrólise enzimática do papel filtro utilizando enzimas *celulases* comerciais (0,5mL de complexo enzimático.g⁻¹ polpa celulósica) (HE-PFT-0,5). O maior erro e o menor erro são, $\pm 0,01$ (11h) e $\pm 2.10^{-4}$ (1h).

Os rendimentos foram calculados a partir do teor de glicose detectados via HPLC, utilizando as equações 9, 10 e 11. Os rendimentos máximos para os tempos de reação de 15h e 48h estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - Valores de glicose máxima, glicose detectada e porcentagem de celulose hidrolisada a glicose para as reações HE-SAG-0,5; HE-MICRO-0,5; HE-PFT-0,5 após 15h e 48h de reação.

		HE-SAG-0,5	HE-MICRO-0,5	HE-PFT-0,5
	Glicose máxima (g.L⁻¹)	21,4	22	17,7
15h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	14,4±0,01*	10,3±4.10 ⁻³ *	9,1±2.10 ⁻³ *
	% de celulose hidrolisada	67	47	51
48h	Glicose detectada (g.L⁻¹)	19,0±4.10 ⁻⁴ *	14,0±9.10 ⁻⁴ *	9,2±0,019*
	% de celulose hidrolisada	88	64	52

* Referem-se ao erro, considerando os dois resultados obtidos.

Os menores rendimentos observados foram para o papel filtro (HE-PFT-0,5) e para a celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5). O baixo rendimento referente ao teor de glicose do papel filtro (HE-PFT-0,5), deve-se ao teor de hemicelulose presente no substrato. Já o baixo rendimento da celulose microcristalina (HE-MICRO-0,5), deve-se ao fato de que cristalinidade da mesma é maior (79%) que as cristalinidades do papel filtro (63%) e da polpa celulósica de sisal (68%) (TABELA 3). As regiões altamente ordenadas dificultam o acesso das enzimas às cadeias de celulose, diminuindo assim as ligações efetivas entre enzima e substrato realizadas durante o processo.

O maior rendimento é o proveniente da polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (HE-SAG-0,5). A mercerização auxilia no aumento do rendimento da reação de hidrólise enzimática, pois elimina hemiceluloses que podem interferir na acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose, conforme já mencionado, além de diminuir a cristalinidade, que pode interferir na interação enzima-celulose.

A eficiência de uma hidrólise é diretamente ligada a quantidade de ligações efetivas que a enzima pode realizar com o substrato. Diferentes substratos geram diferentes rendimentos. Portanto, o entendimento do comportamento das enzima a ser utilizada, perante diferentes substratos, é de muita importância. Por este motivo, foram realizadas reações utilizando a enzima obtida a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* com a polpa celulósica de sisal (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5), para que a enzima seja comparada em questão de rendimento perante a enzima comercial.

A enzima obtida a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* gerou, a partir dos diversos substratos, um teor muito baixo de açúcares quando comparado ao teor obtido pelas enzimas comerciais. O valor máximo se situou em torno de $1,5\text{g.L}^{-1}$ de açúcar redutor (via DNS, FIGURA 55), referente à hidrólise do papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5), cujo resultado engloba também a produção de xiloses, conforme já mencionado. Esta concentração baixa e a presença de substâncias desconhecidas observadas durante a análise dos cromatogramas obtidos, provavelmente, formadas durante a obtenção do caldo enzimático, dificultaram a análise das alíquotas, provenientes das reações utilizando esta enzima, pelo método HPLC. Por isto, toda a discussão acerca destes resultados será desenvolvida considerando os resultados obtidos pelo método DNS.

O método DNS, também, foi utilizado neste trabalho, para a determinação das atividades Fpase das enzimas comerciais e também das obtidas a partir do fungo *Aspergillus sp.* Para os cálculos dos teores de açúcares redutores das reações de hidrólise enzimática, foi usada a equação obtida a partir da curva de calibração apresentada na FIGURA 37.

FIGURA 55 - Variação da produção de açúcar redutor (DNS) para alíquotas provenientes das reações de hidrólise enzimática utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Como substrato, foram utilizados a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5). O maior e o menor erro são, $\pm 0,01$ (H-*Aspergillus*-PFT-1,5_23h) e $\pm 2.10^{-3}$ (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) respectivamente.

A celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5) e a polpa celulósica de sisal (H-*Aspergillus*-PFT-1,5) apresentaram aproximadamente o mesmo comportamento, e a FIGURA 55 mostra um teor de glicose gerado extremamente baixo.

Para o cálculo de rendimento foram considerados os resultados obtidos via DNS, o que no caso do papel filtro não corresponde somente a glicose.

TABELA 9-Valores de glicose máximo, açúcar redutor detectado e rendimentos para as reações utilizando enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, após 15h e 48h de reação

		HA-SISAL-1,5	HA-MICRO-1,5	HA-PFT-1,5
15h	Glicose máxima (g.L ⁻¹)	21,4	22	17,7
	Açúcar redutor detectado (g.L ⁻¹)	0,38±9.10 ^{-3*}	0,43±4.10 ^{-3*}	0,70±3.10 ^{-2*}
	% hidrolisada	1,9	2,0	4,0
48h	Açúcar redutor detectado (g.L ⁻¹)	0,50±8. 10 ^{-3*}	0,55±3. 10 ^{-3*}	1,5±2. 10 ^{-3*}
	% hidrolisada	2,3	2,5	8,5

* Referem-se ao erro, levando em consideração os três resultados obtidos.

As reações de hidrólises utilizando o caldo enzimático obtidos a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* apresentaram baixos rendimentos. Apenas cerca de 2, 5% da polpa celulósica de sisal e da celulose microcristalina foi hidrolisada. Devido a presença de açúcares provenientes de hemiceluloses, o rendimento do papel filtro é maior que os rendimentos obtidos a partir da celulose microcristalina e da polpa celulósica de sisal (TABELA 9).

A FIGURA 56 apresenta a produção de açúcares redutores utilizando enzimas comerciais e enzimas fúngicas.

FIGURA 56–Teores de açúcares redutores(DNS) para as alíquotas provenientes das reações de hidrólise enzimática utilizando o caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp* e utilizando enzimas *celulases* comerciais. Os substratos utilizados foram a polpa celulósica de sisal mercerizada via agitação mecânica (H-*Aspergillus*-SAG-1,5, HE-SAG-0,5), a celulose microcristalina (H-*Aspergillus*-MICRO-1,5, HE-MICRO-0,5) e o papel filtro (H-*Aspergillus*-PFT-1,5, HE-PFT-0,5).

Os resultados da FIGURA 56 destacam a baixa eficiência do caldo enzimático obtido a partir do fungo *Aspergillus sp.*, quando comparado as enzimas *celulase* comercial.

A partir da comparação das atividades Fpase do complexo enzimático comercial e do caldo enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp* (TABELA 7), esperava-se que os teores de açúcares fossem menos distantes que os observados, apesar de os testes de atividade terem sido feitos com papel filtro e usando DNS, o que envolve as restrições já descritas neste texto.

A técnica de eletroforese foi usada para avaliar as enzimas obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp*, comparativamente às *celulases* comerciais. A partir da eletroforese é possível avaliar a formação de enzimas endoglucanases, exoglucanases e a β -

glicosidases, além da formação de xilanases, que são responsáveis pela hidrólise da xilana, principal componente da hemicelulose do sisal.

A FIGURA 57 apresenta o gel de policrílamida após realizada a eletroforese das enzimas utilizadas no presente trabalho. Foram realizadas várias tentativas para o refinamento dos experimentos, visando melhor detectar as bandas que definem o complexo de *celulases*. Na FIGURA 57, estão apresentados os melhores resultados obtidos. Em (a) encontra-se o padrão utilizado (Thermo Scientific), em (b) a enzima comercial e em (c) a enzima obtida a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*

FIGURA 57 – Gel de policrílamida proveniente da eletroforese padrão de escoamento de proteínas (a), das enzimas celulasas comerciais (b) e obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.*(c).

As endoglucanases são detectadas nas bandas 70kDa e 52kDa (FIGURA 57-1), as exoglucanases podem ser detectadas na banda 66kDa (FIGURA 57-2), e a β -glicosidases pode

ser detectadas nas bandas 90kDa e 45kDa (FIGURA 57-4) (ANG *et al.*, 2013). Na FIGURA 57-b, é possível observar que ocorre a superposição de bandas para o complexo enzimático comercial, devido à alta concentração das enzimas no complexo. Nas condições testadas até o momento a separação total das bandas não foi obtida. Como observado na FIGURA 57-c no caldo enzimático fúngico, ocorre a presença das bandas de endoglucanases e exoglucanases e também das β -glicosidases, porém como o caldo é um extrato bruto de enzima, não apenas estas proteínas estão presentes. A presença de xilanases foi confirmada, para as duas enzimas analisadas (FIGURA 57-a,b), pela observação das bandas em 45,7kDa e 39,8kDa, correspondentes a xilanases I e II (FIGURA 57-3) (ANG *et al.*, 2013).

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES

Em meio a buscas de combustíveis alternativos, a hidrólise da biomassa lignocelulósica ganha destaque, sendo importante que sejam oferecidas novas fontes e procedimentos que viabilizem a obtenção de etanol a partir da celulose. O presente estudo consistiu na realização de hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal mercerizadas, utilizando enzimas *celulases* comerciais (Accellerase 1500), e enzimas *celulases* obtidas a partir do crescimento do fungo *Aspergillus sp.* Assim, uma polpa oriunda de uma planta que o país é o maior produtor mundial, foi explorada de forma mais aprofundada, comparativamente a estudos anteriores (LACERDA, 2012), visando ampliar a oferta de biomassa que pode ser usada na área de bioenergia.

O tratamento de mercerização foi aplicado a polpa (20g de polpa.L⁻¹ solução de NaOH 20%) usando agitação mecânica (50°C, 3h) e ultrassom em amplitudes de 20% e 40% (25°C, 1h). Estes tratamentos levaram a um aumento no teor de α -celulose, a diminuição dos índices de cristalinidade (Ic) e a da massa molar média viscosimétrica (MMvis).

As enzimas agiram de forma mais intensa a partir da superfície das fibras pois, as alterações na espessura das fibras foram mais intensas que no comprimento das mesmas. Em relação a produção de açúcares, os melhores resultados corresponderam as reações em que M-AgMec-50° foi o substrato. O seu maior teor de α -celulose, e reduzido teor de hemicelulose, perante as outras polpas tratadas (M-US-20% e M-US-40%) levou a melhores rendimentos.

Enzimas *celulases* foram obtidas a partir do fungo *Aspergillus sp.* A partir da análise de eletroforese, foi possível observar as bandas referente a formação de endoglucanases, exoglucanases, β -glicosidases e xilanases. O caldo proveniente do crescimento do fungo apresentou baixa concentração de enzimas, e a produção de açúcares durante as reações foram muito inferiores, quando comparados com os teores obtidos usando a enzima comercial.

Foi avaliado o comportamento das enzimas *celulases*, tanto a comercial quanto a obtida pelo crescimento do fungo *Aspergillus sp.*, perante outros substratos, além da polpa de sisal mercerizada via agitação mecânica. A celulose microcristalina foi utilizada por ser constituída apenas por celulose, e o papel de filtro foi utilizado como decorrência de o mesmo ser

utilizado para determinação de atividade Fpase de enzimas *celulases*. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos para a polpa celulósica de sisal.

Em relação a produção de açúcares, para a enzima comercial, o melhor rendimento foi obtido para a polpa de sisal. A alta cristalinidade da celulose microcristalina diminui a acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose. O mais alto teor de hemicelulose, comparada a polpa celulósica de sisal, dificultou a ação das enzimas e levou a uma menor produção de glicose a partir do papel filtro. Para a enzima fúngica, foram avaliados os licores pela produção de açúcar redutor (Método Miller ou DNS), pois o baixo teor dificultou a sua análise via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O melhor rendimento foi para o papel filtro, porém, neste licor há presença de xiloses provenientes da hidrólise da hemicelulose, o que elevou o teor de açúcares redutores detectado.

Os resultados mostraram que o processo de produção de enzimas *celulases* pelo crescimento do fungo *Aspergillus sp* requisita investigações mais amplas e aprofundadas.

O excelente rendimento obtido na reação de conversão da polpa celulósica mercerizada via agitação mecânica (98%), mostrou que polpas com propriedades similares à esta correspondem a excelente alternativa como material de partida para processos que visam obtenção de glicose para posterior produção de etanol. Adicionalmente, o presente estudo representa uma valorização do sisal, por indicar aplicação alternativa às atuais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. V. R.; MORGADO, D. L.; RAMOS, L. A.; FROLLINI, E. Sisal cellulose and its acetates: Generation of films and reinforcement in a one-pot process. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 453-465, 2013.
- ANG, S. K.; E.M, S.; Y, A.; A.A, S.; M.S, M. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 3, 2011.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.
- ASS, B. A. P.; BELGACEM, M. N.; FROLLINI, E. Mercerized linters cellulose: characterization and acetylation in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 19-29, 2006.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- AZEVEDO, M. S.; SANTOS, R. V. D. O.; MAGALHÃES, T. V. Produção de etanol no Brasil. **Bolsista de Valor: Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense** v. 2, n. 1, p. 151-154, 2012.
- BARBOSA, V.; RAMIRES, E. C.; RAZERA, I. A. T.; FROLLINI, E. Biobased composites from tannin-phenolic polymers reinforced with coir fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 305-312, 2010.
- BARTERI, M.; DIOCIAIUTI, M.; PALA, A.; ROTELLA, S. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. **Biophysical Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 35-42, 2004.
- BARTON II, F. E. Chemistry of lignocellulose: Methods of analysis and consequences of structure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 21, n. 2-4, p. 279-286, 1988.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

BILLMEYER JUNIOR, F. W. **Textbook of polymer science**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 1984. 578 p.

BUSCHLE-DILLER, G.; ZERONIAN, S. H. Enhancing the reactivity and strength of cotton fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 45, n. 6, p. 967-979, 1992.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

CARVALHO, M. L.; SOUSA JR, R.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; SUAREZ, C. A. G.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 437-447, 2013.

CASTRO, D. O.; RUVOLO-FILHO, A.; FROLLINI, E. Materials prepared from biopolyethylene and curaua fibers: Composites from biomass. **Polymer Testing**, v. 31, n. 7, p. 880-888, 2012.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008. 288p.

COLLINS, E. A.; BARES, J.; BILLMEYER JUNIOR, F. W. **Experiments in polymer science**: New York: John Wiley, 1973. 542 p.

COUGHLAN, M. P. Enzymic hydrolysis of cellulose: An overview. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 107-115, 1992.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRAIG, C. A.; ALLEN, M. W. Enhanced understanding of energy ratepayers: Factors influencing perceptions of government energy efficiency subsidies and utility alternative energy use. **Energy Policy**, v. 66, p. 224-233, 2014.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel. Tecnologias de fabricação da pasta celulósica**. São Paulo: SENAI-IPT, 1981. 492p.

DA SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125p.

DAS, S.; LACHENAL, D.; MARLIN, N. Production of pure cellulose from Kraft pulp by a totally chlorine-free process using catalyzed hydrogen peroxide. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 0, p. 844-850, 2013.

DAVIDSON, R. S.; SAFDAR, A.; SPENCER, J. D.; ROBINSON, B. Applications of ultrasound to organic chemistry. **Ultrasonics**, v. 25, n. 1, p. 35-39, 1987.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DE PAULA, M. P. **Hidrólise ácida de polpa de sisal: características do processo heterogêneo e estudo das reações correlatas**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

DE PAULA, M. P.; LACERDA, T. M.; FROLLINI, E. Sisal cellulose acetates obtained from heterogeneous reactions. **Express Polymer Letters**, v. 2, n. 6, p. 423-428, 2008.

DE PAULA, M. P.; LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Adding value to the Brazilian sisal: Acid hydrolysis of its pulp seeking production of sugars and materials. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 975-992, 2012.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparações de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

DKESHWANI, D. R. Biomass chemistry. In: CHENG, J. (Ed.). **Biomass to renewable energy processes**. New York: CRC, 2010. v.1, cap. 1.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, I. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.

EGÜÉS, I.; ECEIZA, A.; LABIDI, J. Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties. **Industrial Crops and Products**, v. 47, n. 0, p. 331-338, 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FILHO, J. C. A.; PESSANHA, F. S. A. Otimização dos métodos tradicionais e busca de novas alternativas de obtenção de etanol visando a sua viabilidade. **Bolsista de Valor: Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 245-251, 2012.

FINK, H. P.; VALENTA, E.; KUNKE, K.; MANN, G. Wide angle X-ray and solid state ¹³C NMR studies of cellulose alkalization. In: KENNEDY, J. F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; PICULELL, L. (Ed.). **Cellulose and cellulose derivatives: Physicochemical aspects and industrial applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 1995. 523-528.

FREER, S. N.; DETROY, R. W. Biological delignification of ¹⁴C-labelled lignocelluloses by basidiomycetes: Degradation and solubilization of the lignin and cellulose components. **Mycologia**, v. 74, n. 6, p. 943-951, 1982.

GARCÍA, A.; ALRIOLS, M. G.; LLANO-PONTE, R.; LABIDI, J. Ultrasound-assisted fractionation of the lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6326-6330, 2011.

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

HAGHIGHI MOOD, S.; HOSSEIN GOLFESHAN, A.; TABATABAEI, M.; SALEHI JOUZANI, G.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

HALL, M.; BANSAL, P.; LEE, J. H.; REALFF, M. J.; BOMMARIUS, A. S. Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS Journal**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 2, p. 215-225, 2011.

HAMAGUCHI, M.; CARDOSO, M.; VAKKILAINEN, E. Alternative technologies for biofuels production in kraft pulp mills-potential and prospects. **Energies**, v. 5, n. 7, p. 2288-2309, 2012.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT. Pasta celulósica: Determinação de viscosidade intrínseca em solução de cuproetilenodiamina (CUEN) com viscosímetro do tipo capilar C26-1996. **O Papel**, 57, 9, p. 110-118, 1996.

JARVIS, M. Chemistry: Cellulose stacks up. **Nature**, v. 426, p. 611-612, 2003.

JENKINS, B. M.; BAXTER, L. L.; MILES JR, T. R.; MILES, T. R. Combustion properties of biomass. **Fuel Processing Technology**, v. 54, n. 1-3, p. 17-46, 1998.

JIANG, H.; CHEN, Q.; GE, J.; ZHANG, Y. Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1005-1012, 2014.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 101-106, 1998.

JUTAKANOKI, R.; LEEPIPATPIBOON, N.; TOLIENG, V.; KITPREECHAVANICH, V.; SRINORAKUTARA, T.; AKARACHARANYA, A. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 283-289, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KEIJERS, E. R. P.; YILMAZ, G.; VAN DAM, J. E. G. The cellulose resource matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 9-21, 2013.

KLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WANGENKNECHT, W.

Comprehensive cellulose chemistry: fundamentals and analytical methods. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. 263 p.

KRÄSSIG, H. A. **Cellulose: structure, accessibility and reactivity.** Amsterdam: Gordon and Breach, 1993. 240 p.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; KROON, J. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, n. 5, p. 677-690, 1997.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais.** 2012. 252f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LACERDA, T. M.; DE PAULA, M. P.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Saccharification of Brazilian sisal pulp: Evaluating the impact of mercerization on non-hydrolyzed pulp and hydrolysis products. **Cellulose**, v. 19, n. 2, p. 351-362, 2012.

LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 347-356, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.

LEU, S. Y.; ZHU, J. Y. Substrate-Related Factors Affecting Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses: Our Recent Understanding. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 405-415, 2013.

LEVINE, S. E.; FOX, J. M.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 37-51, 2010.

LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGEL, 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, n. 13, p. 4900-4906, 2010.

LINS, M. E.; OLIVEIRA, L. B.; DA SILVA, A. C. M.; ROSA, L. P.; PEREIRA JR, A. O. Performance assessment of alternative energy resources in Brazilian power sector using data envelopment analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 898-903, 2012.

MANO, E. B. **Introdução a polímeros:** Rio de Janeiro: Edgard Blücher, 1985. 111 p.

MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 443-451, 1997.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. An introduction to sonochemistry. **Endeavour**, v. 13, n. 3, p. 123-128, 1989.

MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994.

MCLEAN, B. W.; BORASTON, A. B.; BROUWER, D.; SANAIE, N.; FYFE, C. A.; WARREN, R. A. J.; KILBURN, D. G.; HAYNES, C. A. Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50245-50254, 2002.

MEGIATTO JR, J. D.; HOAREAU, W.; GARDRAT, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Sisal fibers: Surface chemical modification using reagent obtained from a renewable source; characterization of hemicellulose and lignin as model study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8576-8584, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MONSCHEIN, M.; REISINGER, C.; NIDETZKY, B. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose and pretreated wheat straw: A detailed comparison using convenient kinetic analysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 679-687, 2013.

MORETTI, M. M. D. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. D. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; SILVA, R. D.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189-195, 2014.

MORGADO, D. L. **Biocompósitos a partir de celulose de linter: filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose**. 2009. 290 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MORGADO, D. L.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A.; ROSA, D. S.; COMA, V. Biobased films prepared from NaOH/thiourea aqueous solution of chitosan and linter cellulose. **Cellulose**, v. 18, n. 3, p. 699-712, 2011.

MOUAD, A. M. **Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias e fungos) para redução estereosseletiva de cetonas**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Físico Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MWAIKAMBO, L. Y.; ANSELL, M. P. Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, n. 12, p. 2222-2234, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1304 p.

NEVELL, T. P.; ZERONIAN, S. H. Cellulose chemistry fundamentals. In: NEVELL, T. P.; ZERONIAN, S. H. (Ed.). **Cellulose chemistry and its applications**. New York: John Wiley, 1985. 552 p.

O'SULLIVAN, A. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173-207, 1997.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de *A-Amilases* por *Penicillium sp.* e caracterização da enzima. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 1, p. 43– 54, 2011.

OLIVEIRA, F. B.; GARDRAT, C.; ENJALBAL, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Phenol-furfural resins to elaborate composites reinforced with sisal fibers - molecular analysis of resin and properties of composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 4, p. 2291-2303, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

PAIVA, J. M. F. D.; FROLLINI, E. Unmodified and modified surface sisal fibers as reinforcement of phenolic and lignophenolic matrices composites: thermal analyses of fibers and composites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 291, n. 4, p. 405-417, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81-84, 2003.

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, n. 2, p. 125-131, 2005.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701-720, 2014.

PRESTON, R. D. Natural Celluloses. In: YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. (Ed.). **Cellulose: structure, modification and hydrolysis**. New York: John Wiley, 1986. 379 p.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glicoxal reforçadas com fibras naturais**. 2010. 277f. Tese (Doutorado

em Ciências - Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RAMIRES, E. C.; MEGIATTO JR, J. D.; GARDRAT, C.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Biobased composites from glyoxal-phenolic resins and sisal fibers. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1998-2006, 2010.

RAMIRES, E. C.; OLIVEIRA, F.; FROLLINI, E. Composites based on renewable materials: Polyurethane-type matrices from forest byproduct/vegetable oil and reinforced with lignocellulosic fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, 2013.

RAO, M. A.; SCELZA, R.; ACEVEDO, F.; DIEZ, M. C.; GIANFREDI, L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**, v. 107, n. 0, p. 145-162, 2014.

RAZERA, I. A. T. **Fibras lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofenólica**. 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências - Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas: efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, p. 140-143, 1998.

RIESZ, P.; BERDAHL, D.; CHRISTMAN, C. L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 233-252, 1985.

ROBERTS, K. M.; LAVENSON, D. M.; TOZZI, E. J.; MCCARTHY, M. J.; JEOH, T. The effects of water interactions in cellulose suspensions on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings. **Cellulose**, v. 18, n. 3, p. 759-773, 2011.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

SAMEI, N.; MORTAZAVI, S. M.; RASHID, A. S.; SHEIKHZADAH-NAJAR, S. An investigation on the effects of hot mercerization on cotton fabrics made up of open-end yarns. **Journal of Applied Science**, v. 8, p. 4204-4209, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

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

SANTOS, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J.-L. The power of ultrasound. In: CAPELO-MARTÍNEZ, J.-L. (Ed.). **Ultrasound in chemistry: analytical applications**. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH, , 2008. p. 1-16.

SHIBAZAKI, H.; KUGA, S.; OKANO, T. Mercerization and acid hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, n. 2, p. 75-87, 1997.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, p. 661-671, 2009.

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SINDIFIBRAS. **O sisal do Brasil**. 2012. Disponível em: <
<http://www.brazilianfibres.com/portal/index.php/pt/publicacoes> >. Acesso em: 26 set. 2012.

SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

ŠIROKÝ, J.; BENIANS, T. A. S.; RUSSELL, S. J.; BECHTOLD, T.; PAUL KNOX, J.; BLACKBURN, R. S. Analysis of crystallinity changes in cellulose II polymers using carbohydrate-binding modules. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 213-221, 2012.

SJÖSTRÖM, E. Wood polysaccharides. In: SJÖSTRÖM, E. (Ed.). **Wood chemistry: : fundamental and applications**. Orlando: Academic Press, 1981. cap. 3.

STANA-KLEINSCHKE, K.; STRNAD, S.; RIBITSCH, V. Surface characterization and adsorption abilities of cellulose fibers. **Polymer Engineering & Science**, v. 39, n. 8, p. 1412-1424, 1999.

STAUNER, T.; SILVA, I.; EL SEOUD, O.; FROLLINI, E.; PETRI, D. S. Cellulose loading and water sorption value as important parameters for the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1109-1119, 2013.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 216-225, 2014.

SUL'MAN, E. M.; SUL'MAN, M. G.; PRUTENSKAYA, E. A. Effect of ultrasonic pretreatment on the composition of lignocellulosic material in biotechnological processes. **Catalysis in Industry**, v. 3, n. 1, p. 28-33, 2011.

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

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

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the composition and application of biomass ash. Part I. Phase—mineral and chemical composition and classification. **Fuel**, v. 105, n. 0, p. 40-76, 2013.

- VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G.; MORGAN, T. J. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. **Fuel**, v. 94, n. 0, p. 1-33, 2012.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264p.
- WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 67-75, 1991.
- XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL, M. E. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 364-371, 2009.
- YE, Z.; BERSON, R. E. Kinetic modeling of cellulose hydrolysis with first order inactivation of adsorbed cellulase. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11194-11199, 2011.
- YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.
- ZHANG, H.; WU, S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 161-165, 2014.
- ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.
- ZHANG, Y. Q.; FU, E. H.; LIANG, J. H. Effect of ultrasonic waves on the saccharification processes of lignocellulose. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 10, p. 1510-1515, 2008.
- ZHAO, H.; KWAK, J. H.; WANG, Y.; FRANZ, J. A.; WHITE, J. M.; HOLLADAY, J. E. Effects of crystallinity on dilute acid hydrolysis of cellulose by cellulose ball-milling study. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 2, p. 807-811, 2006.