UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VITOR CARLOS COLETTA

**Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação
enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de
microscopia óptica de alta resolução**

São Carlos
2013

VITOR CARLOS COLETTA

Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de microscopia óptica de alta resolução

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Física

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Versão Original

São Carlos
2013

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Coletta, Vitor Carlos

Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de microscopia óptica de alta resolução / Vitor Carlos Coletta; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães -- São Carlos, 2013.

94 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamentos. 3. Enzimas. 4. Fluorescência. 5. Microscopia. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Carlos Coletta

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado(a) em: 06/02/2013

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Debora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Camila Alves de Rezende

Instituição: UNICAMP/Campinas

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Valmor Roberto Mastelaro pela recepção no Programa de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov, sua aluna de doutorado Francieli Colussi e à Dra. Camila Alves Rezende, pela colaboração e pelos materiais cedidos.

Aos colegas, especialmente Fernando Rodrigues da Conceição, Juliana Feliciano e Danielli Galan, com os quais trabalhei mais diretamente.

Aos técnicos Débora, Bruno, Susana, Maria e Livia, especialmente a última, pela assistência na marcação das enzimas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À minha família, pelo apoio para a realização deste trabalho.

RESUMO

COLETTA, V. C. **Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de microscopia óptica de alta resolução.** 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Neste trabalho, foram utilizadas metodologias ópticas para estudo da interação enzimática e de pré-tratamentos da biomassa. Mudanças de carga em fibras de polpa de eucalipto foram estudadas utilizando-se uma porfirina como sonda, uma vez que influenciam na interação enzimática. Foi investigada também a influência do caráter de carga na interação com a safranina, utilizada como marcador de celulose. Estudamos o efeito do pH na interação da enzima Celobiohidrolase Cel7A (CBH I) e de seus domínios separadamente com as fibras de eucalipto por meio do método de arraste, que se baseia na centrifugação da solução dos interagentes e na análise espectroscópica do sobrenadante. Essa interação também foi estudada por microscopia de fluorescência confocal utilizando-se fluoresceína como marcador para as enzimas. Outro objetivo do trabalho foi aplicar a microscopia confocal e a microscopia de imagem de tempo de vida da fluorescência (FLIM), com excitação por um e por dois fótons, para estudar a atuação de um pré-tratamento em bagaço de cana-de-açúcar. Esse pré-tratamento teve duas etapas: a primeira com ácido e a segunda com base. Os resultados para a interação da CBH I com as fibras de eucalipto mostram que esta é influenciada por mudanças de carga tanto no módulo de ligação à celulose (CBM) quanto no domínio catalítico. Imagens espectrais de microscopia confocal indicam a presença da enzima em interstícios ao longo de toda a parede da fibra. Nas amostras de bagaço, há uma forte correlação entre os tempos de decaimento da fluorescência da lignina e sua concentração. Uma não homogeneidade nas características de fluorescência ao longo da parede celular revela domínios de níveis distintos de agregação da lignina. O pré-tratamento ácido desordena a lignina e a acumula na borda externa da parede celular. O pré-tratamento alcalino remove eficientemente a lignina do centro da parede celular, mas não é tão eficiente próximo à superfície. Uma variedade complementar de estados foi acessada pela excitação por dois fótons. Uma estreita banda de emissão e tempos longos de decaimento sugerem que no bagaço não tratado a lignina é organizada de maneira que haja uma fraca interação entre as moléculas.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Pré-tratamentos. Enzimas. Fluorescência. Microscopia.

ABSTRACT

COLETTA, V. C. **Study of pretreatments of biomass and enzymatic interaction by spectroscopic techniques and high resolution optical microscopy.** 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Optical methodologies were used for the study of the enzymatic interaction and pretreatments of biomass. Changes of charge on eucalyptus pulp fibers were studied with the use of a porphyrin as a probe, since these changes influence on the enzymatic interaction. The influence of the charge character was also investigated for the interaction with safranin, used as cellulose labeling. We studied the pH effect on the interaction of the enzyme Cellobiohydrolase Cel7A (CBH I) and its domains separately with eucalyptus pulp fibers by the drag method, which is based on the centrifugation of the enzymes solution with the fibers and on the spectroscopic analysis of the supernatant. This interaction was also studied by confocal fluorescence microscopy with the use of fluorescein as a labeling for the enzymes. Another objective was the application of confocal microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), both with single-photon and two-photon excitation, in the study of a pretreatment applied in sugarcane bagasse. This pretreatment had two steps: the first one with acid and the second one with alkali. The results for the interaction between CBH I and the eucalyptus fibers show that it is influenced by changes of charge both in cellulose-binding module (CBM) and in the catalytic domain. Spectral confocal images indicate the presence of enzymes along all the cell wall. Regarding the bagasse fibers, a strong correlation was observed between the fluorescence decay time and the delignification. A non-homogeneity of the fluorescence properties along the cell wall reveal domains of lignin with different aggregation levels. The acid pretreatment disorders lignin and accumulate it on the external border of the cell wall. The alkali pretreatment removes lignin from the center of the cell wall efficiently, but it is not so effective close to the surface. A complementary variety of states was accessed by two-photon excitation. A narrow emission band and slow decay times suggest that lignin is organized in such a way that the interaction between the molecules is weak.

Keywords: Sugarcane bagasse. Pretreatments. Enzymes. Fluorescence. Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular da celulose em conformação em cadeira e a numeração dos átomos de carbono.....	21
Figura 2 -	Estrutura da celobiose em conformação em cadeira.....	22
Figura 3 -	Açúcares constituintes da hemicelulose.....	24
Figura 4 -	Ligações encontradas em xilanos isolados de paredes celulares de plantas.....	25
Figura 5 -	As três principais unidades estruturais da lignina: 4-hidroxifenil (1), guaiacil (2) e siringil (3).....	26
Figura 6 -	Estruturas do tipo cinamil álcool (1) e fenilcumarona (2).....	27
Figura 7 -	Reações de acidólise e oxidação de estruturas do tipo fenilcumarana..	28
Figura 8 -	Ligações LCC. Benzil éter (1), benzil éster (2), glicosídica (3) e acetal (4).....	29
Figura 9 -	Ilustração de uma parede celular de planta.....	30
Figura 10-	Mecanismos da hidrólise da celulose.....	33
Figura 11 -	Estrutura da CBH I e interação com o substrato celulósico.....	34
Figura 12 -	Fibras de polpa de eucalipto utilizadas no trabalho.....	38
Figura 13 -	Fibras de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas no trabalho.....	38
Figura 14 -	Estrutura do Photogem [®]	40
Figura 15 -	Estrutura molecular da safranina.....	40
Figura 16 -	Exemplo de diagrama de Jablonski.....	43
Figura 17 -	Estrutura dos aminoácidos responsáveis pela fluorescência de proteínas: triptofano, tirosina e fenilalanina.....	43
Figura 18 -	Esquema das etapas do processo de arraste.....	45
Figura 19 -	(a) Ilustração da vista transversal de um objeto cilíndrico de 10 µm de diâmetro. Uma escala típica de resolução vertical é apresentada para comparação. (b) Imagem do plano focal do objeto.....	47
Figura 20 -	Diagrama do princípio confocal.....	47

Figura 21 -	(a) Ilustração da imagem de fluorescência de uma amostra em diferentes comprimentos de onda e seleção de um pixel para análise espectral. (b) Intensidade de emissão em função do comprimento de onda no pixel selecionado.....	49
Figura 22 -	Diagrama de Jablonski para (a) excitação por um fóton e (b) por dois fótons.....	50
Figura 23 -	Região de excitação por um fóton e por dois fótons.....	51
Figura 24 -	Estrutura molecular da fluoresceína.....	53
Figura 25 -	Espectros de excitação (320 a 500 nm) e de emissão (405 a 780 nm) da porfirina no sobrenadante da solução em pH 3,5 para diferentes concentrações de fibras.....	56
Figura 26 -	Razão entre as intensidades da PL da porfirina (613 nm) em solução com fibras de eucalipto ($I_{\text{com fibras}}$) e da solução de porfirina de referência em função do pH.....	57
Figura 27 -	Espectros de excitação de emissão da safranina em solução para diferentes valores de pH.....	59
Figura 28 -	Espectros de excitação (400 a 582 nm) e de emissão (540 a 700 nm) da safranina no sobrenadante.....	60
Figura 29 -	Razão entre as intensidades da PL da safranina (582 nm) em solução com fibras de eucalipto (I) e da solução de safranina de referência (I_0) em função do pH.....	61
Figura 30 -	Espectros de excitação (220 a 300 nm) e de emissão (287 a 500 nm) da CBH I no sobrenadante da solução em pH 3.....	63
Figura 31 -	Gráfico semilog da intensidade normalizada da PL em 340 nm para o CBM, o CD e a CBH I no sobrenadante em função da concentração de fibras.....	64
Figura 32 -	(a) Imagem de um plano focal de uma fibra de eucalipto com excitação em 488 nm. (b) Imagem de um plano focal de uma fibra de eucalipto em solução de enzimas CBH I marcadas com fluoresceína com excitação em 488 nm. (c) Espectros de fluorescência nas posições indicadas por círculos coloridos em (b) e (c).....	67
Figura 33 -	a) Imagem confocal espectral de uma fibra isolada de bagaço pré-tratado com NaOH 0,5% excitado em $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm (CW). b) A imagem de FLIM correspondente e as associadas características de decaimento detectadas pelos canais 1 e 2.....	70

Figura 34 -	Comparação entre as dependências de decaimento da fluorescência obtidas de imagens de FLIM para fibras isoladas de bagaço não tratado, bagaço tratado com H_2SO_4 1%, bagaço tratado com NaOH 4% e para o filme de lignina.....	72
Figura 35 -	Distribuições dos tempos de decaimento rápido (τ_1) e lento (τ_2) obtidas da imagem de FLIM para o bagaço pré-tratado com H_2SO_4 1%, NaOH 0,5%, 2% e 4%. As distribuições são apresentadas também para o filme de lignina e para a fibra de eucalipto para comparação.....	73
Figura 36 -	Tempo de decaimento e área da distribuição em função da fração de lignina.....	76
Figura 37 -	Espectros de fluorescência com excitação por 2P em 770 nm normalizados em 478 nm.....	78
Figura 38 -	Imagens espectrais e espectros de fluorescência para as regiões indicadas pelas circunferências magenta (externa) e azul (interna) da parede da fibra do bagaço não tratado (a), bagaço tratado com H_2SO_4 1% (b) e bagaço tratado com NaOH 2% (c). Imagens de FLIM e dependências de decaimento calculadas para as regiões indicadas pelas circunferências magenta (externa) e azul (interna) da parede da fibra do bagaço não tratado (a'), bagaço tratado com H_2SO_4 1% (b') e bagaço tratado com NaOH 2% (c').....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição química da amostra de bagaço não tratado e das amostras de bagaço submetidas a pré-tratamentos ácido e alcalino.....	39
Tabela 2 -	Propriedades da fluorescência dos aminoácidos em água em pH neutro.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

1P	um fóton
2P	dois fótons
AFEX	ammonia fiber explosion
BMCC	bacterial microcrystalline cellulose
CBH	celobiohidrolase
CBM	cellulose-binding module
CD	catalytic domain
CW	continuous wave
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
g	gramas
I	intensidade
l	litros
LCC	lignin-carbohydrate complexes
M	molar
mg	miligramas
ml	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetros
PL	fotoluminescência
rpm	rotações por minuto
TCSPC	time correlated single photon counting
u. a.	unidades arbitárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Celulose	21
2.1.1	Estrutura molecular	21
2.1.2	Ligações glicosídicas	22
2.1.3	Celobiose	22
2.1.4	Cristalinidade de materiais celulósicos	23
2.2	Hemicelulose	23
2.3	Lignina	25
2.3.1	Fluorescência da lignina	26
2.3.2	Lignina supramolecular	28
2.3.3	Complexos lignina-carboidrato (LCC)	29
2.4	Constituição das paredes celulares de plantas	29
2.5	Pré-tratamentos	30
2.5.1	Pré-tratamento ácido	31
2.5.2	Pré-tratamento alcalino	31
2.6	Celulases	32
2.6.1	Atuação endo e exo	32
2.6.2	Estrutura modular	32
2.6.3	Mecanismo	32
2.6.4	CBH I	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Materiais	37
3.1.1	Fibras de eucalipto	37
3.1.2	Fibras de bagaço de cana-de-açúcar	38
3.1.3	Photogem [®]	39
3.1.4	Safranina	40
3.1.5	CBH I	41
3.2	Métodos	41
3.2.1	Espectroscopia de absorvância UV-Vis	41
3.2.2	Espectroscopia de fluorescência	42
3.2.2.1	Fluorescência de proteínas	43
3.2.3	Interação molecular com material celulósico: Método de arraste	44
3.2.3.1	Interação da porfirina e da safranina com as fibras	45
3.2.3.2	Interação da CBH I e seus domínios pelas fibras	46
3.2.4	Microscopia confocal	46
3.2.4.1	Imagem espectral <i>lambda stack</i>	49

3.2.4.2	Excitação por dois fótons	50
3.2.4.3	<i>Fluorescence lifetime imaging microscopy</i> (FLIM)	51
3.2.4.4	Marcação da CBH I	52
3.2.4.5	Preparação das lamínulas e obtenção das imagens	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	Interação de moléculas de porfirina com fibras de eucalipto	55
4.1.1	Arraste pela variação da quantidade de fibras	55
4.1.2	Efeito do pH no processo de interação	56
4.2	Interação da safranina com fibras de eucalipto	58
4.2.1	Arraste pela variação da quantidade de fibras	58
4.2.2	Efeito do pH no processo de interação	60
4.3	Interação de enzimas CBH I e seus domínios com fibras de eucalipto	62
4.3.1	Arraste pela variação da quantidade de fibras	62
4.3.2	Interação da CBH I com a fibra de eucalipto por microscopia confocal	65
4.4	Correlação entre propriedades da fluorescência e o processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar	69
4.4.1	Imagens espectrais e de tempo de vida (FLIM) de fibras isoladas: propriedades da fluorescência	69
4.4.2	Correlação entre pré-tratamento e tempo de decaimento da fluorescência	72
4.4.3	Excitação por 2 fótons (2P): Dependência espectral	77
4.4.4	Excitação por 2 fótons (2P): Dependência da imagem de decaimento da fluorescência(FLIM)	79
5	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

Tem sido crescente o interesse a nível mundial por combustíveis renováveis, de produção e utilização mais limpa, como é o caso do bioetanol, que é de especial interesse para o Brasil que dispõe de solo e clima propícios para o cultivo de cana-de-açúcar, capaz de produzir grande quantidade deste biocombustível de qualidade superior.

Devido à necessidade de se reduzir a emissão de gases causadores do aquecimento global, fontes de energia que substituam combustíveis fósseis têm um papel fundamental. A Agência Internacional de Energia preparou um plano para reduzir pela metade a emissão equivalente de dióxido de carbono (CO₂) até 2050 em relação aos níveis de 2005. (1) Para que esse objetivo seja alcançado, a participação dos biocombustíveis na energia utilizada para transportes no mundo deverá aumentar de 2% para 27%. (1) Parte desse aumento deve ser obtida com o desenvolvimento de tecnologias como a produção em larga escala do etanol de segunda geração, especialmente utilizando resíduos agrícolas celulósicos como matéria-prima, minimizando o impacto da demanda por biocombustíveis na agricultura. (1) No caso da produção no Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar é uma potencial matéria-prima além do caldo, uma vez que consiste de 60 a 80% de carboidratos. (2-3) Nos Estados Unidos, o maior produtor de etanol do mundo (4), o combustível é produzido a partir do milho. As sobras da planta após a colheita podem ser usadas como matéria-prima além do milho comestível. (5)

Mesmo com a cana-de-açúcar capaz de fornecer o etanol por fermentação direta, o próprio processo de fabricação pode resultar em maior produção deste biocombustível pelo aproveitamento de rejeitos vegetais do processo (também chamados de “*feedstocks*”). Neste contexto, surge o *etanol de segunda geração*, que pode ser gerado pelo processamento do bagaço da cana-de-açúcar ou até mesmo pela palha, pouco utilizado pelas usinas. O aproveitamento destes rejeitos pode aumentar consideravelmente a produção de bioetanol, sem aumentar a área plantada e o comprometimento com a produção de alimentos, elevando e otimizando a produtividade do processo já existente.

As paredes celulares das fibras das plantas consistem principalmente de celulose (20-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%). (6) A celulose é um polímero de glicose e se as ligações entre os monômeros forem rompidas, esse açúcar pode ser fermentado para se produzir etanol. (6) Enzimas conhecidas como celulasas podem atuar na celulose e convertê-la em açúcares. (7) As cadeias de celulose são anexadas à hemicelulose, um polímero

heterogêneo de açúcares.(7) Envolvendo a celulose e a hemicelulose está a lignina, um polímero fenólico de estrutura rígida, que dificulta o acesso de celulasas ao substrato específico.(8) Porém, pré-tratamentos podem remover parte da lignina e da hemicelulose, tornando a celulose mais exposta ao ataque enzimático.(9-10)

A interação de celulasas com seus substratos tem sido amplamente estudada, principalmente por simulações de dinâmica molecular.(11-13) Porém esses trabalhos geralmente não abordam o efeito de fatores como o pH na interação. Mudanças na composição química causadas pelos pré-tratamentos da biomassa também são de grande importância na área de biocombustíveis.(2, 14)

Metodologias ópticas como a microscopia de fluorescência confocal(15-16) e a microscopia de imagem de tempo de vida da fluorescência (FLIM, do inglês *fluorescence lifetime imaging microscopy*) (17) foram desenvolvidas nas últimas décadas e permitem a observação de enzimas em fibras celulósicas(18) além da degradação ou distribuição da lignina na biomassa(19-22).

Este projeto pretende desenvolver e aplicar estas novas metodologias ópticas com resolução microscópica à cadeia de bioconversão da biomassa da cana de açúcar e bioetanol. Mais especificamente, foi estudado a interação da enzima Celobiohidrolase Cel7A (também conhecida como CBH I) do fungo *Trichoderma harzianum* com fibras de celulose de eucalipto. Foi utilizada a espectroscopia de fluorescência para se determinar o efeito do pH na interação da enzima intacta e de seus domínios separadamente com o substrato. A microscopia de fluorescência confocal foi utilizada para observação da distribuição das enzimas ao longo das fibras. Aqui, a caracterização das modificações estruturais será determinante para o entendimento da ação enzimática e servirá de feedback para o controle de processos na cadeia de bioconversão da biomassa em etanol de segunda geração. O uso de técnicas avançadas de microscopia óptica aliadas à espectroscopia de fluorescência irá aumentar a capacidade de observar e obter imagens em tempo real das mudanças estruturais durante a biodegradação. Isso será de fundamental importância na determinação de parâmetros que permitam estabelecer a dinâmica e a eficiência dos processos envolvidos na ação enzimática.

A microscopia confocal foi utilizada também para verificar a eficiência de um pré-tratamento com uma etapa ácida e outra básica em bagaço de cana-de-açúcar, além do efeito na estrutura supramolecular da lignina. Juntamente com a microscopia confocal convencional, foi utilizada a FLIM, para correlação dos tempos de decaimento da fluorescência com a fração de lignina determinada em pesquisas anteriores.(2)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada uma revisão bibliográfica dos conceitos envolvidos no trabalho. Na seção 2.1, é apresentada a definição de celulose e suas características de cristalinidade. Na seção 2.2, é mostrada a definição de hemicelulose. Na seção 2.3, são introduzidas as características estruturais da lignina e suas formas de ligação com a hemicelulose. A distribuição dos componentes na parede celular é descrita na seção 2.4. A seção 2.5 introduz o conceito de pré-tratamento e as propriedades específicas dos pré-tratamentos ácido e alcalino, estudados neste trabalho. A seção 2.6 descreve a estrutura e a atividade das celulases e, mais especificamente, da Celobiohidrolase Cel7A (CBH I), estudada nesta dissertação.

2.1 Celulose

2.1.1 Estrutura molecular

A celulose é um polímero linear de unidades de D-anidroglicopirranose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 1). (7)

Figura 1 -Estrutura molecular da celulose em conformação em cadeira e a numeração dos átomos de carbono. (7)

A numeração convencional dos átomos de carbono é mostrada na Figura 1, com dois átomos de oxigênio ligados a C1, hidroxilas substituintes em C2 e C3, um átomo de oxigênio ligado a C4, e um grupo hidroximetil em C5. (7) As posições 1 e 4 são envolvidas nas ligações entre as unidades. (7) A celulose possui uma extremidade redutora, contendo um hemiacetal não substituído, e uma extremidade não redutora, contendo um grupo hidroxílico extra em C4. (7)

Ligações de hidrogênio entre cadeias adjacentes agregam as moléculas em cristais. (7)

O grau de polimerização da celulose depende da origem e do tratamento. A celulose encontrada na natureza possui um alto grau de polimerização (média de 25000 em *Valonia*) em contraste com a celulose tratada para aplicações (média de 700 em polpa com branqueamento químico). (23)

2.1.2 Ligações glicosídicas

Polissacarídeos são formados por ligações glicosídicas, que são ligações químicas entre o carbono C1 de um monossacarídeo e o oxigênio de uma hidroxila de outro monossacarídeo. (24)

2.1.3 Celobiose

A celobiose, obtida pela hidrólise da celulose, é formada pela ligação β do átomo de oxigênio em C4 de uma unidade de glicose ao centro anomérico de outra unidade de glicose. (7)

Figura 2 - Estrutura da celobiose em conformação em cadeira. (7)

2.1.4 Cristalinidade de materiais celulósicos

A celulose é um polímero semicristalino, possuindo regiões cristalinas e fases amorfas. O grau de cristalinidade varia consideravelmente dependendo da fonte e tem valores altos para *Valonia* (90%) e baixos para fibras artificiais (25-40%). (7) A polpa de eucalipto tem um índice de cristalinidade de 78%, que aumenta com pré-tratamentos de deslignificação por xilanase e oxigênio. (25)

2.2 Hemicelulose

Hemiceluloses são grupos de monômeros heterogêneos e formam ligações com a celulose e com a lignina. Elas se ligam fortemente à superfície das microfibrilas de celulose e entre si por ligações de hidrogênio. Hemiceluloses contêm uma variedade de açúcares como glicose, manose, xilose, arabinose, galactose e 4-O-metil ácido glicorônico. (7)

Figura 3 - Açúcares constituintes da hemicelulose. Adaptado de (7).

A estrutura da hemicelulose geralmente possui uma cadeia linear do tipo xilano ou glucomanan. (26) O xilano é formado por unidades de xilose e é mais abundante em

angiospermas. O glucomanan é constituído por manose e glicose a uma proporção de 1,6:1 (27) e é mais frequente em gimnospermas. Curtos ramos de outros açúcares são ligados a essas cadeias. (7)

Figura 4 - Ligações encontradas em xilanos isolados de paredes celulares de plantas. (28)

2.3 Lignina

A lignina é um material polifenólico de estrutura amorfa, de grande complexidade, grau de polimerização e diversidade. (8) Consiste principalmente de estruturas 4-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) conectadas a átomos de carbono em unidades de fenilpropanoides.(29)

Figura 5 - As três principais unidades estruturais da lignina: 4-hidroxifenil (1), guaiacil (2) e siringil (3). (29)

Essas unidades podem se conjugar de várias formas durante o processo de biossíntese. Devido aos vários fatores envolvidos nesse processo, é apropriado considerar que a diversidade de combinações é ilimitada.(29)

A lignina de angiospermas dicotiledôneas, como o eucalipto, consiste principalmente de unidades G e S. Em angiospermas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, a lignina é formada por unidades G e S em níveis comparáveis e mais unidades H que nas dicotiledôneas. A lignina de gimnospermas consiste principalmente de unidades G. (30)

2.3.1 Fluorescência da lignina

A fluorescência de materiais lignocelulósicos é atribuída principalmente à lignina. (31-32)O processo de fluorescência da lignina foi proposto como sendo uma transferência não radiativa de energia de cromóforos excitados para estruturas dos tipos cinamil álcool (1) e fenilcumarona (2), que emitem a fluorescência. (33)

Figura 6 - Estruturas do tipo cinamil álcool (1) e fenilcumarona (2). (33)

Estruturas do tipo (1) estão presentes na lignina natural enquanto estruturas do tipo (2) são formadas na moagem e em tratamentos ácidos.(33)Esses processos convertem estruturas do tipo fenilcumarana (3) em estruturas do tipo (2) e do tipo estilbeno (4). Processos de biodegradação oxidam estruturas do tipo (3) em fenilcumaronas do tipo (5).(33)

Figura 7 - Reações de acidólise e oxidação de estruturas do tipo fenilcumaran (**3**). (33)

2.3.2 Lignina supramolecular

A polimerização da lignina é afetada por fatores como tipo de solvente, pH, força iônica e temperatura. (34-36) Agregados são formados com o decréscimo do pH ou com o aumento da concentração. A protonação dos grupos hidroxílicos dos fenóis da lignina resulta na ligação entre os orbitais π dos anéis aromáticos. (37)

Foi proposto que a lignina tem diferentes níveis de superestrutura. (38) O primeiro em módulos de cerca de 20 unidades monoméricas. Esses módulos podem se polimerizar em módulos maiores, com cerca de 500 monômeros, que subsequentemente formam glóbulos de diâmetro em torno de 400 nm. Finalmente, agregados de 2 a 6 glóbulos são formados. Os módulos são formados por ligações covalentes e as estruturas maiores são formadas por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals.

2.3.3 Complexos lignina-carboidrato (LCC)

Os quatro principais tipos propostos de ligação entre lignina e carboidratos são benzil éter, benzil éster, glicosídica e acetal.(39) Na ligação benzil éter, o grupo α -hidroxila da lignina é ligado a uma hidroxila do carboidrato. Em benzil éster, o grupo α -hidroxila é ligado ao grupo carboxílico de um ácido glucurônico da hemicelulose. Na ligação glicosídica, um grupo hidroxílico alcoólico ou fenólico da lignina é ligado a uma extremidade redutora do carboidrato. Na ligação acetal, dois grupos hidroxílicos do carboidrato são ligados à lignina.

Figura 8 - Ligações LCC. Benzil éter (1), benzil éster (2), glicosídica (3) e acetal (4).(8)

2.4 Constituição das paredes celulares de plantas

As paredes celulares das plantas têm espessura da ordem de microns, tipicamente. Todas essas paredes possuem lamela média e parede celular primária. Paredes celulares de tecidos especializados também possuem uma parede secundária. A lamela média é rica em pectina e une as células adjacentes. A parede celular primária é formada por microfibrilas de celulose anexadas a hemicelulose e é depositada junto à lamela média. Essas microfibrilas têm diâmetro de 5 a 15 nm e comprimento de vários microns. A parede secundária é depositada internamente à parede primária e contém aproximadamente 95% da celulose. É

2.5 Pré-tratamentos

Pré-tratamentos são necessários para facilitar a obtenção de açúcar a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.(9-10) Consistem em aumentar a área superficial acessível ou diminuir a cristalinidade da celulose ou remover seletivamente a hemicelulose e/ou a lignina da matriz lignocelulósica.

Há uma grande variedade de pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.(40) De acordo com os efeitos e os custos, são considerados de maior potencial os pré-tratamentos com vapor, com base, com água líquida quente e com amônia (AFEX).(10) Há pré-tratamentos de baixa eficiência para deslignificação, mas que têm como principal efeito a remoção de hemicelulose, enquanto outros pré-tratamentos são eficientes para remoção de lignina. Por essa razão, podem ser feitas combinações de pré-tratamentos para remoção efetiva tanto da hemicelulose quanto da lignina. Um exemplo é a combinação do pré-tratamento ácido com o alcalino.(2, 41-42)

2.5.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido tem como objetivo solubilizar a hemicelulose, principalmente em xilose, tornando a celulose mais acessível. (9-10) Outro efeito do pré-tratamento ácido é a reação da lignina solubilizada com outras moléculas formando moléculas maiores.(43) Tem sido utilizado principalmente o ácido sulfúrico (H_2SO_4). (9)

A aplicação do pré-tratamento ácido ao bagaço da cana-de-açúcar permite a obtenção de xilose e outros açúcares a partir da hidrólise da hemicelulose.(44-47)

2.5.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino tem como principal efeito remover parte da lignina da biomassa principalmente pela quebra das ligações éster com a hemicelulose (48). Outro efeito

é o inchaço da matriz lignocelulósica devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio (49), facilitando o acesso de enzimas à celulose(10). O hidróxido de sódio (NaOH) tem sido a base mais utilizada.(9)

2.6 Celulases

2.6.1 Atuação endo e exo

Celulases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 da celulose. Essas enzimas são divididas em dois grupos: endoglucanases e exoglucanases (ou celobiohidrolases), de acordo com a capacidade de clivar as ligações internamente ou em uma das extremidades da cadeia celulósica. Geralmente, celobiohidrolases (CBHs) possuem um sítio ativo em forma de túnel, que pode interagir com a cadeia do substrato apenas pelas regiões terminais. Essas enzimas atuam arrastando a cadeia celulósica através do sítio ativo, onde ligações entre unidades de celobiose são clivadas sequencialmente.

2.6.2 Estrutura modular

Celulases são compostas por módulos ou domínios. Os principais domínios são o domínio catalítico e o módulo de ligação à celulose (CBM, do inglês *cellulose-binding module*). A remoção do CBM resulta na diminuição da atividade enzimática na celulose cristalina devido à diminuição na capacidade de ligação.

2.6.3 Mecanismo

A hidrólise da celulose pode acontecer por inversão ou por retenção da configuração do carbono anomérico (Figura 10). (7) Em ambos os casos, a catálise é feita por dois grupos

carboxílicos no interior do sítio ativo da enzima. (7) O grupo protonado é o ácido catalítico (doador de próton) e o grupo desprotonado é a base catalítica. (7)

Figura 10 - Mecanismos da hidrólise da celulose. (7)

Nas enzimas inversoras, o ácido catalítico doa um próton para o grupo que sai da celulose enquanto a base catalítica desprotona uma molécula de água para a substituição nucleofílica no centro anomérico.(7) No mecanismo das enzimas retentoras, um complexo enzima-substrato intermediário é formado e então hidrolisado.(7) O ácido catalítico protona o grupo que sai da celulose e passa a ser uma base catalítica, desprotonando uma molécula de água nucleofílica.(7)

2.6.4 CBH I

Para degradar substratos cristalinos de celulose, micro-organismos como fungos produzem sistemas de enzimas que atuam em sinergia.

O conjunto de enzimas do fungo *Trichoderma reesei* consiste de pelo menos duas celobiohidrolases (Cel7A e Cel6A, também conhecidas como CBH I e CBH II respectivamente), cinco endoglucanases e duas β -glucosidases. (7) A CBH I é a principal componente do sistema, representando aproximadamente 50% do total das enzimas. (7)

A estrutura da CBH I consiste de um domínio catalítico, um CBM e um ligante entre esses dois domínios (Figura 11).

Figura 11 -Estrutura da CBH I e interação com o substrato celulósico. (11)

A estrutura do domínio catalítico da CBH I foi resolvida por Divne et al. (50) Consiste de duas extensas folhas β antiparalelas curvadas formando um sanduíche β além de quatro curtas α hélices. (50) Os loops entre as β strands são estabilizados por ligações dissulfeto. (50) Foi proposto que os resíduos catalíticos são dois ácidos glutâmicos (Glu) localizados em lados opostos de uma ligação glicosídica. (50-51) Quatro resíduos triptofanos (Trp) distribuídos ao longo do domínio catalítico são os principais responsáveis pela formação dos sítios de ligação à celulose. (50-51) Os anéis glicosídicos tendem a deslizar sobre os grupos indóis dos triptofanos, o que é vital para a hidrólise na CBH I, uma vez que uma interação forte impediria o movimento da cadeia celulósica através do domínio catalítico. (51) Interações por ligações de hidrogênio são mais específicas e estão mais presentes próximo ao sítio ativo. (51) Isso indica que as interações são otimizadas para que na entrada do domínio

catalítico permitam o deslizamento da cadeia celulósica e no sítio ativo auxiliem na catálise. (51)

A processividade da CBH I da extremidade redutora para a não redutora em microcristais de celulose foi demonstrada por Imai et al.(52)

Os CBMs do *Trichoderma reesei* possuem três resíduos aromáticos tirosina (Tyr), responsáveis pela ligação do CBM à celulose cristalina, além de muitos resíduos polares, entre eles, aspargina (Asp) e glutamina (Gln), que podem formar ligações de hidrogênio com a celulose. (11) Beckham et al. propuseram um modelo atomístico mostrando que a distância entre os mínimos de energia de interação do CBM com a celulose correspondem a uma unidade de celobiose, o produto catalítico da CBH I.(11) Esse resultado sugere que o CBM tem a mesma distância de translação do domínio catalítico sobre a cadeia celulósica a cada ciclo.(11) As interações por ligações de hidrogênio são a principal contribuição para os mínimos de energia, mostrando que embora as interações de van der Waals sejam importantes para a ligação do CBM à celulose, as ligações de hidrogênio determinam o movimento do mesmo sobre a cadeia celulósica.(11)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e os métodos utilizados no trabalho. Inicialmente, são descritos os materiais. A seção 3.1.1 descreve o pré-tratamento aplicado às fibras de eucalipto. A seção 3.1.2 descreve o pré-tratamento aplicado às fibras de bagaço de cana-de-açúcar e as composições químicas das amostras resultantes. A seção 3.1.3 apresenta a estrutura e características espectrais do Photogem[®]. A seção 3.1.4 mostra a estrutura da safranina e suas formas de interação com materiais lignocelulósicos. A seção 3.1.5 cita a purificação das enzimas utilizadas no trabalho. Em seguida, são descritos os métodos. As seções 3.2.1 e 3.2.2 apresentam os fenômenos envolvidos nas espectroscopias de absorção e de fluorescência, respectivamente, e os equipamentos utilizados. A seção 3.2.3 introduz o método de arraste, utilizado para quantificar a interação entre moléculas e fibras. A seção 3.2.4 apresenta os princípios da microscopia confocal e os procedimentos para obtenção das imagens.

3.1 Materiais

3.1.1 Fibras de celulose de eucalipto

As fibras (Figura 12) foram fornecidas pela empresa Aracruz Celulose após passarem por tratamentos de depuração e de branqueamento. Esse processo, geralmente, consiste em tratar a polpa celulósica com peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro, oxigênio e soda cáustica. Posteriormente, as fibras passaram por processo de deslignificação com enzimas xilanase e por tratamento ácido.

Figura 12 - Fibras de polpa de eucalipto utilizadas no trabalho. (53)

3.1.2 Fibras de bagaço de cana-de-açúcar

As fibras de bagaço (Figura 13) foram submetidas a um pré-tratamento de duas etapas: a primeira com H_2SO_4 1%, para remoção de hemicelulose, e a segunda com NaOH (0,25% a 4%) para deslignificação, como descrito em (2).

Figura 13 - Fibras de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas no trabalho. (53)

As composições químicas das amostras após o pré-tratamento, mostradas na Tabela 1, foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectroscopia de absorção UV-Vis.(2)

Tabela 1 - Composição química da amostra de bagaço não tratado e das amostras de bagaço submetidas a pré-tratamentos ácido e alcalino. As frações são expressas com base na massa do bagaço seco como uma média de determinações em duplicata. As porcentagens foram calculadas descontando-se a massa de cinzas em cada amostra. (2)

Amostras de bagaço	Composição do bagaço (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Total
Não tratado	44.5 ± 1.1	31.0 ± 0.8	28.2 ± 0.1	103.7 ± 3.5
H ₂ SO ₄ 1%	58.3 ± 0.2	8.9 ± 0.8	33.6 ± 0.7	100.8 ± 1.7
NaOH 0.25%	68.3 ± 0.5	5.4 ± 0.1	26.0 ± 0.3	99.7 ± 0.9
NaOH 0.5%	71.3 ± 1.4	3.5 ± 0.2	24.0 ± 6.9	98.7 ± 0.4
NaOH 1%	83.2 ± 0.6	3.2 ± 0.1	11.2 ± 0.9	97.6 ± 1.2
NaOH 2%	85.9 ± 0.3	3.4 ± 0.1	9.6 ± 0.5	98.8 ± 1.1
NaOH 3%	87.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	9.7 ± 0.5	100.1 ± 0.4
NaOH 4%	84.9 ± 3.9	3.3 ± 0.1	9.4 ± 0.4	97.6 ± 4.7

3.1.3 Photogem[®]

Uma porfirina foi utilizada para estudar a distribuição de cargas em um material complexo como as fibras de celulose. O seu nome comercial é Photogem[®] e possui um valor de pK_a baixo de 3,5, o que a torna favorável para ser utilizada como uma sonda da carga elétrica nas fibras em função do pH (54) após os pré-tratamentos. Essa molécula sofre desprotonação das hidroxilas nos dois radicais dois CH(OH)CH₃ para valores de pH acima de 3,5 possuindo, portanto carga negativa nessa região. Além disso, essa porfirina em solução aquosa apresenta um máximo de emissão em 613 nm. A estrutura monomérica da molécula é representada pela fórmula C₃₄H₃₈N₄O₆.

Figura 14 - Estrutura do Photogem[®]. (55)

No lugar dos radicais R₁ e R₂ podem se ligar CH(OH)CH₃ ou CH₂≡CH₂ enquanto que no lugar dos R₃ e R₄ pode se ligar H. (55) No lugar de todos os radicais pode se ligar também a estrutura monomérica de outras moléculas de Photogem[®]. (55) Quando R₃ e R₄ representam H, os grupos carboxílicos podem interagir com os radicais OH das fibras.

3.1.4 Safranina

A safranina é utilizada como marcador de materiais lignocelulósicos, interagindo com a lignina por interações do tipo π *stacking*. (56) Embora tenha seletividade maior pela lignina, a safranina também interage com polissacarídeos. (56) A estrutura da molécula de safranina é representada pela fórmula C₂₀H₁₉N₄⁺Cl⁻. No presente trabalho estudamos a interação da safranina para uma ampla faixa de valores de pH. O pK_a da safranina é de 5,8. (57)

Figura 15 - Estrutura molecular da safranina. (58)

3.1.5 CBH I

As enzimas CBH I utilizadas foram extraídas do *Trichoderma harzianum*, purificadas e caracterizadas no Grupo de Biotecnologia Molecular – IFSC/USP como descrito em (59-60). Os valores do ponto isoelétrico, pI, do domínio catalítico e do CBM são 4,3 e 6,4, respectivamente. (61) Assim, o domínio catalítico encontra-se negativamente carregado para valores de pH acima de 4,3 e positivamente carregado para valores de pH abaixo deste enquanto que o CBM está positivamente carregado para valores de pH menores do que 6,4 e negativamente carregado para valores de pH acima de 6,4.

3.2 Métodos

3.2.1 Espectroscopia de absorvância UV-Vis

A espectroscopia de absorvância permite quantificar a luz absorvida por um material na transferência de energia da radiação para a matéria. Mede-se a intensidade da luz que passa pela amostra e define-se transmitância (T) como sendo

$$T = I/I_0 \quad (1)$$

onde I é a intensidade da luz que passa pela amostra e I_0 é a intensidade da luz incidente. A absorvância (A) relaciona-se com a transmitância pela equação

$$A = -\ln T \quad (2)$$

A absorvância está relacionada com as características da amostra pela lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 e^{-\epsilon lc} \quad (3)$$

$$A = \epsilon lc \quad (4)$$

onde ϵ é o coeficiente de extinção molar da amostra, l é o caminho óptico e c é a concentração molar.

3.2.2 Espectroscopia de fluorescência

A emissão de luz por uma substância está relacionada com transições eletrônicas entre os níveis de energia. Quando o estado excitado é singlete, o elétron nesse estado é pareado com outro no estado fundamental por spins opostos. (62) Consequentemente, a transição para o estado fundamental é permitida por spin e ocorre rapidamente com a emissão de um fóton.(62) Nesse caso, o processo é classificado como fluorescência. O tempo entre a excitação e o decaimento para o estado excitado na fluorescência é da ordem de nanosegundos.

O espectro de emissão depende da estrutura química do fluoróforo e do solvente. Uma importante característica da espectroscopia de fluorescência é a alta sensibilidade.

Os processos que podem ocorrer após a excitação são ilustrados pelo diagrama de Jablonski. Um típico diagrama de Jablonski é mostrado na Figura 16. Os estados singletos fundamental, primeiro excitado e segundo excitado são representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Para cada um destes estados, há vários níveis de energia vibracionais, representados por números de 0 a 5. Um fluoróforo geralmente é excitado para um nível vibracional mais alto de S_1 ou S_2 .(62) Após a excitação, moléculas em fases condensadas geralmente relaxam para o nível vibracional mais baixo de S_1 .(62) Esse processo é conhecido como conversão interna. Se a molécula relaxa para o estado fundamental com a emissão de um fóton, o processo é conhecido como fluorescência.

Moléculas no estado S_1 também podem sofrer mudança de spin e passar para o primeiro estado tripleto T_1 .(62) A emissão de T_1 é chamada fosforescência e geralmente tem menor energia que a fluorescência.(62)Essa transição de T_1 para o estado fundamental é proibida por spin, e consequentemente, ocorre com probabilidade muito menor que a fluorescência.(62) Pode ocorrer também uma transição de volta para o estado singlete excitado, dando origem à fluorescência atrasada. (63) Outros processos que competem com a fluorescência são a emissão não-radiativa, em forma de calor, e a transferência de energia não-radiativa para outra molécula.

Figura 16 - Exemplo de diagrama de Jablonski. (63)

3.2.3.1 Fluorescência de proteínas

A fluorescência intrínseca de proteínas origina dos aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). (62)

Figura 17 - Estrutura dos aminoácidos responsáveis pela fluorescência de proteínas: triptofano, tirosina e fenilalanina.

O grupo indol no triptofano é o principal responsável pela absorbância e emissão de proteínas no ultravioleta. (62) A tirosina tem eficiência quântica semelhante à do triptofano, mas a banda de emissão é mais estreita. (62) Em proteínas nativas, a emissão da tirosina geralmente sofre supressão devido à interação com a cadeia peptídica ou transferência de energia para o triptofano. (62)

Tabela 2 - Propriedades da fluorescência dos aminoácidos em água em pH neutro. (62)

Aminoácido	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Largura de banda (nm)	Eficiência quântica	Tempo de decaimento (ns)
Triptofano	295	353	60	0,13	3,1 (médio)
Tirosina	275	304	34	0,14	3,6
Fenilalanina	260	282	-	0,02	6,8

3.2.3 Interação molecular com material celulósico: Método de arraste

O método de arraste foi desenvolvido em nosso Grupo (54, 64) para se determinar em uma solução a fração de moléculas que interagem com fibras (ou partículas). Esse método consiste na adição de fibras à solução contendo uma concentração molecular fixa, na centrifugação das fibras dessa solução e na retirada de uma alíquota do sobrenadante para análise espectroscópica. A diminuição da intensidade de luminescência ou da absorção do sobrenadante em relação à solução inicial está relacionada com a interação do soluto com as fibras, uma vez que essas grandezas são proporcionais à concentração.

Figura 18 - Esquema das etapas do processo de arraste. (a) Ilustração de um frasco contendo uma solução cujo soluto é representado por pontos marrons. Após a centrifugação, o sobrenadante (acima da linha tracejada) é retirado para análise espectroscópica. (b) Retorno do sobrenadante e adição de fibras (representadas em bege) à solução. (c) Centrifugação e nova retirada do sobrenadante para tomada dos espectros. (d) Espectros ilustrativos de excitação e emissão do sobrenadante de (a) (preto) e de (b) (vermelho).

3.2.3.1 Interação da porfirina e da safranina com o material celulósico

Foi preparada uma solução de porfirina a uma concentração de $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/l usando-se água Milli-Q como solvente e o pH dessa solução foi alterado para 3,5 adicionando-se alíquotas de HCl. A cada adição de 5 mg de fibras em 10 ml dessa solução, foi realizado o processo descrito na seção 3.3, com centrifugação a 3500 rpm por 3 minutos em uma centrífuga Excelsa II 206 MP. Alíquotas de 2 ml do sobrenadante foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e os espectros de excitação e emissão foram obtidos por um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC. Os resultados das medidas foram plotados no Origin[®].

Para se determinar o efeito do pH na interação entre a porfirina e as fibras, foi preparada uma solução de porfirina a $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/l como referência, sem fibras, e uma solução com a mesma concentração de porfirina e uma concentração de fibras de 0,5 g/l. O pH dessas soluções foi variado de 6 a 2 com a adição de HCl e de 6 a 12 com a adição de NaOH. Para

cada valor de pH, foram comparadas as intensidades da luminescência das duas soluções em 613 nm.

No caso da safranina, foi preparada uma solução com uma concentração de $2,8 \cdot 10^{-4}$ g/l usando-se água Milli-Q como solvente. A cada adição de 5 mg de fibras em 10 ml dessa solução, foi realizado o processo descrito na seção 3.3, com os mesmos parâmetros do arraste da porfirina.

Para se determinar o efeito do pH na interação entre a safranina e as fibras, foi preparada uma solução de safranina a $2,8 \cdot 10^{-4}$ g/l como referência, sem fibras, e uma solução com a mesma concentração de safranina e uma concentração de fibras de 1,0 g/l. O pH dessas soluções foi variado de 7 a 2 com a adição de HCl e de 7 a 12 com a adição de NaOH. Para cada valor de pH, foram comparadas as intensidades da luminescência das duas soluções em 582 nm.

3.2.3.2 Interação da CBH I e de seus domínios com o material celulósico

Foram preparadas soluções de CBH I e de CBM, ambas a uma concentração de $5,2 \cdot 10^{-3}$ g/l em tampão Na_2HPO_4 /ácido cítrico (McIlvaine) a 50 mM em pHs 3, 5 e 7. A cada adição de 5 mg de fibras em 10 ml dessas soluções, foi realizado o processo descrito na seção 3.3, com os mesmos parâmetros do arraste da porfirina. Nos espectros da solução de CBM, as intensidades devido a uma proteína de controle tiveram de ser abatidas.

3.2.4 Microscopia confocal

A microscopia confocal consiste na obtenção da imagem da fluorescência de um plano focal da amostra, eliminando a influência da luz emitida a partir de centenas de nanômetros acima e abaixo do foco. Desse modo, é possível a obtenção de imagens de planos no interior da amostra, como ilustra a Figura 19, desde que a espessura seja fina o suficiente para permitir a penetração da luz.

Figura 19 - (a) Ilustração da vista transversal de um objeto cilíndrico de $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Uma escala típica de resolução vertical é apresentada para comparação. (b) Imagem do plano focal do objeto.

Na microscopia confocal, uma área da amostra limitada pela difração (disco de Airy) é excitada tipicamente por um laser. A fluorescência da amostra é barrada por um anteparo com um orifício (*pinhole*) de abertura de área do disco de Airy para que seja eliminada a influência da luz emitida fora do plano focal. A luz que passa pelo *pinhole* é detectada por uma fotomultiplicadora e o sinal é processado em um computador. Pela realização desse processo em uma varredura de todas as regiões do plano focal, a imagem completa é formada. A velocidade da varredura pode ser controlada de acordo com a necessidade de qualidade da imagem. A imagem final pode ser obtida pela média de várias varreduras. O número de varreduras é, portanto, outro fator importante para a qualidade da imagem.

Figura 20 - Diagrama do princípio confocal. (16)

A resolução lateral na microscopia de fluorescência é definida tipicamente com base no critério de Rayleigh, em que dois pontos são resolvidos se a distância mínima entre eles for igual a do primeiro mínimo do disco de Airy ao centro. (65) Essa distância é dada por:

$$r_{lateral} = 1,22\lambda/2NA = 0,61\lambda/NA \quad (5)$$

onde λ é o comprimento de onda da luz emitida e NA é a abertura numérica da objetiva.

Medidas de resolução utilizando a largura de banda à meia altura da *point spread function* são menores que às calculadas pelo critério de Rayleigh. Na microscopia confocal, áreas limitadas pela difração são empregadas tanto na iluminação quanto na detecção, de modo que apenas os fluoróforos no volume comum às *point spread functions* de iluminação e de detecção podem ser detectados. (65) A *point spread function* na microscopia confocal é, portanto, o produto das *point spread functions* individuais de iluminação e de detecção e suas extensões são reduzidas em 30% em relação à microscopia de campo amplo. (65) Devido a essa redução, a distância de resolução aceitável dos pontos é aproximada para:

$$r_{lateral} = 0,4\lambda/NA \quad (6)$$

Uma equação tipicamente utilizada para descrever a resolução axial é mostrada abaixo, onde n é o índice de refração do meio entre a lamínula e a objetiva. (65)

$$r_{axial} = 1,4\lambda n/NA^2 \quad (7)$$

Para este trabalho, foi utilizado um microscópio confocal Zeiss LSM 780. Como fontes de excitação foram utilizados lasers de diodo de 405 nm (contínuo e pulsado com repetição em 20 MHz), de argônio (linhas espectrais em 458, 488 e 514 nm) e de Ti:safira Coherent Chameleon sintonizável entre 690 e 1100 nm. Para cada comprimento de onda de excitação por um fóton, foi utilizado um filtro dicróico correspondente. Na excitação por dois fótons, foi utilizado um filtro para comprimentos de onda acima de 760 nm.

3.2.4.1 Imagem espectral (modo *lambda stack*)

Uma imagem típica de microscopia confocal mostra apenas a intensidade para cada pixel enquanto uma medida em espectrofotômetro dá apenas um espectro geral. A imagem espectral combina essas características providenciando um espectro para cada pixel.

Para uma dada faixa espectral, cada canal da fotomultiplicadora detecta a fluorescência em um determinado comprimento de onda. Se a faixa de detecção cobrir todo o espectro de emissão e o intervalo entre os comprimentos de onda correspondentes aos canais for suficientemente pequeno, a superposição das imagens registradas pelos diferentes canais resulta na imagem de todo o espectro de emissão da amostra, em outras palavras, a imagem da cor real da fluorescência. A Figura 21a ilustra a intensidade de um pixel de coordenadas x e y variando em função do comprimento de onda. Plotando-se a intensidade do pixel em função do comprimento de onda (Figura 21b), obtém-se o perfil de intensidade de emissão de um fluoróforo localizado nesse pixel.

Figura 21 - (a) Ilustração da imagem de fluorescência de uma amostra em diferentes comprimentos de onda e seleção de um pixel para análise espectral. (b) Intensidade de emissão em função do comprimento de onda no pixel selecionado. (66)

3.2.4.2 Excitação por dois fótons

Na microscopia confocal com excitação por um fóton, regiões acima e abaixo do plano focal são excitadas por cones de luz convergindo para o foco e divergindo deste. Isso pode fotodegradar um grande volume da amostra além tornar a excitação do plano focal pouco eficiente devido à absorção. (15) Esses problemas podem ser resolvidos pela excitação por dois fótons. (15)

Nesse tipo de excitação, um fóton excita a molécula para um estado virtual intermediário. (67) Um segundo fóton interage com a molécula antes do decaimento do estado virtual (da ordem de femtossegundos) levando-a para um estado excitado. (67)

Figura 22 - Diagrama de Jablonski para (a) excitação por um fóton e (b) por dois fótons. (68)

A probabilidade de dois fótons chegarem ao mesmo ponto simultaneamente é igual à probabilidade de um fóton multiplicada pela do outro. Cada uma dessas probabilidades individuais é proporcional à intensidade. Portanto, a probabilidade de dois fótons excitarem o mesmo local simultaneamente é proporcional ao quadrado da intensidade. Como a intensidade é inversamente proporcional à área, a probabilidade de excitação por dois fótons é máxima no plano focal e diminui drasticamente fora dessa região, de modo que não há fluorescência significativa fora do foco. (69) Ao contrário da microscopia confocal convencional, um sistema de excitação por dois fótons não requer um *pinhole* para formar a imagem confocal.

Para que haja uma probabilidade considerável de excitação por dois fótons, é necessário um grande fluxo de fótons, o que requer uma alta potência em lasers de emissão contínua. Por essa razão, são utilizados lasers pulsados, que emitem o fluxo de fótons

necessário com uma potência média relativamente baixa, uma vez que a razão cíclica é muito pequena. (70)

A Figura 23 compara o volume da amostra excitado por um fóton e por dois fótons.

Figura 23 - Região de excitação por um fóton e por dois fótons. A excitação contínua por um fóton (em azul) excita moléculas em grande parte do volume dos cones de luz. A excitação de dois fótons por laser pulsado (em vermelho) acontece próximo ao foco, onde o fluxo de fótons é suficiente para que haja probabilidade considerável de dois fótons interagirem com a molécula simultaneamente. (70)

Além das vantagens sobre a excitação por um fóton, a excitação por dois fótons permite o acesso a uma variedade de estados complementares, uma vez que transições de mesma paridade são proibidas por um fóton, mas permitidas por dois fótons e vice-versa. (71)

3.2.4.3 Imagem de fluorescência por tempo de vida (*Fluorescence lifetime imaging microscopy* ou FLIM)

A fluorescência envolve transições entre estados singletos, que acontecem com alta probabilidade, tornando o processo rápido. (17) Na forma mais simples, a fluorescência decai após o desligamento da fonte de excitação de forma exponencial, descrita por:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (8)$$

onde $I(t)$ é a intensidade da fluorescência no tempo t , I_0 é a intensidade da fluorescência no tempo zero e τ é o tempo em que a intensidade da fluorescência decai para I_0/e .

No caso de diferentes microambientes ou diferentes conformações da molécula fluorescente, a curva de decaimento pode se tornar multiexponencial. (17)

A espectroscopia de tempo de decaimento da fluorescência pode ser combinada com a microscopia, o que permite a medida desse tempo em pequenos volumes de uma amostra. A cada pixel da imagem é atribuída uma cor correspondente ao tempo de decaimento da fluorescência. Esse tempo é sensível ao ambiente local, por exemplo, moléculas que interagem por transferência de energia. (72)

Para as imagens de tempo de decaimento deste trabalho, foi utilizado um sistema PicoQuant. O método utilizado foi o de contagem de fótons (*time correlated single photon counting* ou TCSPC), que tem resolução temporal de 0,1 ns. Os lasers de 405 nm pulsado em 20 MHz e de femto-segundos sintonizável (80 MHz) foram utilizados como fonte de excitação.

3.2.4.4 Marcação da CBH I

As enzimas foram marcadas com fluoresceína, um composto orgânico que em solução aquosa apresenta máxima absorção em torno de 490 nm e máxima emissão em torno de 512 nm. Esse marcador se liga ao aminoácido lisina (Lys) presente na enzima (59), o que não interfere na interação da CBH I com as fibras, uma vez que a lisina não está entre os aminoácidos responsáveis pela interação com a celulose no CBM (11) nem no domínio catalítico (50). A estrutura da molécula de fluoresceína é representada pela fórmula $C_{20}H_{12}O_5$.

Figura 24 - Estrutura molecular da fluoresceína. (73)

Para a marcação foi utilizado o seguinte procedimento: foi preparada uma solução de CBH I com fluoresceína de modo que a concentração molar de fluoresceína fosse 80 vezes superior à concentração de enzimas. Esta solução foi mantida a 10°C por 12 horas. Para a verificação da marcação e separação das moléculas de fluoresceína livres, a solução foi submetida a uma coluna cromatográfica por separação por gel com monitoramento da absorção da enzima (279 nm) e da fluoresceína (490 nm).

3.2.4.5 Preparação das lamínulas e obtenção das imagens

Fibras de eucalipto com enzimas CBHI marcadas

Foi depositada uma suspensão de fibras de eucalipto no interior de um anel preso à superfície de uma lamínula. Em seguida, foi adicionada uma solução de enzimas CBH I marcadas com fluoresceína. As imagens foram obtidas com uma objetiva de 63x com imersão em água no lado oposto da lamínula. Foi feita a média de duas varreduras.

Filme de lignina

Uma suspensão de lignina de eucalipto a 0,5 g/l foi preparada em água e o pH foi aumentado para 9 com alíquotas de uma solução de NaOH, a fim de se diminuir a agregação da lignina. Uma gota dessa suspensão foi depositada em uma lamínula hidrofóbica e um filme de lignina foi depositado devido à migração dos cristais para as bordas da gota durante a

secagem. As imagens foram feitas com uma objetiva de 63x com imersão em água no lado oposto da lamínula. Foi feita a média de duas varreduras.

Fibras de bagaço

As fibras suspensas em água foram secadas depois de serem depositadas em lamínulas. As imagens foram obtidas com uma objetiva de 63x com imersão em óleo. Foi feita a média de duas varreduras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados do trabalho. A seção 4.1 mostra os resultados de interação da porfirina com as fibras de eucalipto em função da quantidade de porfirina e do pH. A seção 4.2 apresenta os resultados de experimentos semelhantes para interação da enzima com as fibras e o estudo da interação por microscopia confocal. A seção 4.3 apresenta os resultados de interação da safranina com as fibras. A seção 4.4 mostra os resultados de microscopia do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, relacionando as características de fluorescência com a concentração e a distribuição de lignina para diferentes concentrações de base utilizadas no pré-tratamento.

4.1 Interação de moléculas de porfirina com fibras de eucalipto

4.1.1 Arraste pela variação da quantidade de fibras

A fibra de eucalipto e a porfirina Photogem[®] foram escolhidas como substâncias padrão para demonstrar a interação entre a biomassa e um sistema molecular através da metodologia de arraste. Os dois grupos carboxílicos da porfirina garantem a adsorção sobre superfícies em compostos óxidos como o TiO₂ por meio de ligações químicas ou de hidrogênio.(54)

O Photogem[®], assim como outras moléculas que possuem uma estrutura de porfirina, apresentam bandas características de absorção e emissão no visível. A absorção pode ser obtida indiretamente através de medidas de excitação da luminescência(Figura 25). A banda principal e de maior intensidade chama-se banda de Soret ou banda B em torno de 400 nm e a de menor intensidade é chamada de banda Q entre 500 e 600 nm. O espectro de PL mostra que há duas bandas principais: uma em torno de 613 nm outra em 675 nm. A intensidade dessas bandas depende do estado de protonação da molécula e, portanto, do pH da solução.

Neste experimento, a concentração de porfirina foi mantida em $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/l eo pH da solução em 3,5. Para cada adição de fibras na solução contendo a porfirina, os espectros de

excitação e de emissão foram registrados, como mostra a Figura 25 para cada concentração de fibra utilizada.

Figura 25 - Espectros de excitação (320 a 500 nm) e de emissão (405 a 780 nm) da porfirina no sobrenadante da solução em pH 3,5 para diferentes concentrações de fibras.

A diminuição das intensidades dos máximos de excitação, em 395 nm, e de emissão, em 613 nm, da porfirina no sobrenadante a cada adição de fibras e centrifugação mostra que a porfirina interage com as fibras nessa condição de pH. Os grupos carboxílicos da porfirina garantem a adsorção a compostos como TiO₂ por ligações químicas ou de hidrogênio. No caso das fibras, ligações de hidrogênio com radicais OH são uma possível forma de interação.

4.1.2 Efeito do pH no processo de interação

As forças eletrostáticas entre as fibras e a porfirina dependem sensivelmente do pH. A desprotonação de grupos carboxílicos pode resultar em uma superfície carregada negativamente. Já grupos hidroxílicos se tornam positivos na dissociação do hidrogênio. Em ambos os casos, a quantidade de carga é influenciada pelo pH da solução. Este parâmetro e o

pK_a de uma molécula dão a probabilidade desta ganhar ou perder um próton em solução. Grupos carboxílicos em porfirinas têm pK_a em torno de 3. Isso significa que a porfirina está desprotonada para pH acima desse valor. Uma repulsão nessa faixa de pH entre a porfirina e as fibras indica que estas estão negativamente carregadas. Abaixo de pH 3, a porfirina está neutra e, portanto, não interage com as fibras.

Para entender a interação porfirina-substrato, o valor do pH foi variado na solução contendo porfirina e fibra de eucalipto, mantendo a concentração fixa de cada componente. Neste experimento de arraste, a concentração de porfirina foi mantida em $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/l e da fibra 0,5 g/l. Para cada valor de pH, foram comparadas as intensidades de luminescência em 613 nm de uma solução sobrenadante após a centrifugação das fibras I e de uma solução de referência de porfirina I_0 no mesmo pH, como descrito na seção 3.3.1. Assim, a dependência da razão I/I_0 com o pH é uma assinatura fiel da interação média porfirina-substrato celulósico e pode fornecer informações preciosas dessa interação que auxiliam no entendimento de processos como a hidrólise enzimática.

Figura 26 - Razão entre as intensidades da PL da porfirina (613 nm) em solução com fibras de eucalipto ($I_{\text{com fibras}}$) e da solução de porfirina de referência em função do pH.

A Figura 26 mostra a razão entre essas intensidades em função do pH. A interação porfirina-substrato é mínima ($I/I_o \sim 1$) para valores de pH igual a 5. Essa interação aumenta continuamente ($I/I_o < 1$) para valores de pH maiores que 5. A razão I/I_o cai abruptamente para valor de pH=4 e é uma indicação de que porfirina é fortemente atraída pelo substrato celulósico. No intervalo de pH entre 2 e 4 a interação diminui novamente. É importante salientar que este comportamento é reprodutível, ou seja, foi confirmado em uma segunda medida. Além disso, a porfirina sofre variação contínua da intensidade da fluorescência com o pH e por isso foi necessário medir o espectro de referência após a modificação do pH na solução. A pequena variação da intensidade (~10%) após a centrifugação (10000 rpm) desta solução indica a não formação de grandes agregados moleculares para o Photogem[®].

O resultado mostrado na Figura 26 acima é uma indicação de como a interação molecular com o substrato é fortemente modificado pelo estado de carga dos componentes envolvidos na interação. A forte alteração da interação em torno de pH=4 se deve a mudanças no estado de carga da porfirina que sofre uma desprotonação em torno desse valor. Já o aumento contínuo da interação para valores de pH maiores que 5 pode estar associado a mudanças do estado de carga do material que compõe a fibra de eucalipto. Pela complexidade da biomassa, acreditamos que essa interação não é específica, ou seja, associada a sítios com uma carga determinada. A presença de grupos carboxila nas moléculas de porfirinas promove uma eficiente adsorção na superfície das fibras de eucalipto. Dependendo do pH das soluções promove-se protonação ou desprotonação nestes grupos funcionais, alterando assim a eficiência no arraste de moléculas. O conhecimento dessas interações é de fundamental importância para otimizar, por exemplo, a hidrólise enzimática da celulose encontrada em abundância na biomassa.

4.2 Interação da safranina com fibras de eucalipto

4.2.1 Arraste pela variação da quantidade de fibras

A safranina é um sal molecular fluorescente que apresenta carga positiva em solução aquosa com a saída do contraíon Cl^- . Ela é utilizada como marcador biológico em histologia e citologia e de biomassa. Além disso, moléculas de safranina possuem $\text{pK}_a=5,8$ e podem estar totalmente protonadas em soluções altamente ácidas e desprotonadas em alto valor de pH.(57) Assim, a sua carga total é positiva para valores de pH menores que 5,8. Ao contrário da porfirina Photogem[®], a safranina sofre pouca alteração espectral nessa faixa de pH entre 3 e 7 (Figura 27). Isto é uma indicação de que a integridade dos radicais moleculares é preservada. Essa é uma condição fundamental para estudar aspectos de variação de carga exclusivamente da superfície exposta da biomassa.

Figura 27 - Espectros de excitação de emissão da safranina em solução para diferentes valores de pH.

As características de arraste da safranina pela biomassa podem ser demonstradas no experimento da Figura 28 em que a concentração de safranina foi mantida inicialmente em

$2,8 \cdot 10^{-4}$ g/l nas condições de pH=6 neutro. Como para a porfirina, a concentração de fibra foi alterada e espectros de excitação e emissão foram registrados a partir da solução sobrenadante após centrifugação da biomassa, como mostra a Figura 28. A diminuição dos máximos de intensidade de excitação e de emissão confirma a interação da safranina com as fibras de eucalipto. Essa interação ocorre com a lignina e com a celulose (14) em sítios que possuem carga negativa.

Figura 28 - Espectros de excitação (400 a 582 nm) e de emissão (540 a 700 nm) da safranina no sobrenadante.

4.2.2 Efeito do pH na interação da safranina com a fibra de eucalipto

Para cada valor de pH, foram comparadas as intensidades de luminescência I em 582 nm de uma solução com fibras e de uma solução de referência I_0 , como descrito na seção 3.3.1. A Figura 29 mostra a razão I/I_0 entre essas intensidades em função do pH.

Figura 29 - Razão entre as intensidades da PL da safranina (582 nm) em solução com fibras de eucalipto (I) e da solução de safranina de referência (I_0) em função do pH.

O gráfico mostra uma forte interação da safranina com as fibras de eucalipto para valores de pH entre 6 e 10. Esta interação diminui progressivamente para pH menor que 6. Como a safranina possui carga positiva e que aumenta nessa região ácida de pH, o decréscimo da interação safranina-substrato se deve a mudanças na carga da superfície exposta da fibra de eucalipto devido a protonação dos radicais carboxila e hidroxila nesse material. A interação diminui novamente para altos valores de pH maiores que 10. Essa região de pH foge do escopo deste trabalho, pois enzimas utilizadas na hidrólise da celulose possuem estrutura fortemente alterada (64), o que influencia fortemente na interação e na queda de atividade.

4.3 Interação de enzimas CBH I e seus domínios com fibras de eucalipto

4.3.1 Arraste pela variação da quantidade de fibras

Enzimas celulases são utilizadas para que esse processo seja efetivo desde o desempacotamento até a hidrólise completa da celulose presente na biomassa. Ao contrário da porfirina Photogem[®], as enzimas exoglucanase (CBHs) possuem afinidade específica pelas extremidades livres da celulose através do reconhecimento seletivo do CBM. O produto final da hidrólise promovida por essa enzima é a celobiose.

Os processos de interação e adsorção das enzimas CBHI com a biomassa lignocelulósica é de suma importância, pois estas duas etapas são determinantes para que a hidrólise da celulose presentes nestes materiais ocorra. O caráter da interação e a adsorção da CBH I sobre a biomassa pode ser regulada pelo estado de carga desses componentes através da variação do pH e da temperatura, visto que estes parâmetros influenciam na protonação tanto da enzima quanto do substrato e na sua estrutura(64). Nesta seção vamos apresentar resultados referentes o Método de Arraste Enzimático para se determinar as interações e as condições de adsorção de CBH I sobre a fibra de eucalipto.

Como vimos naSeção 2.6.4, as enzimas CBHI são compostas basicamente pelo domínio catalítico e pelo CBM, que são conectados pela sequência poli-peptídica. Os valores do ponto isoelétrico, pI, do domínio catalítico e do CBM são 4,3 e 6,4, respectivamente. (61)Assim, o domínio catalítico encontra-se negativamente carregado para valores de pH acima de 4,3 e positivamente carregado para valores de pH abaixo deste enquanto que o CBM está positivamente carregado para valores de pH menores do que 6,4 e negativamente carregado para valores de pH acima de 6,4.Já grupos hidrofílicos, tais como hidroxílicos, estão presentes nas moléculas constituintes da biomassa lignocelulósica (lignina, hemicelulose e celulose) e a sua carga é alterada de acordo com o valor de pH. Em particular, considerando o tratamento de deslignificação da fibra de eucalipto (53), a porção da celulose exposta encontra-se negativamente carregada para valores de pH acima do valor de seu ponto isoelétrico (pI) de 3,2.Esperamos, portanto, uma atração eletrostática entre CBHI-celulose para valores de pH menores que 4,3 e uma repulsão para valores maiores que 6,4. Sendo assim, estudamos a interação da CBHI com a biomassa de eucalipto na faixa de pH entre 3 e 7.

Conforme vimos na Seção 4.1, o método de arraste enzimático permite obter informação quantitativa da adsorção molecular sobre substratos celulósicos através de medidas simples de fluorescência ou absorbância das enzimas na solução sobrenadante, após a centrifugação do material celulósico. O mesmo método foi utilizado no estudo da interação enzimática com fibras de eucalipto padrão.

Para ilustrar a interação entre a CBH I e a fibra de eucalipto através do método de arraste, a concentração de enzimas foi mantida em $5,2 \cdot 10^{-3}$ g/l e o pH da solução em 3. Aliquotas de 5 mg foram adicionadas à solução aquosa de 10 ml de CBHI. Para cada concentração de fibras, os espectros de excitação e de emissão foram registrados. A Figura 30 mostra os espectros de excitação e PL da enzima CBHI a temperatura de 25 °C em função da concentração de fibras na solução aquosa. Nesse experimento, a solução inicial foi tomada como referência (espectros de linhas pretas). Os espectros de excitação com máximo em 280 nm e de emissão com máximo em 340 nm são característicos do aminoácido triptofano.

Figura 30 - Espectros de excitação (220 a 300 nm) e de emissão (287 a 500 nm) da CBH I no sobrenadante da solução em pH 3.

A Figura 30 mostra que a intensidade dos espectros de excitação e de fluorescência da solução sobrenadante cai com o aumento da concentração de fibra de eucalipto na solução

contendo a enzima CBH I em pH=3. Isto demonstra a interação enzimática com a celulose exposta nessas fibras.

A interação da CBH I intacta com as fibras foi comparada com a interação de cada domínio, de ligação (CBM) e catalítico (CD) separadamente em pHs 3, 5 e 7. Para isso, a intensidades normalizadas I/I_0 do máximo da PL da CBH I, do CBM e do CD em 340 nm foram plotadas em gráfico semilog em função da concentração de fibras no processo de arraste, conforme mostrado na Figura 31.

Figura 31 - Gráfico semilog da intensidade normalizada da PL em 340 nm para o CBM, o CD e a CBH I no sobrenadante em função da concentração de fibras.

O gráfico semilog mostra que a intensidade da fluorescência cai de forma exponencial para todos os casos com o aumento da concentração de fibras de eucalipto. Isto indica que o número de enzimas na solução é reduzido conforme se aumenta o número de sítios de interação. Esta interação é forte (maior arraste) e praticamente a mesma para a CBHI intacta e para CBM em pH=3. Ela diminui e se diferencia com o aumento do valor do pH. Já a interação do domínio catalítico CD é muito fraca (pequeno arraste) para pH=3 e é desprezível

para valores de pH maiores. Isto indica que a interação é basicamente eletrostática que se processa por meio do domínio de ligação, responsável pelo reconhecimento e ancoramento da enzima sobre os domínios específicos da celulose. Esses comportamentos são semelhantes aos observados por Palonen et al. para a celulose bacterial microcristalina (BMCC) como substrato celulósico (74). Os resultados confirmam que a CBH I interage com o substrato pelo CBM principalmente, porém o CD também tem um papel importante nessa interação. Além disso, a curva de atividade enzimática da CBHI é estreita e máxima em torno de pH=5(64,75). A queda da atividade da CBH I para valores de pH maiores que 5 se deve à baixa interação com o substrato e a mudanças estruturais dessa enzima em meio básico. Já a queda na atividade da CBHI para valores de pH menores que 5 se deve às fortes interações eletrostáticas enzima-substrato, o que reduz a mobilidade enzimática sobre o material celulósico.

4.3.2 Interação da CBH I com a fibra de eucalipto por microscopia confocal

Em acordo com a seção precedente, é interessante investigar se a interação enzimática com a fibra de eucalipto se processa sobre a superfície ou se ela se estende por todo o volume do material celulósico. Conforme o trabalho de Alves (53), estas fibras são células de geometria cilíndrica (10 μm de diâmetro e aproximadamente 0,5 mm de comprimento), com parede celular espessa (3-5 μm) e ocas em seu interior. Além disso, elas possuem poros em que se faz a comunicação do exterior com o interior oco.

Assim, a eficiência da hidrólise enzimática depende também de como a enzima tem o acesso à parede celular. Para estudar a extensão da interação da CBH I, utilizamos microscopia confocal no modo espectral dessas fibras na presença dessa enzima, que foi marcada com a molécula fluorescente fluoresceína. Esta molécula possui máximo de absorção em 490 nm e emissão estreita na região do verde-amarelo que se diferencia da emissão larga da lignina que possui máximo no ultravioleta e que se estende pelo azul e que deixa traço até no vermelho. Além disso, a lignina é excitável por toda essa região de emissão devido a não homogeneidade da interação da mesma com o material celulósico e a formação de agregados após os diferentes pré-tratamentos. Assim, no presente experimento, utilizamos como

excitação a linha de 488 nm do laser de argônio, que excita preferencialmente o marcador fluoresceína.

Foram feitas imagens espectrais de microscopia confocal de fibras de eucalipto em água e em solução de enzimas CBH I marcadas com fluoresceína. Cada pixel dessa imagem está associado a um espectro de fluorescência avaliado na região espectral entre 400 e 700 nm. Embora a interação das enzimas com as fibras em pH 7 seja fraca, este pH foi escolhido devido à diminuição da intensidade da fluorescência da fluoresceína para valores mais baixos de pH.

A Figura 32 mostra imagens espectrais de microscopia confocal em um plano focal de uma fibra isolada de eucalipto em água (a) e em solução de enzimas CBH I marcadas com fluoresceína (b) e a comparação entre os espectros de fluorescência avaliados em diferentes posições da imagem (círculos coloridos fora da fibra, na parede celular e no seu interior oco) utilizando-se excitação por laser de argônio em 488 nm para os dois casos (a) e (b). É importante salientar que a imagem feita em parte de uma fibra isolada (1782 x 553 pixels) garante a estatística necessária para se obter um resultado confiável, que se repete ao longo da mesma e em outras fibras avaliadas durante o experimento. Para garantir a comparação entre as imagens e espectros, as condições de foco (resolução no plano de 200 nm e plano focal no meio da fibra) foram mantidas no presente experimento.

Figura 32 - (a) Imagem de um plano focal de uma fibra de eucalipto com excitação em 488 nm. A resolução é de 1782 x 553 pixels. (b) Imagem de um plano focal de uma fibra de eucalipto em solução de enzimas CBH I marcadas com fluoresceína com excitação em 488 nm. A resolução é de 1782 x 650 pixels. (c) Espectros de fluorescência nas posições indicadas por círculos coloridos em (b) e (c).

Na imagem da fibra na Figura 32(a) sem CBH I a fluorescência provem da parede celular correspondente à emissão da lignina residual presente na fibra de eucalipto pré-tratada. O espectro dessa parede avaliada na posição 2(a) (curva tracejada em vermelho) apresenta um aumento de intensidade logo abaixo do comprimento de excitação em 488 nm e possui um máximo em torno de 560 nm. Este espectro é o mesmo ao longo de toda a parede celular.

Já a imagem da fibra com CBH I marcada dá evidência à emissão da fluoresceína que se encontra fora (posição 3(b)) e na parte oca no interior da fibra (posição 1(b) da Figura 32(b)). A intensidade e forma espectral típicas da fluoresceína são basicamente as mesmas para os dois casos. Estes resultados são encontrados em outras fibras nessa solução e confirma de forma reprodutível o fato de que a enzima CBH I tem acesso ao interior oco da fibra de eucalipto pré-tratada. É interessante notar que a intensidade espectral da lignina na parede celular (Figura 32(a)) é uma ordem de magnitude menor que a da fluoresceína complexada na CBH I, o que confere o grande contraste entre solução e parede celular na imagem da Figura 32(b). A presença de fluoresceína não complexada na solução pode ser descartada, pois a CBH I marcada e a fluoresceína não complexada, em excesso na solução, foram separadas em coluna cromatográfica por separação por gel.

Um outro resultado promissor está associado à presença da CBH I na parede celular da biomassa de eucalipto. Isto pode ser visto no espectro contínuo vermelho avaliado dentro da parede (posição 2(b)) na imagem da fibra da Figura 32(b). A geometria confocal e dimensões do foco garantem que esta emissão provem do interior da parede celular. A comparação entre espectros indica que a emissão da parede possui uma contribuição provinda da lignina (emissão em baixa energia entre 600 e 700 nm) e outra emitida pela fluoresceína complexada na CBH I (região espectral entre 500 e 600 nm). Uma vez que a resolução vertical nas condições do experimento está em torno de 0,5 μm e a espessura da parede é de aproximadamente 4 μm , o deslocamento do máximo do espectro é devido à presença de enzimas nos interstícios das paredes da fibra na Figura 32(b). Esse resultado demonstra que a CBHI possui acesso ao interior da parede celular da fibra de eucalipto pré-tratada.

4.4 Correlação entre propriedades de fluorescência e o processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

4.4.1 Imagens espectrais e de tempo de vida (FLIM) de fibras isoladas: propriedades da fluorescência

Nas seções precedentes, fibras pré-tratadas e deslignificadas de eucalipto foram utilizadas como fibras padrões apropriadas para o estudo de interação da enzima CBH I e de moléculas como safranina e porfirina com a biomassa. Vimos que essas moléculas penetram no interior da parede celular onde devem desempenhar a função de degradação ou marcação do material celulósico. No entanto, a interação e o acesso dessas moléculas à celulose são fortemente restringidos pela presença da lignina. A informação a respeito da distribuição e da concentração local da lignina ao longo da matriz da biomassa e da parede celular antes e depois dos pré-tratamentos de deslignificação é de fundamental importância para a transformação da celulose em açúcares menores de baixo peso molecular.

Nesta seção, mostraremos que é possível correlacionar as propriedades de emissão da lignina com a sua distribuição, seu arranjo molecular e sua concentração local na matriz celulósica do bagaço de cana de açúcar após sofrer processos distintos de pré-tratamento: primeiramente o tratamento ácido (1% H_2SO_4) para remover hemicelulose seguido pelo tratamento deslignificante alcalino (NaOH) utilizado concentrações que variam de 0 a 4 % (peso/volume). Espectros de fluorescência e o decaimento temporal dessa emissão foram utilizados para caracterizar fibras isoladas de bagaço de cana de açúcar através de microscopia confocal utilizando excitação por 1 e 2 fótons. Apesar de medir uma única fibra, as imagens espectrais e de decaimento de tempo de vida (FLIM) possuem informações por pixel (espectro e tempo de decaimento) suficientes para se ter a estatística necessária para o presente estudo.

Figura 33 - a) Imagem confocal espectral de uma fibra isolada de bagaço pré-tratado com NaOH 0,5% excitado em $\lambda_{exc} = 405$ nm (CW). A resolução é de 959 x 309 pixels. O espectro abaixo corresponde à emissão medida no interior da circunferência amarela na parede da fibra. As regiões espectrais para os canais 1 e 2 usados para as medidas de tempo de decaimento são mostradas na figura. b) A imagem de FLIM correspondente (511 x 166 pixels) e as associadas características de decaimento detectadas pelos canais 1 e 2. A figura abaixo mostra as distribuições de tempo de decaimento para τ_1 e τ_2 obtidas da imagem de FLIM para o canal 1 (linhas sólidas) e canal 2 (linhas tracejadas).

As propriedades de emissão de uma fibra isolada de bagaço tratado com H_2SO_4 a 1% seguido de NaOH a 0,5% podem ser resumidas na Figura 33. A Figura 33(a) mostra a imagem espectral de um plano confocal obtida através de excitação por 1 fóton por meio de um laser de diodo em 405 nm (CW) e o espectro de fluorescência correspondente medido em uma posição da parede celular (círculo amarelo). A banda de emissão larga é típica para a lignina quando excitada em 405 nm continuamente (CW). Este comprimento de onda corresponde a transições entre estados da cauda de baixa energia da banda de absorção, que persistem para comprimentos de onda maiores que 400 nm devido às não homogeneidades na complexa estrutura da lignina. (31, 32) As regiões espectrais foram separadas por um espelho dicróico em 490 nm para detecção em dois canais (canais 1 e 2) e usadas para as medidas de tempo de decaimento são mostradas na figura.

A Figura 33(b) a imagem de tempo de decaimento e as dependências temporais medidas para a mesma região da fibra isolada de bagaço tratado com NaOH 0,5% na Figura

33(a). O laser de diodo pulsado (repetição de 20 MHz) em 405 nm foi utilizado para excitação do decaimento da fluorescência. Devido à larga banda da emissão, as dependências da intensidade com o tempo foram detectadas em duas regiões espectrais distintas, uma no flanco de descida da fluorescência acima de 490 nm (canal 1) e outra no flanco de subida abaixo deste comprimento de onda (canal 2). A imagem de FLIM correspondente à imagem espectral da Figura 33a e as curvas características dos decaimentos que foram integradas em todos os pixels são mostradas na Figura 33b. A figura mostra que não há diferença considerável entre as características dos decaimentos entre os canais 1 e 2 para excitação do laser pulsado em 405 nm. As dependências dos decaimentos podem ser ajustadas por pixel de imagem como a soma de duas funções de decaimento exponencial, uma com tempo curto (τ_1) e outra com tempo longo (τ_2). A frequência de τ_1 e τ_2 é dada pelas respectivas distribuições (Figura b, abaixo), estimadas pelo decaimento em cada pixel para os canais 1 (linha sólida) e 2 (linha tracejada) na imagem de FLIM. Tempos de decaimento médios para $\tau_1 \sim 1$ ns e $\tau_2 \sim 2$ ns podem ser estimados diretamente da distribuição de tempo de decaimento. Dois tempos médios de decaimento são geralmente encontrados em sistemas não homogêneos como os da biomassa de cana de açúcar. (31,32)

A Figura 34 ilustra como o decaimento da fluorescência da lignina pode ser afetado pelos diferentes pré-tratamentos para amostras excitadas com laser de 405 nm pulsado na faixa de nanosegundos. Nesse experimento, utilizamos as fibras deslignificadas de eucalipto padrões e um filme de lignina depositado sobre substrato de vidro para comparação. Os perfis de decaimento foram obtidos de imagens de FLIM de fibras isoladas de bagaço tratado com H_2SO_4 1% e NaOH 4%, além da fibra de eucalipto e do filme de lignina, usados como referência. Como o tratamento básico foi realizado sempre depois do tratamento ácido, usaremos apenas a notação NaOH seguido da concentração por simplicidade. É notável nesta figura que o decaimento depende fortemente do material e do tipo de pré-tratamento aplicado. O decaimento é rápido para um filme denso de lignina e deve estar correlacionado com os processos de pré-tratamento e com o conteúdo de lignina na amostra de bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que estes processos removem hemicelulose e lignina.

Figura 34 - Comparação entre as dependências de decaimento da fluorescência obtidas de imagens de FLIM para fibras isoladas de bagaço não tratado, bagaço tratado com H₂SO₄ 1%, bagaço tratado com NaOH 4% e para o filme de lignina.

4.4.2 Correlação entre pré-tratamento e tempo de decaimento da fluorescência

A variação do tempo de decaimento pode ser utilizada para quantificar o conteúdo e mapear a distribuição de lignina ao longo das fibras e também para correlacionar a quantidade de deslignificação com um pré-tratamento específico. A Figura 35 mostra o efeito dos tratamentos com H₂SO₄ e NaOH nas distribuições de τ_1 , τ_2 (linhas sólidas) e do tempo médio de decaimento τ (linha tracejada) da fibra de bagaço. As distribuições do filme de lignina e da fibra de eucalipto são apresentadas para comparação.

Figura 35 -Distribuições dos tempos de decaimento rápido (τ_1) e lento (τ_2) obtidas da imagem de FLIM para o bagaço pré-tratado com H_2SO_4 1%, NaOH 0,5%, 2% e 4%. As distribuições são apresentadas também para o filme de lignina e para a fibra de eucalipto para comparação.

Há um desvio significativo nas distribuições de τ_1 , τ_2 (linhas sólidas) e τ (linha tracejada) para tempos mais longos com o pré-tratamento com H_2SO_4 e com o aumento na concentração de NaOH na etapa subsequente do pré-tratamento. Este desvio está fortemente correlacionado com o processo de deslignificação, uma vez que o pré-tratamento alcalino remove lignina da biomassa.(9, 49, 76-77) Portanto, quanto maior a deslignificação, menor o tempo de decaimento. O posicionamento das distribuições na faixa de tempos curtos para o bagaço pré-tratado apenas com H_2SO_4 sugere que este pré-tratamento isoladamente não é tão eficiente para remoção de lignina, como verificado em estudos anteriores. (2) Além disso, a posição das distribuições para as amostras de referência são consistentes com nossas conclusões em relação à concentração de lignina: o filme, que é formado por lignina altamente agregada, tem distribuições na escala de subnanossegundos, enquanto a fibra de eucalipto, quase que totalmente deslignificada, tem as distribuições dispersas na faixa de 1 a 6 ns. É interessante notar que além de se deslocarem, as distribuições se alargam

consideravelmente com o aumento da concentração de NaOH usada no pré-tratamento. Uma vez que na imagem FLIM o decaimento é medido em todos os pixels da imagem da fibra, o alargamento da distribuição indica uma desordem no arranjo da lignina depois do pré-tratamento com ácido ou do aumento da concentração de NaOH na etapa seguinte do pré-tratamento. Mudanças químicas ou estruturais na lignina gerariam essa desordem, uma vez que no modo FLIM cada pixel pode determinar a estrutura submicroscópica da parede da fibra.

As características de decaimento integradas em todos os pixels da imagem de FLIM produzem dados estatísticos suficientes para valores médios confiáveis para τ_1 e τ_2 . A Figura 36 mostra esses valores (quadrados abertos para τ_1 e círculos abertos para τ_2) em função das frações de lignina obtidas por HPLC (2) para o bagaço tratado com H_2SO_4 e diferentes concentrações de NaOH. Essas frações foram calculadas sem consideração das cinzas como parte do bagaço, uma vez que estas representam principalmente impurezas acumuladas antes do pré-tratamento. (2) As linhas contínuas são guias para os olhos. O valor da componente lenta do decaimento (τ_2) assim como o tempo médio τ aumentam linearmente com o decréscimo do conteúdo de lignina no bagaço, enquanto a componente rápida (τ_1) apresenta uma pequena variação que satura em torno de 1 ns na região de baixas concentrações de lignina. A extrapolação da dependência linear de τ_2 para o bagaço totalmente deslignificado dá um limite superior de 5 ns para a lignina, que pode ser uma estimativa para o tempo de decaimento de uma molécula isolada de lignina. O valor de 0,3 ns é tomado como o limite inferior para o tempo da lignina agregada como no filme.

A amplitude das exponenciais rápida e lenta do decaimento mostra o peso com que cada componente contribui para o decaimento total resultante da imagem de FLIM. A Figura 36b dá a dependência da amplitude de cada exponencial com a fração de lignina. As componentes têm quase a mesma contribuição para frações de lignina próximas do valor natural de 30% para o bagaço. Para as amostras mais deslignificadas, o peso da componente lenta τ_2 aumenta linearmente, enquanto o da componente rápida τ_1 satura. Este resultado mostra que existe uma mudança significativa nos pesos de cada componente de decaimento com o processo de deslignificação envolvendo bagaço de cana-de-açúcar. A deslignificação dá peso maior para tempos longos, o que é coerente com o fato da lignina estar menos agregada, já que a agregação acrescenta processos não radiativos concorrentes (transferência de energia, veja abaixo) com o processo radiativo do estado excitado, o que resulta no decréscimo do tempo de decaimento.

A Figura 36a também mostra os valores de $\tau_1 = 1,3$ ns, $\tau_2 = 4$ ns e $\tau = 3,2$ ns para o bagaço não tratado (pontos fechados pretos). Estes tempos de decaimento parecem ser contraditórios e mais relacionados com as amostras mais deslignificadas, uma vez que a fração de lignina é próxima de 30% para o bagaço puro. Porém, os dados aqui apresentados fornecem evidências fundamentais em relação ao entendimento da estrutura da lignina no bagaço. Embora as moléculas de lignina distribuídas na parede da fibra original estejam altamente concentradas, estas estão arranjadas de maneira que a interação entre elas seja baixa. Isto é consistente com o fato de que τ_1 e τ_2 , para o bagaço puro, sejam muito maiores do que para a lignina altamente agregada no filme. Além disso, a distinção entre as distribuições de τ_1 e τ_2 sugere que haja domínios de concentrações muito diferentes de lignina na parede da fibra. A baixa sensibilidade da componente rápida τ_1 para deslignificação abaixo de 23% reforça a estimativa de que haja domínios de lignina altamente agregada em que o NaOH não penetra. Por outro lado, há domínios de lignina menos agregada em que o tratamento alcalino é mais efetivo. Esta não homogeneidade da lignina produzida com o tratamento será discutida mais adiante.

Figura 36 - Tempo de decaimento e área da distribuição em função da fração de lignina. a) Dependência dos tempos de decaimento rápido (τ_1 , quadrados abertos), lento (τ_2 , círculos abertos) e médio (τ , triângulos abertos) com a fração de lignina das amostras mostrada na Tabela 1. Os tempos de decaimentos correspondentes para a fibra de bagaço não tratado são mostrados pelos pontos pretos fechados. Um tempo de decaimento de 4,9 ns foi estimado para uma molécula isolada de lignina pela extrapolação linear da dependência de τ_2 para uma fração zero de lignina. Para a lignina em um filme denso, o tempo de decaimento foi estimado como 0,3 ns. b) Dependência das áreas abaixo das distribuições de τ_1 e τ_2 com a fração de lignina. As linhas sólidas são guias para os olhos.

O deslocamento dos tempos de decaimento (Figura 36a) e a variação das amplitudes (Figura 36b) podem ser associados a mudanças na dinâmica de estados excitados (excitons) devido mais a mudanças no arranjo das moléculas do que mudanças químicas causadas por NaOH. Essa hipótese é consistente com o fato de que o pré-tratamento alcalino remove lignina. Além disso, arranjos de moléculas altamente agregadas promovem interações de dipolo de longo alcance que, conseqüentemente, introduzem meios de transferência de energia que competem com os processos de relaxação interna e emissão. Essa concorrência também é

responsável pela migração de excitons entre as moléculas de lignina, o que aumenta a probabilidade de supressão da emissão em sítios não-radiativos. Todos esses mecanismos de concorrência aumentam a taxa de decaimento radiativo. Por outro lado, o pré-tratamento com NaOH reduz a quantidade de lignina, reduzindo os meios competidores não-radiativos e a migração. Como consequência, espera-se que decaimento radiativo se torne mais lento.

4.4.3 Excitação por 2 fótons (2P): Dependência espectral

Transições entre estados de mesma paridade, que são proibidas em excitação por um fóton (1P), são permitidas por dois fótons(2P).(71) Consequentemente, uma nova variedade de estados pode ser acessada pela excitação por dois fótons.

A Figura 37 mostra os espectros de fluorescência para amostras de bagaço com diferentes pré-tratamentos e para a fibra de eucalipto, excitadas por 2P em 770 nm por um laser sintonizável com repetição de 80 MHz e largura de pulso nominal de 140 fs. Detalhes das imagens excitadas por 2P serão mostrados mais abaixo. A emissão do bagaço excitado por 2P é caracterizada por uma banda muito mais larga que a da excitação por 1P (vide Figura 33(a)). Como os espectros excedem a faixa de detecção utilizada para este experimento, os mesmos foram normalizados em 478 nm para se ter uma melhor visualização dos efeitos dos pré-tratamentos. É importante notar que o bagaço não tratado tem uma banda estreita de emissão centrada na região espectral do azul. Porém, essa banda se alarga consideravelmente na região do visível e do infravermelho próximo para o bagaço tratado apenas com H₂SO₄ 1%. Esta é uma indicação de que o arranjo natural da lignina no bagaço foi fortemente afetado pelo pré-tratamento ácido de modo que novos estados excitados por 2P

Figura 37 - Espectros de fluorescência com excitação por 2P em 770 nm normalizados em 478 nm.

foram formados na cauda da densidade de estados da lignina. O aumento no número de diferentes ambientes em torno de cada molécula é uma explicação para essas modificações espectrais.(78) Uma grande desordem deve ocorrer com o pré-tratamento ácido devido à reação da lignina solubilizada com oligômeros ou com outras moléculas de lignina formando moléculas maiores (43) afetando a estrutura supramolecular (8). Para o bagaço tratado com NaOH 0,25% o alargamento ainda persiste mas diminui com o aumento na concentração de base usada no pré-tratamento, o que é uma evidência de que a desagregação e a remoção de lignina ocorre. Portanto, o processo de deslignificação elimina estados agregados excitados por 2P e diminui a probabilidade de migração de energia entre eles, o que promove o deslocamento da emissão para comprimentos de onda menores. O espectro da fortemente deslignificada fibra de eucalipto é ainda mais estreito, o que é consistente com as hipóteses apresentadas. A estreita banda de emissão do bagaço natural indica que o arranjo supramolecular da lignina é organizado de maneira que a interação entre as moléculas é baixa.

4.4.4 Excitação por 2 fótons (2P): Dependência da imagem de decaimento da fluorescência (FLIM)

Os pré-tratamentos redistribuem a lignina na biomassa e, conseqüentemente, causam mudanças espectrais e de decaimento que podem ser utilizadas no contraste de cor das imagens espectrais e tempo de decaimento na microscopia confocal das fibras quando excitadas por 2P. Por essa razão, foi combinada a microscopia de fluorescência confocal com a correspondente técnica de microscopia de tempo de vida da fluorescência (FLIM) a fim de se obter informações sobre a distribuição de lignina e a interação entre as moléculas em função do pré-tratamento. A Figura 38 compara as imagens confocais de fluorescência e as correspondentes imagens de FLIM além dos dados associados do (a), (a') bagaço não tratado, (b), (b') bagaço tratado com H_2SO_4 1% e (c), (c') bagaço tratado com NaOH 2%, respectivamente. Essas amostras foram excitadas por 2P em 770 nm. Cada pixel da imagem confocal de fluorescência corresponde a um espectro de emissão, que na excitação por 2P é sensível o suficiente às mudanças na agregação molecular ou na composição química. Essas mudanças espectrais afetam a imagem de cor real resultante da superposição dos espectros de emissão em todos os pixels.

As imagens espectral de fluorescência e de FLIM para o bagaço natural mostradas nas Figuras 38a e 38a', respectivamente, mostram resolvidas bordas externa e interna resolvidas da parede da fibra e uma emissão no azul nitidamente homogênea ao longo de todo o plano focal. Para se obter informação quantitativa da distribuição de lignina, foram obtidos os decaimentos e os espectros de fluorescência em duas regiões distintas: uma próxima à borda externa (magenta) e outra no meio da parede (azul). Os espectros foram normalizados no mesmo comprimento de onda. São observados apenas um leve alargamento espectral e um decréscimo de 10% no tempo médio de decaimento, o que é consistente com estudos sobre a distribuição de lignina (8). Essa configuração muda drasticamente para o bagaço tratado com H_2SO_4 1% (Figuras 38b e 38b'). O alargamento espectral causado pela agregação de lignina transforma a imagem espectral de azul-verde na região central da parede para verde-amarelo próximo a ambas as bordas. O tratamento ácido reduz o tempo de decaimento médio em 11% e 7% próximo à interface externa e no centro, respectivamente. De acordo com a Figura 35, isso corresponde a uma variação em torno de 5% na fração de lignina. No caso do bagaço tratado com NaOH 2%, o tempo médio de decaimento na região mais interna se torna 22%

mais longo em relação ao medido para a amostra tratada com ácido, enquanto que na região mais externa é 24% mais curto, contribuindo para o contraste de cor da imagem de FLIM. Este resultado sugere que uma fração significativa de lignina foi removida da parte mais interna e que outra parte da lignina se acumula na parte mais externa da parede da fibra. A redistribuição de lignina já foi observada com o tratamento alcalino e é confirmada pela imagem espectral (Figura 38c). Nessa imagem, a cor se torna verde-azul na parte interna e amarelada na parte externa. Esse contraste de cor é explicado pelo estreitamento espectral na parte interna devido à remoção de lignina pelo tratamento alcalino e ao alargamento que persiste na parte externa devido à agregação de lignina. Em ambos os casos, o alargamento espectral é menor que o observado para o tratamento ácido, como mostrado na Figura 38b. Esta indicação de que a lignina se agrega na borda externa da parede após o pré-tratamento ácido é condizente com os resultados de Selig et al., que observaram a formação de estruturas esféricas na superfície da biomassa após o pré-tratamento com H_2SO_4 . (79)

Figura 38 - Imagens espectrais e espectros de fluorescência para as regiões indicadas pelas circunferências magenta (externa) e azul (interna) da parede da fibra do bagaço não tratado (a), bagaço tratado com H_2SO_4 1% (b) e bagaço tratado com $NaOH$ 2% (c). Imagens de FLIM e dependências de decaimento calculadas para as regiões indicadas pelas circunferências magenta (externa) e azul (interna) da parede da fibra do bagaço não tratado (a'), bagaço tratado com H_2SO_4 1% (b') e bagaço tratado com $NaOH$ 2% (c'). As amostras foram excitadas por 2P em 770 nm. A resolução é de 512 x 511 pixels.

5 CONCLUSÕES

O experimento de interação da porfirina com as fibras de eucalipto mostrou que há mudanças de carga nas fibras dependendo do pH da solução. Estas mudanças interferem na interação com a safranina e com a CBH I.

Variações na força de atração entre as fibras e a enzima ocorrem devido a mudanças de carga tanto no CBM quanto no domínio catalítico com a variação do pH. Isso é evidenciado pelo fato de a interação do CBM isolado com as fibras ser menos intensa que a da enzima intacta e pela variação da força de interação dos domínios separadamente com o pH de forma condizente com seus respectivos pontos isoelétricos. O entendimento destas interações é importante pois estas influenciam no rendimento da atividade enzimática.

Imagens espectrais de microscopia confocal e os espectros correspondentes indicam que as enzimas ocupam interstícios ao longo de toda a parede da fibra de eucalipto pré-tratada e têm acesso ao interior oco da fibra. Estes resultados mostram que em um material celulósico altamente deslignificado as enzimas têm grande possibilidade de acesso à celulose e, conseqüentemente, podem produzir uma quantidade considerável de açúcar.

A microscopia confocal e FLIM são técnicas de grande valor para se estimar a distribuição de lignina. Os resultados mostram que há uma evidente correlação entre o tempo de decaimento da fluorescência da lignina e seu arranjo e redistribuição na parede celular. Em geral, tempos longos de decaimento estão associados a menores concentrações de lignina. O decaimento da fluorescência da lignina pode ser dividida em duas componentes: uma com tempo curto e outra com tempo longo.

A influência da concentração de NaOH sobre as componentes do decaimento mostra indicaram que há domínios de diferentes níveis de agregação da lignina. Destes domínios, aqueles de menor agregação de lignina são eficientemente deslignificados pelo pré-tratamento alcalino, enquanto os de maior agregação são susceptíveis ao pré-tratamento apenas para altas concentrações de NaOH.

Os resultados de excitação por dois fótons sugerem que no bagaço não tratado a lignina é arranjada em um nanoambiente bem organizado, o que causa fraca interação entre as moléculas. O pré-tratamento ácido desordena a lignina e a distribui para a borda externa da parede celular. O pré-tratamento alcalino remove eficientemente a lignina do centro da parede celular mas é menos efetivo na superfície.

REFERÊNCIAS

- 1 INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Technology Roadmap: biofuels for transport**. Disponível em: <http://www.iea.org/papers/2011/Biofuels_Roadmap.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2011.

- 2 REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-18, 2011. DOI:10.1186/1754-6834-4-54

- 3 PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

- 4 RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. World fuel ethanol production. Disponível em <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

- 5 KIM, S; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from waste crops and crop residues. **Biomass & Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

- 6 CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121-145, 2011. DOI:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205

- 7 WERTZ, J.; BÉDUÉ, O.; MERCIER, J. P. **Cellulose science and technology**. Lausanne: EPFL Press, 2010. 350 p.

- 8 ACHYUTHAN, K. E. et al. Supra molecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641-8688, 2010.

- 9 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

- 10 HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

- 11 BECKHAM, G. T. et al. Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulose. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 3, p. 1447-1453, 2010.
- 12 BECKHAM, G. T. et al. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 231-238, 2011.
- 13 BU, L. et al. The energy landscape for the interaction of the family 1 carbohydrate-binding module and the cellulose surface is altered by hydrolyzed glycosidic bonds. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 31, p. 10994-11002, 2009.
- 14 KIM, T. H. et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 1, p. 39-47, 2003.
- 15 INOUÉ, S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: PAWLEY, J. P. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer, 2006. p. 1-19.
- 16 COX, G. Biological confocal microscopy. **Materials Today**, v. 5, n. 3, p. 34-41, 2002.
- 17 GERRITSEN, H. C. et al. Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopy. In: PAWLEY, J. P. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer, 2006. p. 516-534.
- 18 BRUNECKY, R. et al. *In planta* expression of *A. cellulolyticus* Cel5A endocellulase reduces cell wall recalcitrance in tobacco and maize. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011.
- 19 SINGH, A. P. et al. Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. **Wood Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 16-25, 2006.
- 20 SPERANZA, M. et al. Sterols and lignin in *Eucalyptus globulus* Labill. wood: spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses. **Holzforschung**, v. 63, n. 3, p. 362-370, 2009.
- 21 CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 3, p. 973-984, 2011.

- 22 HAFRÉN, J.; OOSTERVELD-HUT, H. M. J. Fluorescence lifetime imaging microscopy study of wood fibers. **Journal of Wood Science**, v. 55, n. 3, p. 236-239, 2009.
- 23 ZUGENMAIER, P. **Crystalline cellulose and cellulose derivatives**: characterization and Structures. Berlin: Springer-Verlag, 2008. 285 p.
- 24 MILJKOVIC, M. **Carbohydrates**: synthesis, mechanisms and stereoelectronic effects. New York: Springer, 2010. 450 p.
- 25 RONCERO, M. B. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 1, p. 21-30, 2005.
- 26 ZHANG, X.; YANG, W.; BLASIAK, W. Modeling study of wood biomass: interactions of cellulose, hemicellulose and lignin. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 10, p. 4786-4795, 2011.
- 27 KATSURAYA, K. et al. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 183-189, 2003.
- 28 DODD, D; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009.
- 29 HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin structure, properties, and applications. In: ABE, A.; DUSEK, K; KOBAYASHI, S. **Biopolymers**: lignin, proteins, bioactive nanocomposites. Berlin: Springer-Verlag, 2010. v. 232, p. 1-63.
- 30 BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003. DOI: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- 31 CASTELLAN, A.; DAVIDSON, R. S. Steady-state and dynamic fluorescence emission from Abies wood. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v. 78, n. 3, p. 275-279, 1994.
- 32 CASTELLAN, A. et al. Comparative study of stone-ground wood pulp and native wood 2. comparison of the fluorescence of stone-ground wood pulp and native wood. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v. 81, n. 2, p. 117-122, 1994.

33 ALBINSSON, B. The origin of lignin fluorescence. **Journal of Molecular Structure**, v. 508, n. 1-3, p. 19-27, 1999.

34 WESTBYE, P. et al. The influence of lignin on the self-assembly behaviour of xylan rich fractions from birch (*Betula pendula*). **Cellulose**, v. 14, n. 6, p. 603-613, 2007.

35 CONNORS, W. J.; SARKANEN, S.; MCCARTHY, J. L. Gel chromatography and association complexes of lignin. **Holzforschung**, v. 34, n. 3, p. 80-85, 1980.

36 SARKANEN, S. et al. Lignin. 20. associative interactions between kraft lignin components. **Macromolecules**, v. 17, n. 14, p. 2588-2597, 1984.

37 WOERNER, D. L.; MCCARTHY, J. L. Lignin. 24. ultrafiltration and light-scattering evidence for association of kraft lignins in aqueous solutions. **Macromolecules**, v. 21, n. 7, p. 2160-2166, 1988.

38 MICIC, M. et al. Visualization of artificial lignin supramolecular structures. **Scanning**, v. 22, n. 5, p. 288-294, 2000.

39 KOSHIJIMA, T.; WATANABE, T. **Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues**. Berlin: Springer, 2003. 329 p.

40 TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

41 MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.

42 PEDERSEN, M.; VISKO-NIELSEN, A.; MEYER, A. S. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1181-1186, 2010.

43 LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 21, p. 5409-5416, 2003.

- 44 LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass & Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 367-380, 2002.

- 45 FOGEL, R. et al. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 122, n. 1-3, p. 741-752, 2005.

- 46 GEDDES, C. C. et al. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Biomass & Bioenergy**, v. 101, n. 6, p. 1851-1857, 2010.

- 47 ROCHA, G. J. M. et al. Diluted mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011.

- 48 STAMATELATOU, K. et al. The effect of physical, chemical and biological pretreatments of biomass on its anaerobic digestibility and biogas production. In: MUDHOO, A. **Biogas production: pretreatment methods in anaerobic digestion**. Massachusetts: Scrivener Publishing LLC, 2012. p. 55-90.

- 49 JACKSON, M. G. Review article: the alkali treatment of straws. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 105-130, 1977.

- 50 DIVNE, C. et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 524-528, 1994.

- 51 DIVNE, C. et al. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 309-325, 1998.

- 52 IMAI, T. et al. Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on *Valonia* cellulose microcrystals. **FEBS Letters**, v. 432, n. 3, p. 113-116, 1998.

- 53 ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscopias ópticas de alta resolução**. 2011. 115 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

54 TSUTAE, F. M. **Processos ópticos e interação entre nanopartículas e sistemas moleculares**. 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

55 MENEZES, P. F. C. D. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do PHOTOGEM[®] fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. 155 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

56 BOND, J. et al. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 83, n. 3-4, p. 161-171, 2008.

57 MALEKBAKA, M. R. et al. Equilibrium and kinetic studies of safranin adsorption on alkali-treated mango seed integuments. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 3, n. 3, p. 160-166, 2012.

58 SHARIATI, S. et al. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with sodium dodecyl sulfate for removal of safranin O dye from aqueous solutions. **Desalination**, v. 270, n. 1-3, p. 160-165, 2011.

59 COLUSSI, F. et al. Purification, and biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 808-817, 2011.

60 COLUSSI, F. et al. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of the extracellular cellulase CBHI from *Trichoderma harzianum*. **Acta Crystallographica Section F: structural biology and crystallization communications**, v. 66, n. 9, p. 1041-1044, 2010.

61 PINGALI, S. V. et al. Small angle neutron reveals pH-dependent conformational changes in *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I: implications for enzymatic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 37, p. 32801-32809, 2011.

62 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006. 954 p.

63 JOHNSON, I. D.; DAVIDSON, M. W. Jablonski energy diagram. Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>>. Acesso em: 11 jul. 2012.

64 CONCEIÇÃO, F. R. **Investigação da interação enzimática e das suas mudanças estruturais durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica através de metodologias óticas**. 90p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

65 SPRING, K. R.; FELLERS, T. J.; DAVIDSON, M. W. Resolution and contrast in confocal microscopy. Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/resolutionintro.html>>. Acesso em: 8 ago. 2012.

66 MCNAMARA, G. et al. Spectral imaging and linear unmixing. Disponível em: <<http://www.microscopyu.com/articles/confocal/spectralimaging.html>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

67 BELFIELD, K. D. et al. Multiphoton-absorbing organic materials for microfabrication, emerging optical applications and non-destructive three-dimensional imaging. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 837-849, 2000.

68 PISTON, D. W.; FELLERS, T. J.; DAVIDSON, M. W. Fundamentals and applications in multiphoton excitation microscopy. Disponível em: <<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>>. Acesso em: 18 jul. 2012.

69 ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; WEBB, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1369-1377, 2003.

70 DUNN, K. W.; YOUNG, P. A. Principles of multiphoton microscopy. **Journal of Nephrology**, v. 103, n. 2, p. 33-40, 2006.

71 CALLIS, P. R. The theory of two-photon-induced fluorescence anisotropy. In: LAKOWICZ, J. R. **Topics in fluorescence spectroscopy: non-linear and two-photon-induced fluorescence**. New York: Springer, 1997. p. 1-42.

72 SUHLING, K.; FRENCH, P. M. W.; PHILLIPS, D. Time-resolved fluorescence microscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 13-22, 2005.

73 ABOUT. COM CHEMISTRY. Fluorescein chemical structure. Disponível em: <<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Fluorescein.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

74 PALONEN, H.; TENKANEN, M.; LINDER, M. Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5229-5233, 1999.

75 COLUSSI, F. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural de uma celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum***. 2012. 191 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

76 RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; VILLANUEVA-VENTURA, G.; RIOS-LEAL, E. Sugarcane bagasse pith dry pretreatment for single cell protein production. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 1, p. 17-22, 1992.

77 RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R; DÍAZ-CERVANTES, D. Effect of chemical solutions sprayed on sugarcane bagasse pith to produce single cell protein: physical and chemical analysis of pith. **Bioresource Technology**, v. 47, n. 2, p. 159-164, 1994.

78 GALAUP, J. Spectral selective studies of molecular doped solids and applications. In: LIN, S. H., VILLAEYS, A. A., FUJIMURA, Y. **Advances in multi-photon processes and spectroscopy**: Cingapura: World Scientific, 2004. v. 16, p.73-248.

79 SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333-1339, 2007.