UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GERMANO ANDRADE SIQUEIRA

Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da
celulose

Lorena
2015

GERMANO ANDRADE SIQUEIRA

Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da
celulose

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Industrial na Área de Conversão de Biomassa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Maria Ferreira Milagres

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Siqueira, Germano Andrade

Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré tratados na hidrólise enzimática da celulose / Germano Andrade Siqueira; orientadorA Adriane Maria Ferreira Milagres - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015. 139 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
OrientadorA: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Hidrólise enzimática. 3. Lignina. 4. Adsorção improdutiva. 5. Acessibilidade da celulose. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira, orient.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Carlos e Maria

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas grandes oportunidades e também pelas dificuldades em meu caminho. Olhando para trás, vejo a importância de cada uma das pedras colocadas nele, e agradeço a força e o amparo constantes.

À eterna companheira Stéfani, por todo amor, carinho e dedicação inesgotáveis. Agradeço também pela paciência, principalmente nos momentos finais dessa etapa da minha vida.

À pequena Alice, que tão rapidamente preencheu um espaço enorme em meu coração. Obrigado pelos olhares e sorrisos sinceros, que nos momentos mais turbulentos, proporcionaram-me conforto e serenidade.

Aos pais, Carlos e Maria, pelo apoio, desde os primeiros passos, até as mais recentes conquistas. Vocês são, sem dúvidas, a principal razão para eu ter chegado até aqui.

Aos irmãos, Guilherme e Giovani, pelos abraços, pelas brigas e pelos inúmeros perdões. Obrigado por serem o suporte que eu sei que sempre terei.

Aos avôs Jairo (*in memorian*) e Ary (*in memorian*), e às avós Conceição e Glória, pelo enorme carinho.

À Prof^a. Adriane Milagres, orientadora, pelos ensinamentos, pela confiança e pela dedicação desde o período do Mestrado. Obrigado por permitir que eu desse, com liberdade, meus primeiros passos na Ciência, e por me ajudar a levantar após cada um dos meus tropeços. Um sincero muito obrigado!

Ao Prof. André Ferraz, pelo suporte e disponibilidade constantes. Obrigado pelos desafios e questionamentos, que muito tem me estimulado a ser um melhor pesquisador.

Ao Prof. Valdeir Arantes, pelo exemplo, e por ter me ajudado em momentos importantes do meu Doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (Joseana, Michel, Sérgio, Felipe, Maiara, Guilherme, Luciane, Fernanda, Daniele e Djalma) e do Laboratório de Química da Madeira (Thales, Omar, Gina, Fernanda, Gabriela e Ângela), pelo companheirismo, pelas boas conversas e risadas. Um agradecimento especial ao Victor, Paula, Pepel e Cecéu, pela amizade sincera! Vou sentir falta de vocês!

To Jack Saddler, for making one of my dreams come true!

To Gladys Tecson and all the friends from UBC, who made my stay in Vancouver unforgettable! A special thank you to Emily, Tony, Antti and Keith for all the awesome moments we spent together.

Ao Zé Moreira, pelo carinho e dedicação aos estudantes, auxiliando na condução dos experimentos e na realização das importantes “gambiaras”, sem as quais muitos resultados não teriam sido obtidos. Ao Zé Cobrinha pelo auxílio no laboratório, pela convivência e pela sinceridade (apesar das fofocas), que o fazem ser querido por todos.

À Sandra, Cida e Bia, pelo auxílio nos momentos de tensão! À Regina Horta, pela prontidão para revisar a formatação da tese.

À equipe Nadir Encadernações, pela eficiência, dedicação e responsabilidade.

Aos amigos Lucas, Tcha-Tcha, Fernanda, Monique e Gabriel, que mesmo distantes, mantêm a mesma amizade de outros tempos.

À FAPESP por financiar esse projeto (2012/09940-3).

“Vive de tal forma que deixes pegadas luminosas no caminho percorrido, como estrelas apontando o rumo da felicidade e não deixes ninguém afastar-se de ti sem que leve um traço de bondade, ou um sinal de paz da tua vida.”

Joanna de Ângelis

RESUMO

SIQUEIRA, G.A. **Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose**. 2015. 139p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2015.

No presente trabalho, avaliou-se o efeito limitante da lignina residual de bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos na hidrólise da celulose. O bagaço foi submetido a cinco pré-tratamentos: NaOH (5%), Na₂SO₃/NaOH (10%/5%), H₂SO₄ (0,75%), NaHSO₃/H₂SO₄ (5%/0,75%) e explosão a vapor catalisada por SO₂ (3%). Os pré-tratamentos resultaram em bagaços com diferentes composições químicas, sendo que os tratamentos alcalinos favoreceram a solubilização de lignina e os tratamentos ácidos favoreceram a solubilização de hemicelulose. Os bagaços tratados com Na₂SO₃/NaOH e por explosão a vapor resultaram em rendimentos de hidrólise de celulose superiores a 80% ao utilizar altas cargas de enzima (Celluclast), indicando a maior acessibilidade da celulose desses materiais. Isso foi confirmado pela técnica de coloração de Simons, que mostrou que a área superficial acessível da celulose desses dois bagaços foi maior que a dos demais. Boas correlações ($R^2 > 0,8$) entre o rendimento de hidrólise da celulose em 72 h e a celulose superficial acessível só foram obtidos com altas cargas de enzima, evidenciando que fatores além da acessibilidade limitaram a hidrólise da celulose com quantidade menor de enzimas. As ligninas dos bagaços pré-tratados foram isoladas e a capacidade adsorptiva de proteínas foi determinada. A lignina de bagaço tratado por explosão a vapor apresentou maior capacidade adsorptiva, seguida da lignina de bagaço tratado com NaOH. Os pré-tratamentos com íons sulfito (Na₂SO₃/NaOH e NaHSO₃/H₂SO₄) resultaram em ligninas com capacidades adsorptivas inferiores quando comparado aos seus análogos sem sulfito (NaOH e H₂SO₄), possivelmente pela sulfonação da lignina residual, confirmada pela presença de grupos ácidos fortes nesses bagaços. A adição de BSA prévia à adição de celulases confirmou o forte efeito da adsorção improdutiva causada pela lignina nos bagaços tratados com NaOH e por explosão a vapor, materiais cujas ligninas apresentaram maiores capacidades adsorptivas. A adsorção improdutiva foi menor ao utilizar o extrato enzimático Cellic CTec3, evidenciando que as enzimas desse coquetel são menos sensíveis à presença da lignina. Do extrato Celluclast, a enzima que mais adsorveu nas ligninas de bagaço tratado com NaOH e por explosão a vapor foi a β -glicosidase, seguida da endoglucanase. As enzimas purificadas CBHI e EGII de *T. longibrachiatum* adsorveram menos à lignina de bagaço tratado por explosão a vapor que as mesmas enzimas de *T. reesei*. A β -glicosidase de *A. niger* não adsorveu a essa lignina. Independentemente do pré-tratamento, a presença de fenóis solubilizados a partir da lignina, em baixas concentrações, resultou em aumento no rendimento de conversão de celulose ao utilizar baixas cargas de enzima, possivelmente pelo efeito positivo causado por esses na atividade de enzimas oxidativas, ou pela presença de lignossulfonatos. Em concentrações mais elevadas, independente da carga enzimática, os fenóis liberados foram inibitórios em todos os pré-tratamentos. A atividade de CBHI foi mais sensível à presença dos compostos fenólicos que a atividade de β -glicosidase. A partir dos resultados, conclui-se o aumento da acessibilidade, seja pela remoção ou pela realocação da lignina, é o fator que mais influencia a hidrólise eficiente da celulose do bagaço. A adsorção improdutiva foi dependente do pré-tratamento, e resultou em diminuição significativa dos rendimentos de hidrólise da celulose com baixas cargas de enzima.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Hidrólise enzimática; Lignina; Adsorção improdutiva; Acessibilidade da celulose.

ABSTRACT

SIQUEIRA, G.A. **Effect of the lignin from pretreated sugarcane bagasses in the enzymatic hydrolysis of the cellulose**. 2015. 139p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2015.

The present work evaluated the limiting effect of the residual lignin of sugarcane bagasse submitted to different pretreatments: NaOH (5%), Na₂SO₃/NaOH (10%/5%), H₂SO₄ (0.75%), NaHSO₃/H₂SO₄ (5%/0.75%) and SO₂-catalyzed steam explosion (3%). The pretreatment resulted in bagasses with different chemical compositions, wherein the alkaline treatments resulted in a more efficient solubilization of lignin, and the acidic treatments solubilized the hemicellulose. The bagasses treated with Na₂SO₃/NaOH and by steam explosion resulted in cellulose hydrolysis yields above 80% using higher enzyme loadings (Celluclast), indicating the increased accessibility of the cellulose in these materials. This was confirmed by Simons' Stain, which showed that the accessible surface area of the cellulose in these bagasses was higher than in the others. Good correlations ($R^2 > 0.80$) between the 72 h hydrolysis yields and the accessible surface area of cellulose were only observed at higher enzyme loadings, indicating that other factors than accessibility, limit the hydrolysis at lower enzyme loadings. The lignins were isolated from the pretreated bagasses and the protein binding capacity was determined. The lignin from steam exploded bagasse showed the highest binding capacity, followed by the lignin extracted from NaOH-treated bagasse. The sulfite pretreatments (Na₂SO₃/NaOH e NaHSO₃/H₂SO₄) resulted in lignins with lower binding capacities, when compared to their analogues without sulfite (NaOH e H₂SO₄), possibly because of the sulfonation of the residual lignin, confirmed by the presence of strong acid groups in these bagasses. BSA addition prior to the cellulases confirmed the strong effect of unproductive binding caused by the lignin in the NaOH-treated and steam exploded bagasses, materials with the highest binding capacity lignins. Less unproductive binding was observed using the enzyme extract Cellic CTec3, showing that the enzymes in this cocktail are less sensitive to the presence of lignin. From the extract Celluclast, the enzyme that most adsorbed to the lignins isolated from NaOH-treated and steam exploded bagasses was β -glucosidase, followed by the endoglucases. The purified CBHI and EGII from *T. longibrachiatum* were less adsorbed to steam exploded bagasse lignin than the same enzymes from *T. reesei*. β -glucosidase from *A. niger* did not bind to this lignin. Despite of the pretreatment, the presence of phenols solubilized from lignin, at lower concentrations, increased the cellulose hydrolysis yields with lower enzyme loading, possibly because of the positive effect of these compounds in the activity of oxidative enzymes, or because of the presence of lignosulfonates. At higher concentrations, despite of the enzyme loading, the phenols were inhibitory in all the pretreatments. The CBHI activity was more sensitive to the presence of phenolic compounds than the β -glucosidase activity. From these results, it is possible to conclude that the increase in the accessibility, due to the lignin removal or relocation, influences the most the efficient hydrolysis of bagasse cellulose. The unproductive binding was pretreatment dependent and resulted in a significant decrease in the hydrolysis yields of the cellulose at lower enzyme loadings.

Keywords: Sugarcane bagasse; Enzymatic hydrolysis; Lignin; Unproductive binding; Cellulose accessibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: (a) Colmo de cana-de-açúcar, evidenciando o nó e o entrenó. (b) Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar evidenciando diferenças entre células de parênquima, fibras e vasos das regiões de córtex e medula. Os tecidos estão indicados: M – medula; I – interface entre medula e córtex; C – córtex; E – epiderme e casca.27
- Figura 2: Representação da anidrocelobiose, unidade estrutural da molécula de celulose (a) e de uma microfibrila de celulose (b), mostrando regiões cristalinas, em cinza escuro, e regiões amorfas, em cinza claro.....29
- Figura 3: Estrutura representativa da glucoronoarabinoxilana de cana-de-açúcar.30
- Figura 4: Unidades de fenilpropeno precursoras da lignina. Da esquerda para a direita, álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico.31
- Figura 5: Estrutura hipotética da lignina, mostrando as principais ligações presentes nessa molécula.....31
- Figura 6: Desestruturação esquemática dos componentes da parede celular vegetal pela ação dos pré-tratamentos.33
- Figura 7: Reação de sulfonação da lignina em meio alcalino. Na primeira etapa, ocorre a desprotonação da hidroxila fenólica e a formação da metileno quinona. Na segunda etapa, ocorre o ataque nucleofílico do íon sulfito ao carbono α , sulfonando a lignina.35
- Figura 8: Estrutura representativa de um lignossulfonato. A presença do grupo sulfônico em sua estrutura aumenta a hidrofiliabilidade da molécula.35
- Figura 9: Modelo esquemático mostrando a coalescência da lignina em meio aquoso, em temperaturas superiores à sua transição vítrea, seguido da extrusão da mesma, devido à descompressão súbita no tratamento por explosão a vapor.37
- Figura 10: Estrutura tridimensional mostrando o túnel da CBHII de *T. reesei* (a), e a fenda da endoglucanase II de *T. fusca* (b). As setas vermelhas indicam os sítios ativos das enzimas.39
- Figura 11: Esquema representativo da despolimerização da celulose pela ação combinada de enzimas hidrolíticas e da AA9. A lignina e os fenóis solúveis atuam como doadores de elétrons para a enzima oxidativa AA9. Abreviações: CBH – celobiohidrolase; CBM – módulo de ligação a carboidratos; EG – engoglucanase; AA9 – *auxiliary activity 9*.40
- Figura 12: Comparação do efeito da remoção da lignina de bagaço de cana (a) e da xilana de forragem de milho (b) na hidrólise enzimática da celulose.41

Figura 13: Rendimento de hidrólise de celulose (72 h) dos bagaços pré-tratados, utilizando Celluclast como fonte de celulases e suplementado com β -glicosidase (Novozym 188). As cargas de proteínas/g de celulose, correspondente apenas à Celluclast foram: (■) 2,5 mg/g; (■) 5 mg/g; (■) 10 mg/g; (■) 20 mg/g; e (■) 30 mg/g. Os desvios foram calculados a partir dos dados gerados pelas triplicatas de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.72

Figura 14: Rendimentos de hidrólise de celulose dos substratos em função da celulose superficial acessível (DO/DB), variando a carga enzimática (quantidade de proteína adicionada) com base no extrato Celluclast: (a) 2,5 mg/g; (b) 5 mg/g; (c) 10 mg/g; (d) 20 mg/g; (e) 30 mg/g. Em todos os ensaios houve suplementação com Novozym 188.76

Figura 15: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, utilizando Celluclast e Novozym 188 (■) e Cellic CTec3 (■), ambas com 2,5 mg de proteína / g de celulose. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.78

Figura 16: Conversão enzimática de celulose de holocelulose (polpa) de eucalipto com adição de amostras de lignina, utilizando 2 FPU ($\approx$ 1 mg de proteína) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (a); e 10 FPU ($\approx$ 5 mg de proteína) e 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (b). (◆) Controle; (x) SEBL-HCl; (▲) KEL-HCl; (■) Indulin.81

Figura 17: Espectro de absorção da fração líquida das amostras de lignina incubadas por 24 horas em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. (—) Extrato aquoso de SEBL-HCl, diluído 2 vezes; (—) extrato aquoso de Indulin diluído 20 vezes; extrato aquoso de KEL-HCl diluído 20 vezes (—).83

Figura 18: Conversão enzimática de celulose de holocelulose (polpa) de eucalipto utilizando extratos das amostras de lignina como tampão de hidrólise, testando duas cargas enzimáticas: 2 FPU ($\approx$ 1 mg) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (a); e 10 FPU ($\approx$ 5mg) e 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (b). (◆) Controle; (■) SEBL-HCl; (x) KEL-HCl; (▲) Indulin.84

Figura 19: Curva de titulação condutimétrica do bagaço tratado por sulfito alcalino.86

Figura 20: Teor de grupos ácidos fracos (■) e fortes (■) nos bagaços pré-tratados, com relação à massa de substrato (a) e à massa de lignina (b). Apenas os ácidos fortes foram relacionados com a quantidade de lignina.87

Figura 21: Curvas de adsorção de proteínas (Celluclast) nas amostras de lignina isoladas, mantendo constante a concentração de lignina (20 mg/mL) e variando a concentração de proteína inicial de 0,05 a 0,4 mg/mL. Cada curva representa a capacidade adsorptiva de uma amostra de lignina extraída dos bagaços de cana pré-tratados com (▲) NaOH; (●) Na₂SO₃/NaOH; (◆) H₂SO₄; (■) NaHSO₃/H₂SO₄; (■) explosão a vapor.88

Figura 22: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços de cana pré-tratados utilizando Celluclast e Novozym 188, na ausência de BSA (□), e com BSA (■); nos tempos de 3 h (a) e 72 h (b) de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%. 91

Figura 23: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, utilizando Cellic CTec3, sem pré-incubação com BSA (□), e pré-incubando com BSA (■), nos tempos de 3 h (a) e 72 h (b) de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%. 93

Figura 24: Variação na atividade enzimática e no teor de proteínas em solução após incubar o extrato Celluclast com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (a) e por explosão a vapor (b). Os valores do controle, que não foram incubados com as amostras de lignina, foram considerados 100%, e os testes submetidos a incubação foram calculados com relação ao controle. 95

Figura 25: Gel de eletroforese em condições desnaturantes do extrato Celluclast sem incubação (canaletas 2 e 4) e após incubação com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (canaleta 3) e por explosão a vapor (canaleta 5). As bandas I, II e III foram atribuídas principalmente às enzimas β -glicosidase, CBHI e EGII, respectivamente. Na canaleta 1, foi aplicado o marcador de massa molar. 97

Figura 26: Variação na atividade enzimática em solução após incubar as enzimas purificadas CBHI e EGII, de *T. longibrachiatum* com as amostras de lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor. As enzimas foram incubadas isoladamente (a) e em mistura (b), mantendo em ambos os casos a mesma concentração de proteínas total. No caso da incubação em mistura (b), a concentração de cada enzima correspondeu a 1/3 da concentração de proteínas total. Os valores do controle, que não foram incubados com as amostras de lignina, foram considerados 100%, e os testes submetidos à incubação foram calculados com relação ao controle. 101

Figura 27: Gel de eletroforese em condições desnaturantes das proteínas purificadas e em mistura, antes e após incubação com a amostra de lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor. As canaletas 2, 4 e 6 representam, respectivamente, as enzimas CBHI (b), EGII (c) e β -glicosidase (a) sem incubação, e as canaletas 3, 5 e 7, as mesmas enzimas, após incubação com a amostra de lignina. A canaleta 8 representa a mistura das 3 proteínas sem incubação, e a canaleta 9, a mesma mistura, após incubação com a amostra de lignina. As (canaletas 2 e 4) e após incubação com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (canaleta 3) e por explosão a vapor (canaleta 5). As bandas I, II e III foram atribuídas principalmente às enzimas β -glicosidase, CBHI e EGII, respectivamente. Na canaleta 1, foi aplicado o marcador de massa molar. 102

Figura 28: Concentração de fenóis dissolvidos no tampão de hidrólise enzimática após incubação dos bagaços pré-tratados lavados (a) e não lavados (b), por 1 h (□) e por 24 h (■). A incubação foi feita com teor de sólidos de 2%. 107

Figura 29: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, lavados, utilizando Celluclast e Novozym 188. (a – c) Hidrólise sem incubação dos bagaços em tampão antes de adicionar as enzimas. (d – f) Hidrólise incubando os bagaços em tampão

por 24 h antes da adição das enzimas. (a,d) 5 mg/g; (b,e) 10 mg/g; (c,f) 20 mg/g.(▲)NaOH; (■) Na₂SO₃/NaOH; (▲) H₂SO₄; (X) NaHSO₃/H₂SO₄;(*) Explosão a vapor / SO₂. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.108

Figura 30: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, não lavados, utilizando Celluclast e Novozym 188. (a – c) Hidrólise sem incubação dos bagaços em tampão antes de adicionar as enzimas. (d – f) Hidrólise incubando os bagaços em tampão por 24 h antes da adição das enzimas. (a,d) 5 mg/g; (b,e) 10 mg/g; (c,f) 20 mg/g.(▲)NaOH; (■) Na₂SO₃/NaOH; (▲) H₂SO₄; (X) NaHSO₃/H₂SO₄;(*) Explosão a vapor / SO₂. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.110

Figura 31: Concentração de fenóis dissolvidos no tampão de hidrólise enzimática após incubação dos bagaços pré-tratados não lavados, com teor de sólidos de 2% (□) e 10% (■).112

Figura 32: Atividade enzimática relativa das enzimas β-glicosidase (a,b) e CBHI (c,d) na presença dos tampões gerados a partir da incubação dos bagaços pré-tratados a 2% de sólidos (□) e 10% (■) de sólidos. A atividade relativa representa a percentagem da atividade do controle, medida em tampão acetato de sódio, pH 4,8, 50 mM. Os desvios foram menores que as linhas de contorno das barras.....113

Figura 33: Rendimento de hidrólise de celulose de polpa de dissolução utilizando os tampões gerados a partir da incubação dos bagaços pré-tratados a 2% (a,b) e 10% (c,d) de sólidos. As hidrólises foram conduzidas com Celluclast e Novozym 188, com as cargas enzimáticas de 2,5 mg/g (a,c) e 10 mg/g (b,d). A hidrólise enzimática do controle, realizada em tampão acetato, pH 4,8, 50 mM, no tempo de 72 h foi considerada o máximo de conversão e o percentual das demais foi calculado a partir desse valor.(◆)NaOH; (■) Na₂SO₃/NaOH; (▲) H₂SO₄; (X) NaHSO₃/H₂SO₄; (*) Explosão a vapor / SO₂; (●) Controle. As hidrólises foram realizadas utilizando 2% de sólidos.....115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Soluções utilizadas no preparo do gel de eletroforese em condições desnaturantes.....	67
Tabela 2: Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar submetidos aos diferentes pré-tratamentos.	70
Tabela 3: Corantes Direct Orange (DO) e Direct Blue (DB) adsorvidos nos substratos após 6 horas de incubação à 70 °C, e a razão entre eles (celulose superficial acessível).....	74
Tabela 4: Rendimento de extração da lignina dos bagaços de cana pré-tratados.....	85
Tabela 5: Parâmetros das isotermas de adsorção das proteínas do extrato Celluclast nas ligninas isoladas dos bagaços de cana pré-tratados.	89
Tabela 6: Intensidades relativas das bandas I, II e III do gel de eletroforese mostrado na figura 25. A intensidade das bandas após incubação foi calculada com relação à intensidade das mesmas sem incubação.	98
Tabela 7: Intensidades relativas das bandas de β -glicosidase, CBHI e EGII do gel de eletroforese mostrado na figura 27, incubadas com a amostra de lignina de bagaço tratado por explosão a vapor, isoladamente e em mistura. A intensidade das bandas após incubação foi calculada com relação à intensidade das mesmas sem incubação.....	103

ABREVIATURAS

AA9: *auxiliary activity 9* (atividade auxiliar 9)

BSA: albumina sérica bovina

Cazy: enzimas ativas em carboidratos

CBH: celobiohidrolase

CBM: domínio de ligação a carboidrato

CMC: carboximetil celulose

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DNS: ácido dinitrossalicílico

EG: endoglucanase

FPA: atividade de papel de filtro

FPU: unidade de papel de filtro

ITC: calorimetria de titulação isotérmica

KEL-HCl: lignina de eucalipto do licor kraft precipitada com hcl

Pnp: *p*-nitrofenol

Pnpc: *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo

Pnpg: *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo

RHC: rendimento de hidrólise da celulose

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SEBL-hcl: lignina de bagaço de cana tratado por explosão a vapor precipitada com hcl

SPORL: pré-tratamento com sulfito para contornar a recalcitrância do lignocelulósico

UI: unidade internacional

UNICA: União da Indústria de Cana-de-açúcar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. Cana-de-açúcar e a geração de bagaço	25
2.2. Parede celular vegetal	26
2.2.1. Celulose	28
2.2.2. Hemicelulose	29
2.2.3. Lignina.....	30
2.3. Desconstrução da parede celular	32
2.3.1.1. Pré-tratamentos em meio alcalino.....	34
2.3.1.2. Pré-tratamentos em meio ácido.....	36
2.4. A lignina como limitante da hidrólise da celulose.....	40
2.4.1. Limitação da acessibilidade das enzimas hidrolíticas às cadeias de celulose.....	42
2.4.2. Adsorção improdutiva.....	43
2.4.3. Inibição das enzimas celulolíticas por compostos fenólicos	45
3. OBJETIVO	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. Materiais	48
4.2. Pré-tratamentos	48
4.2.1. Pré-tratamento alcalino (NaOH).....	48
4.2.2. Pré-tratamento sulfito alcalino (Na ₂ SO ₃ /NaOH)	49
4.2.3. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (H ₂ SO ₄)	49
4.2.4. Pré-tratamento sulfito ácido (NaHSO ₃ /H ₂ SO ₄)	50
4.2.5. Pré-tratamento por explosão à vapor catalisada com SO ₂	50
4.3. Digestibilidade dos bagaços pré-tratados	51
4.4. Determinação da celulose superficial acessível dos bagaços de cana pré-tratados	52
4.5. Efeito de ligninas isoladas de diferentes fontes na hidrólise de holocelulose	53
4.5.1. Hidrólise enzimática de holocelulose na presença das amostras de lignina	53
4.5.2. Hidrólise enzimática de holocelulose em meio contendo compostos aromáticos	54
4.6. Isolamento das ligninas dos bagaços de cana pré-tratados	55

4.7.	Medida da capacidade adsortiva das ligninas dos bagaços pré-tratados	56
4.8.	Medida dos grupos ácidos dos bagaços pré-tratados.....	56
4.9.	Medida do efeito da adsorção improdutiva nos bagaços pré-tratados.....	57
4.10.	Adsorção das proteínas do extrato Celluclast em amostras de lignina.....	58
4.11.	Adsorção das enzimas purificadas na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor	58
4.12.	Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose	59
4.12.1.	Efeito da pré-incubação dos bagaços tratados na solubilização de fenóis	59
4.12.2.	Efeito dos compostos solúveis nas atividades de CBHI e β -glicosidase.....	60
4.12.3.	Efeito dos compostos solúveis na hidrólise de celulose	60
4.13.	Métodos analíticos	61
4.13.1.	Análise composicional dos bagaços de cana	61
4.13.5.	Determinação das atividades enzimáticas	63
4.13.5.1.	Celulases totais (FPA)	63
4.13.5.2.	Celobiohidrolase.....	64
4.13.5.3.	Celobiohidrolase I (CBHI)	64
4.13.5.4.	Endoglucanase	65
4.13.5.5.	β -glicosidase	65
4.13.6.	SDS-PAGE	66
4.13.6.1.	Preparo do gel e corrida.....	66
4.13.6.2.	Revelação e análise do gel.....	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1.	Pré-tratamento e caracterização dos bagaços de cana	68
5.2.	Digestibilidade dos bagaços pré-tratados	71
5.3.	Determinação da celulose superficial acessível dos bagaços de cana	73
5.4.	Hidrólise enzimática dos bagaços de cana com Cellic CTec3	77
5.5.	Efeito de ligninas isoladas na hidrólise enzimática da celulose	79
5.5.1.	Redução nos níveis de hidrólise por ligninas de diferentes fontes	79
5.5.2.	Isolamento de ligninas dos bagaços de cana pré-tratados	85
5.5.3.	Grupos ácidos dos bagaços pré-tratados.....	86
5.5.4.	Medida da capacidade adsortiva das ligninas dos bagaços de cana pré-tratados ..	88
5.6.	Ensaio de adsorção enzimática	90
5.6.1.	Adsorção improdutiva	90

5.6.2.	Adsorção de proteínas e de enzimas presentes no extrato Celluclast nas ligninas extraídas dos bagaços pré-tratados.....	94
5.6.3.	Adsorção de CBHI, EGII e β -glicosidase purificadas na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor/SO ₂	100
5.7.	Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose	105
5.7.1.	Efeito da pré-incubação dos bagaços tratados na solubilização de fenóis.....	105
5.7.2.	Efeito dos compostos solúveis nas atividades de CBHI e de β -glicosidase	111
5.7.3.	Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose	114
6.	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	120
	APÊNDICE A – COEFICIENTES DE EXTINÇÃO MOLAR DOS CORANTES DIRECT ORANGE E DIRECT BLUE.....	134
	APÊNDICE B – CURVAS DE ADSORÇÃO DOS CORANTES NOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS	135

1. INTRODUÇÃO

A busca por materiais que possam ser alternativas ao uso do petróleo, tanto como potencial fonte energética, quanto como matéria prima para a síntese de outros compostos químicos, é uma realidade global. As alterações climáticas e a diminuição de recursos naturais mostraram que os atuais processos industriais são incompatíveis com o desenvolvimento sustentável, e novos sistemas de produção se fazem urgentemente necessários. Nesse contexto, surgem as biorrefinarias, nas quais biomassas vegetais são aproveitadas integralmente, produzindo energia e uma série de produtos com alto valor agregado, com a grande vantagem da não dependência de fontes fósseis.

No Brasil, os resíduos agroindustriais são as principais matérias-primas para as biorrefinarias, e o bagaço de cana-de-açúcar, coproduto da indústria sucroalcooleira, merece destaque. Estima-se que na safra de 2014/2015, 80,5 milhões de toneladas desse material sejam produzidas (CONAB, 2014). Atualmente utilizado para cogeração de energia elétrica nas próprias usinas, o fracionamento desse material possibilitaria o desenvolvimento de outros setores da economia, como resultado das diversas possibilidades de aplicações de cada uma de suas frações.

Dentre alguns processos que visam ao aproveitamento do bagaço de cana, destaca-se a hidrólise enzimática da celulose, polissacarídeo que pode representar até 50% da massa desses materiais. No entanto, nos substratos lignocelulósicos, a presença de hemicelulose e lignina limita a ação das enzimas hidrolíticas, fazendo-se necessária a remoção ou modificação química desses componentes por pré-tratamentos químicos e físicos. Pesquisas recentes, incluído algumas realizadas em nosso grupo, tem mostrado que a lignina representa um entrave maior à hidrólise enzimática que a hemicelulose.

Uma das formas pelas quais a lignina limita a hidrólise da celulose está relacionada ao acesso das enzimas a esse polissacarídeo. A associação da lignina e da hemicelulose na parede celular vegetal protege as cadeias de celulose do ataque das celulasas, dificultando a hidrólise desse polímero. Essa limitação da acessibilidade é confirmada pelos pré-tratamentos que removem a lignina, ou alteram a sua distribuição topoquímica, e geram poros na parede celular, aumentando os rendimentos de hidrólise de celulose.

A presença da lignina residual nos materiais lignocelulósicos pré-tratados pode afetar a hidrólise da celulose de outra forma. A lignina pode interagir de forma não específica com as celulasas, principalmente através de interações hidrofóbicas, diminuindo

a concentração de enzimas livres no meio de hidrólise. Dessa forma, os rendimentos de conversão de celulose podem ser comprometidos, dependendo da carga enzimática utilizada. Esse efeito pode ser minimizado e varia de acordo com o pré-tratamento, uma vez que a hidrofilicidade da lignina pode aumentar, diminuindo as interações desse componente com as celulasas.

Além disso, durante a hidrólise enzimática, alguns compostos aromáticos são solubilizados a partir da lignina e estes podem interagir com as enzimas, inibindo-as. Essa inibição depende principalmente da concentração desses compostos no meio de hidrólise e dos seus grupos funcionais, sendo os fenóis os maiores inibidores das celulasas.

Nesse contexto, é necessário compreender as limitações causadas pela lignina em biomassas distintas, submetidas a diferentes pré-tratamentos, para que processos mais eficientes sejam desenvolvidos. Essa abordagem permite direcionar não só o aperfeiçoamento das tecnologias de pré-tratamento, mas também a modificação direcionada das enzimas, através de ferramentas de engenharia genética, por exemplo, visando à redução das interações enzimas-lignina sem alterar, contudo, sua atividade catalítica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar e a geração de bagaço

A cana-de-açúcar é uma gramínea semiperene do gênero *Saccharum*, proveniente do sudeste asiático e introduzida no Brasil no século XVI (CONAB, 2014; FERREIRA et al., 2013). Atualmente, existem mais de 5 mil variedades disponíveis no banco de germoplasma do Centro de Tecnologia Canavieira, o maior do mundo (CTC, 2015), sendo que a maioria dessas variedades são resultados de cruzamentos entre a espécie acumuladora de sacarose *S. officinarum* e a espécie selvagem *S. spontaneum*, apesar de outras espécies serem utilizadas no melhoramento (FERREIRA et al., 2013; MING et al., 2006). Além do melhoramento clássico, variedades geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas no Brasil desde 1994, com a finalidade de melhorar a resistência a pragas, tolerância a herbicidas e ao estresse hídrico, com melhor produtividade e maior teor de açúcar. Estima-se que, a partir de 2018, algumas dessas variedades transgênicas sejam liberadas comercialmente pela Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia (CTNBio) no país (CTC, 2015).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China. Em dezembro de 2014, a produção estimada para a safra de 2014/2015 foi 642 milhões de toneladas, sendo que 56% foram destinadas à produção de etanol, e o restante para a produção de açúcar (CONAB, 2014). Apesar de a fração destinada à produção de açúcar e etanol ser dependente da demanda, o processamento da cana-de-açúcar, independentemente do produto desejado, resulta na geração de bagaço de cana, sendo que 1 tonelada de cana processada gera 125 kg de bagaço seco (NOGUEIRA, 2008). Atualmente, o principal destino desse coproduto é a queima, na qual é produzida energia para abastecimento da própria usina, e o excesso é comercializado. No entanto, menos de 30% das usinas estão conectadas ao sistema elétrico, impossibilitando a venda de energia elétrica, de forma que uma grande fração do bagaço permanece inutilizada (UNICA, 2011). Nesse contexto, a criação de biorrefinarias integradas à usina permitiria a utilização desse material excedente para a produção de combustíveis e outros produtos químicos, diminuindo a dependência das refinarias de petróleo convencionais, possibilitando o

desenvolvimento socioeconômico e minimizando os danos ambientais (SANTOS; BORSCHIVER; COUTO, 2010).

2.2. Parede celular da cana-de-açúcar

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa e dinâmica, composta por uma mistura de polissacarídeos, proteínas glicosiladas, lignina e sais minerais que se distribuem em diferentes camadas (SOMERVILLE et al., 2004). A primeira camada formada é a parede primária, da qual 90% são carboidratos e o restante são proteínas glicosiladas (MCNEIL et al., 1984). Internamente à parede primária, cessado o crescimento celular, se forma a parede secundária, subdividida em camadas S1, S2 e S3. Nas células com parede secundária, as duas paredes vizinhas aparecem ligadas pela lamela média, composta principalmente por lignina (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992). Em gramíneas, a parede secundária é composta por celulose (30 a 45%), hemiceluloses (40 a 50%) e lignina, que pode chegar a 20% (VOGEL, 2008). No bagaço de cana de açúcar, considerando todas as camadas da parede celular, a fração polissacarídica pode chegar a 75%, sendo a maior parte representada pela celulose (PANDEY et al., 2000).

O colmo da cana-de-açúcar é composto por uma série de nós e entrenós, os quais variam em comprimento e diâmetro, dependendo da posição no colmo (Figura 1a). Os entrenós, que representam a maior fração (mássica e volumétrica) do colmo, podem ser subdivididos transversalmente em regiões distintas, com base na composição química das paredes e nos tipos celulares em cada uma dessas regiões (Figura 1b). Internamente à fração mais externa (epiderme), encontra-se o córtex. Essa região é composta principalmente por feixes vasculares, formados por vasos (xilema e floema), circundados por fibras. Os feixes vasculares transportam seiva e são responsáveis pela sustentação (MOORE, 1987). Costa e colaboradores (2013) mediram o número médio de feixes vasculares em córtex de cana e encontraram o valor de 13 feixes/16 mm². Como pode ser observado na figura 1b, as paredes celulares das células de córtex são mais espessas, quando comparadas à região mais interna do colmo, a medula. Esta é composta, em sua maioria, por células de parênquima, apesar de conter também feixes vasculares. As células parenquimatosas são as mais abundantes na cana-de-açúcar e a função desse tipo celular é estocar sacarose (MOORE, 1987). Em um trabalho recente, Costa e colaboradores (2013)

avaliaram a distribuição mássica de córtex e medula em variedades de cana-de-açúcar e observou que a medula pode representar de 4,5% a 7,1% da massa do entrenó, enquanto que a massa do córtex pode chegar a 62,6%, sendo considerada essa a fração mais representativa.

Figura 1: (a) Colmo de cana-de-açúcar, evidenciando o nó e o entrenó. (b) Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar evidenciando diferenças entre células de parênquima, fibras e vasos das regiões de córtex e medula. Os tecidos estão indicados: M – medula; I – interface entre medula e córtex; C – córtex; E – epiderme (fração externa).

Fonte: (a) Adaptado de UNICA (2011), (b) adaptado de Siqueira et al. (2011).

Além disso, as células do córtex são mais lignificadas que as células de medula (SIQUEIRA et al., 2011; ZENG et al., 2012). Como consequência dessa maior lignificação, as células de córtex são mais recalcitrantes, oferecendo maior resistência à desconstrução enzimática, discutida mais adiante. Como essa fração é a mais representativa da cana-de-açúcar (COSTA et al., 2013), a elevada lignificação dessa região contribui substancialmente para a recalcitrância da cana-de-açúcar, e consequentemente do bagaço de cana.

Os principais componentes do bagaço de cana são celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY et al., 2000). O teor desses componentes varia bastante entre diferentes amostras de bagaço, como consequência das características genótípicas da cana-de-açúcar, das condições de cultivo, dos métodos de colheita e estocagem do bagaço (HAMES et al., 2003). O teor de celulose, por exemplo, pode variar de 35,7% a 45,6%, a hemicelulose, de 25,2% a 27,4% e a lignina, de 19,1% a 24,4% (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES,

2009; ESTEVES, 2011; MENDES et al., 2011; SANTOS et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2013). Além desses componentes, o bagaço de cana pode conter cinzas, que podem chegar 4,0% da massa total do bagaço, e extrativos, compostos não estruturais, cujos teores podem variar de 4,0 % a 9,0%, dependendo, inclusive, do método analítico utilizado (CANILHA et al., 2011; MILNE et al., 1992; SEABRA et al., 2010; TEMPLETON et al., 2010).

2.2.1. Celulose

A celulose é o polímero mais abundante na natureza. É formada por resíduos de glicose unidos por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), em torno da qual há um giro de 180°, o que faz com que sua unidade repetitiva seja a molécula de anidrocetobiose (Figura 2a) (ZHANG; LYND, 2004). Esse giro confere à molécula de celulose um aspecto linear, resultando em interações intra- e intermoleculares peculiares desse polímero, em comparação com outros polímeros de glicose (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Apesar de a estrutura básica de uma molécula de celulose ser semelhante em todas as espécies, sua organização espacial pode variar, e as diferenças são resultado de como as cadeias de celulose interagem entre si para formar a estrutura conhecida como microfibrila (O'SULLIVAN, 1997). Dentre as diversas estruturas polimórficas da celulose, na natureza as cadeias se arranjam na forma de celulose I, na qual as moléculas se organizam paralelamente, na mesma direção (O'SULLIVAN, 1997; ZHANG; LYND, 2004). Nesse tipo de celulose, há regiões nas quais as interações de hidrogênio e as forças de Van der Waals são mais intensas, formando um arranjo cristalino (ZHANG; LYND, 2004). As regiões cristalinas são intercaladas com regiões menos ordenadas, chamadas de amorfas, que também se encontram distribuídas na superfície da microfibrila (Figura 2b) (MOON et al., 2011; O'SULLIVAN, 1997). Devido à menor organização das regiões amorfas, estas são menos recalcitrantes que as regiões cristalinas, sendo até 30 vezes mais susceptível à hidrólise enzimática (HALL et al., 2010; LYND et al., 2002).

Figura 2: Representação da anidrocetobiose, unidade estrutural da molécula de celulose (a) e de uma microfibrila de celulose (b), mostrando regiões cristalinas, em cinza escuro, e regiões amorfas, em cinza claro.

Fonte: Adaptado de Moon et al. (2011).

2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é constituída de monômeros de pentoses, como D-xilose e L-arabinose, hexoses, como D-manose e D-galactose, ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetilas. A cadeia principal da hemicelulose de folhosas e gramíneas é a xilana, enquanto que a glucomanana prevalece em coníferas (FENGEL; WEGENER, 1983a; SAHA, 2003). Na cana-de-açúcar, a hemicelulose predominante é a 4-O-metilglucuronoarabinoxilana (Figura 3), na qual a cadeia principal, uma molécula de xilana (ligações β -1-4-glicosídicas entre resíduos de D-xiloses) faz ligações com resíduos de L-arabinoses no oxigênio do carbono 3 dos resíduos de xilose e com ácido glucurônico ou metilglucurônico no oxigênio do carbono 2, formando as ramificações do heteropolímero (CARPITA, 1996). Além desses substituintes, grupos acetila e ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e cumárico) também são encontrados (WENDE; FRY, 1997).

Figura 3: Estrutura representativa da glucoronoarabinoxilana de cana-de-açúcar.

Fonte: adaptado de Buckeridge e De Souza (2014).

2.2.3. Lignina

A lignina é uma biomolécula não polissacarídica, de natureza hidrofóbica, que interage com a celulose e hemicelulose, conferindo rigidez à parede celular. É o mais complexo dos constituintes do material lignocelulósico, formado por componentes fenólicos e alifáticos (HENRIKSSON, 2009). É formada pela polimerização desidrogenativa de alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico (LEWIS; YAMAMOTO, 1990; SUN et al., 2003).

Diferentes materiais lignocelulósicos apresentam tipos distintos de lignina, classificados de acordo com as unidades de fenilpropano e a proporção entre elas. A figura 4 mostra as moléculas precursoras da lignina. A lignina de coníferas, ou lignina G (guaiacil), contém quase exclusivamente derivados de álcool coniferílico. As unidades estruturais da lignina de folhosas são derivadas dos álcoois coniferílico e sinapílico, sendo classificadas como lignina GS (guaiacil-siringil). Um terceiro grupo, a lignina de gramíneas, apresenta os três precursores em sua estrutura e são classificadas como lignina HGS (hidroxifenil-guaiacil-siringil) (BURANOV; MAZZA, 2008; HENRIKSSON, 2009).

Figura 4: Unidades de fenilpropeno precursoras da lignina. Da esquerda para a direita, álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico.

Fonte: adaptado de Henriksson (2009).

As unidades estruturais da lignina são unidas por ligações covalentes, sendo a mais comum a ligação β -O-4, uma ligação éter entre o carbono β da cadeia alquílica e o quarto carbono do anel aromático. O rompimento dessa ligação promove a despolimerização da lignina, já que essa é a ligação mais susceptível a ataques químicos. Há também ligações carbono-carbono, do tipo β -5, β - β , 5-5, e β -1, além de outras ligações éter, do tipo α -O-4 e 5-O-4 (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Essas ligações estão representadas no modelo hipotético de lignina mostrado na figura 5.

Figura 5: Estrutura hipotética da lignina, mostrando as principais ligações presentes nessa molécula.

Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2009).

2.3. Desconstrução da parede celular

O aproveitamento integral de biomassas vegetais não é um conceito novo, sendo inclusive apresentado em livros-texto há algumas décadas (FENGEL; WEGENER, 1983b). De fato, inúmeros produtos podem ser gerados a partir do processamento eficiente dos materiais lignocelulósicos. A partir da lignina, por exemplo, podem ser produzidas moléculas de alto valor agregado, como vanilina, como alternativa à queima do polímero para geração de energia elétrica, processo mais comumente adotado em escala industrial (ARAÚJO; GRANDE; RODRIGUES, 2010; RAGAUSKAS et al., 2014). A produção de xilooligossacarídeos com efeitos prebióticos a partir da despolimerização parcial da hemicelulose tem sido estudada (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Além disso, a despolimerização completa da xilana resulta na liberação de xilose, que pode ser utilizada para produção de xitol e etanol (CORTEZ; ROBERTO, 2014; SLININGER et al., 2014). A celulose pode ser utilizada na sua forma polimérica, como tem demonstrado a centenária indústria de papel e celulose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009) e as mais modernas tecnologias relacionadas às nanoceluloses (CHIRAYIL; MATHEW; THOMAS, 2014). Já as moléculas de glicose, seus monômeros estruturais, podem ser utilizadas na produção de biomoléculas, como o farneseno (CHERRY; GRAY, 2013), ou para a produção de etanol, seja para utilização como combustível (ESCOBAR et al., 2009), ou para a síntese de outras moléculas, como etileno, polietileno e éter etil-terc-butílico (SANTOS; BORSCHIVER; COUTO, 2010).

A produção de glicose a partir da celulose envolve uma etapa de hidrólise enzimática, a qual é limitada, devido à elevada recalcitrância da parede celular (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; HIMMEL et al., 2007). Por essa razão, um tratamento químico, físico ou mecânico (ou uma combinação destes) deve anteceder a hidrólise enzimática para garantir uma melhor eficiência de sacarificação (GALBE; ZACCHI, 2012; MOSIER et al., 2005; ZHU; PAN, 2010).

2.3.1. Pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é de capital importância para a conversão enzimática satisfatória da celulose em glicose, seja pela remoção da lignina ou da hemicelulose (GALBE; ZACCHI, 2012). Os pré-tratamentos envolvem a desestruturação parcial da parede celular (Figura 6), aumentando a acessibilidade das enzimas hidrolíticas às moléculas de celulose (MOSIER et al., 2005). Essa desestruturação pode ser alcançada através de processos mecânicos, como a moagem (DA SILVA et al., 2010) ou de tratamentos químicos, em meio alcalino (MENDES et al., 2011), em meio ácido (SHUAI et al., 2010), na presença de líquidos iônicos (LEE et al., 2009) ou de solventes orgânicos (ZHAO; CHENG; LIU, 2009), e na maioria dos casos, esses são conduzidos em temperaturas mais elevadas que a ambiente (GALBE; ZACCHI, 2012). Os processos mecânicos também podem ser combinados com agentes químicos, como por exemplo, o tratamento por explosão a vapor catalisada por SO_2 (KANG et al., 2013) e o tratamento com sulfito alcalino seguido do refino (MENDES et al., 2011).

Figura 6: Desestruturação esquemática dos componentes da parede celular vegetal pela ação dos pré-tratamentos.

Fonte: adaptado de Mosier et al. (2005).

Independentemente da estratégia abordada, o pré-tratamento deve maximizar a ação das enzimas hidrolíticas; minimizar a perda de carboidratos; maximizar a recuperação da lignina; minimizar o uso de energia, reagentes e custo de equipamentos; permitir sua ampliação para escala industrial; e minimizar a liberação de compostos inibitórios, tanto para as enzimas, quanto para os microorganismos envolvidos em uma subsequente etapa de fermentação (HOLTZAPPLE; HUMPHREY, 1984).

2.3.1.1. Pré-tratamentos em meio alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos têm como objetivo principal a solubilização da lignina. Originalmente utilizadas nos processos de produção de papel e celulose, as reações em meio alcalino têm sido exploradas mais recentemente também com o objetivo de melhorar a etapa de hidrólise enzimática da celulose (CHEN et al., 2014). Em meio alcalino, a solubilização parcial da lignina ocorre sem que a fração polissacarídica seja substancialmente afetada, o que não é observado nas reações em meio ácido (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A principal forma de degradação dos polissacarídeos nessas condições é pelas reações de *peeling*, através das quais são eliminados os resíduos de açúcar do terminal redutor da cadeia, na forma de ácido isosacarínico (GELLERSTEDT, 2009).

A remoção de lignina dos materiais lignocelulósicos aumenta a digestibilidade dos mesmos (LEE et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011, 2013). Visando aumentar a solubilização da lignina, alguns pré-tratamentos combinam o efeito do álcali com outros compostos químicos, como íons sulfito e sulfeto, que funcionam como nucleófilos, e moléculas oxidantes, como antraquinona, que ajuda tanto na preservação dos polissacarídeos, quanto na deslignificação. Nas reações em meio alcalino, ocorre desprotonação das hidroxilas fenólicas da lignina e ocorre um equilíbrio entre o íon fenolato gerado e uma estrutura conhecida como metileno quinona, como pode ser observado na primeira reação, mostrada na figura 7 (GELLERSTEDT, 2009). Caso haja íons sulfito no meio reacional, esses íons podem reagir com o carbono α , mais deficiente em elétrons, da porção alquílica da lignina, sulfonando-a (GELLERSTEDT, 1976). A fragmentação da lignina, associada à sulfonação, gera os lignosulfonatos, derivados

sulfonados da lignina, com maior solubilidade em soluções aquosas (Figura 8) (FREDHEIM; CHRISTENSEN, 2003).

Figura 7: Reação de sulfonação da lignina em meio alcalino. Na primeira etapa, ocorre a desprotonação da hidroxila fenólica e a formação da metileno quinona. Na segunda etapa, ocorre o ataque nucleofílico do íon sulfito ao carbono α , sulfonando a lignina.

Fonte: Gellerstedt (1976).

O tratamento alcalino de bagaço de cana-de-açúcar, na presença de íons sulfito, tem mostrado resultados bastante promissores, alcançando valores altos de rendimento de hidrólise enzimática da celulose do bagaço tratado (superiores a 80%), utilizando cargas relativamente baixas de enzima (MENDES et al., 2011, 2013).

Figura 8: Estrutura representativa de um lignossulfonato. A presença do grupo sulfônico em sua estrutura aumenta a hidrofilicidade da molécula.

Fonte: adaptado de Fredheim e Christensen (2003).

2.3.1.2. Pré-tratamentos em meio ácido

Além da lignina, a hemicelulose também é responsável pelos baixos níveis de conversão enzimática de celulose de materiais não tratados. A interação da hemicelulose com as cadeias de celulose dificulta o acesso das enzimas celulolíticas, limitando a hidrólise (HIMMEL et al., 2007). O objetivo principal dos pré-tratamentos ácidos é solubilizar a hemicelulose, tornando a celulose mais acessível e resultando, conseqüentemente, em valores mais elevados de rendimentos de hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2011; HSU et al., 2010). Em meio ácido, as principais reações são hidrólises dos polissacarídeos, que resultam na despolimerização das cadeias, tanto da hemicelulose, quanto da celulose, resultando na liberação de oligômeros e monômeros. Apesar de não ser uma catálise seletiva, a hidrólise ácida da hemicelulose ocorre em taxas mais elevadas que a da celulose, devido principalmente, à cristalinidade desta (FENGEL; WEGENER, 1983c). Essa peculiaridade cinética permite a utilização da catálise ácida como pré-tratamento para solubilizar a hemicelulose, mantendo a maior parte da celulose na fração sólida. No entanto, uma desvantagem dos tratamentos ácidos, em comparação com os tratamentos em meio alcalino, é que a temperatura de reação é geralmente mais elevada, onerando custos mais elevados ao processo (GALBE; ZACCHI, 2012). Além disso, as reações de hidrólise dos polissacarídeos não são as únicas que acontecem em meio ácido, principalmente em temperaturas mais elevadas. Nessas condições, os monômeros provenientes da hemicelulose e da celulose sofrem reações de desidratação, formando furfural e hidroximetilfurfural, potenciais inibidores, caso o hidrolisado seja submetido a uma etapa de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Além de diminuir a eficiência de etapas posteriores à hidrólise enzimática, a formação desses produtos de desidratação resulta em menor recuperação dos carboidratos, uma das características importantes de um pré-tratamento eficaz (HOLTZAPPLE; HUMPHREY, 1984).

O meio ácido também resulta em modificações na lignina, mas, diferentemente do que ocorre em condições alcalinas, a presença do ácido favorece as reações de condensação (FENGEL; WEGENER, 1983c; GELLERSTEDT, 1976, 2009). Por esse motivo, durante o tratamento, a massa molar da lignina pode aumentar, dificultando a sua solubilização. Como consequência, os materiais pré-tratados em condições ácidas

geralmente tem elevado teor de lignina (KANG et al., 2013; SANTOS et al., 2011; TOQUERO; BOLADO, 2014).

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído tem sido amplamente utilizado, principalmente no processamento de gramíneas, com relativo sucesso (CANILHA et al., 2011; CASTRO; ROBERTO, 2014; HSU et al., 2010; ISHIZAWA et al., 2007; SANTOS et al., 2011; YANG; WYMAN, 2004). Para outros tipos de biomassa, como coníferas, esse pré-tratamento não tem se mostrado eficiente (ZHU; PAN, 2010). Por essa razão, outros tratamentos, também em condições ácidas, têm sido estudados, como é o caso do SPORL (*Sulfite Pretreatment to Overcome the Recalcitrance of Lignocelulose*), que utiliza íons bissulfito para promover a deslignificação em condições ácidas (ZHU et al., 2009). Outra variação do pré-tratamento ácido diluído convencional é a combinação do efeito da catálise ácida com a descompressão súbita, resultado da pressurização do reator com vapor em elevada temperatura, seguida da liberação da pressão (DONALDSON; WONG; MACKIE, 1988). Nesse tipo de pré-tratamento, a temperatura geralmente excede à de transição vítrea da lignina (IRVINE, 1985) e, como consequência, esta apresenta um aspecto fluido na parede celular. Como as reações ocorrem em ambiente aquoso, as moléculas de lignina, de caráter hidrofóbico, tendem a se aglomerar para diminuir a superfície de interação com o meio hidrofílico que as envolve, formando gotículas de lignina. Durante a descompressão, essas gotículas são forçadas para fora da parede celular, alterando a sua distribuição topoquímica na biomassa pré-tratada (DONOHOE et al., 2008; SUN; CHENG, 2002). A figura 9 ilustra o comportamento da lignina nessas condições.

Figura 9: Modelo esquemático mostrando a coalescência da lignina em meio aquoso, em temperaturas superiores à sua transição vítrea, seguido da extrusão da mesma, devido à descompressão súbita no tratamento por explosão a vapor.

Fonte: adaptado de Donohoe et al. (2008).

Os pré-tratamentos com sulfito em meio ácido (SPORL) e por explosão a vapor tem apresentado resultados promissores, com rendimento de hidrólise enzimática da celulose

das biomassas pré-tratadas superiores a 90% (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010; SENDELIUS, 2005; SHUAI et al., 2010; TIAN et al., 2010; ZHU et al., 2009)

2.3.2. Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise da celulose requer a ação sinérgica de enzimas, as quais são divididas em três grupos principais: exo-1,4- β -D-glucanases, ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176), endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) e 1,4- β -D-glicosidases, ou celobiasas, (EC 3.2.1.21) (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008). As celobiohidrolases são enzimas processivas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas próximas aos terminais da molécula de celulose, liberando celobiose e algumas celodextrinas (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Podem ser classificadas em dois grupos, CBHI e CBHII, sendo que a primeira atua nas extremidades redutoras da celulose, e a segunda, nos terminais não redutores (TEERI et al., 1998). As endoglucanases também hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas, porém, aleatoriamente no interior da molécula de celulose, resultando em uma rápida diminuição do grau de polimerização (ZHANG; LYND, 2004). A diferença entre o mecanismo de ação das celobiohidrolases e das endoglucanases está relacionada à estrutura tridimensional dessas enzimas. O sítio ativo das celobiohidrolases apresenta o formato de túnel (Figura 10a) e, conseqüentemente, apenas os terminais da celulose podem alcançar os aminoácidos responsáveis pela catálise. Já o formato de fenda do sítio ativo das endoglucanases (Figura 10b) permite que a catálise ocorra em qualquer uma das ligações glicosídicas da molécula de celulose, desde que não haja impedimento estérico para a ação destas (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

As endoglucanases e as celobiohidrolases podem apresentar um segundo domínio, conhecido como módulo de ligação a carboidratos, ou CBMs. Os CBMs são domínios não catalíticos, com alta afinidade pelos polissacarídeos, e são responsáveis pela adsorção eficiente das celulasas na molécula de celulose, aumentando a concentração de enzima na superfície do polissacarídeo (BORASTON et al., 2004). Apesar de serem considerados essenciais para a hidrólise efetiva da celulose, recentemente alguns trabalhos têm proposto que os CBMs são dispensáveis quando a reação de hidrólise é conduzida com altas concentrações de sólidos (PAKARINEN et al., 2014; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2013).

Figura 10: Estrutura tridimensional mostrando o túnel da CBHII de *T. reesei* (a), e a fenda da endoglucanase II de *T. fusca* (b). As setas vermelhas indicam os sítios ativos das enzimas.

Fonte: adaptado de Davies e Henrissat (1995).

A ação das duas enzimas supramencionadas é insuficiente para liberar glicose eficientemente a partir da celulose, sendo necessário um terceiro grupo de enzimas. Apesar de não atuarem diretamente na molécula de celulose e por isso não serem consideradas celulasas verdadeiras, as β -glicosidases, ou celobiasas, são indispensáveis no processo de conversão enzimática da celulose em glicose, pois hidrolisam moléculas de celobiose e celodextrinas liberadas pelas celobiohidrolases (LYND et al., 2002). Além disso, seu efeito sinérgico no sistema celulolítico está relacionado à diminuição da forte inibição das celulasas, especialmente celobiohidrolases, causada pelo acúmulo de celobiose (LAMED et al., 1991).

Reese, Siu e Levinson (1950) sugeriram que no mecanismo de hidrólise da celulose seria necessária a participação de um componente não hidrolítico, para desestruturar a molécula de celulose e aumentar a sua acessibilidade às enzimas hidrolíticas. Arantes e Saddler (2010) chamaram essa desestruturação de amorfogênese, como uma alusão à diminuição da cristalinidade da celulose. As proteínas envolvidas na amorfogênese seriam expansinas, *swolleninas*, CBMs e a até então chamada GH61 (glicosil-hidrolase família 61). A GH61, atualmente denominada AA9 (*Auxiliary Activity 9*) pertence à classe das monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), enzimas que catalisam a clivagem não hidrolítica das cadeias polissacarídicas, gerando um terminal não oxidado (redutor ou não redutor, dependendo do mecanismo de ação da AA9) e um terminal com um resíduo de açúcar oxidado, denominado ácido aldônico (HORN et al., 2012; VAAJE-KOLSTAD et

al., 2010). Estudos recentes têm mostrado que a AA9 potencializa a ação das enzimas hidrolíticas, principalmente nas regiões cristalinas, resultando em rendimentos de hidrólise de celulose significativamente mais elevados (HARRIS et al., 2010; HORN et al., 2012; HU et al., 2014). O efeito benéfico da ação da AA9 está relacionado principalmente à geração de novos sítios de ação para celobiohidrolases. A oxidação catalisada por essa enzima depende, no entanto, da presença de moléculas doadoras de elétrons, que podem ser compostos fenólicos solúveis ou até mesmo a lignina presente na matriz lignocelulósica. A hidrólise de celulose pura, sem adição de compostos fenólicos, não é potencializada pela presença da AA9 (HU et al., 2014). A figura 11 esquematiza a despolimerização da celulose pela ação combinada das enzimas hidrolíticas e da AA9.

Figura 11: Esquema representativo da despolimerização da celulose pela ação combinada de enzimas hidrolíticas e da AA9. A lignina e os fenóis solúveis atuam como doadores de elétrons para a enzima oxidativa AA9. Abreviações: CBH – celobiohidrolase; CBM – módulo de ligação a carboidratos; EG – engoglucanase; AA9 – *auxiliary activity 9*.

Fonte: adaptado de Horn et al. (2012).

2.4. A lignina como agente limitante da hidrólise da celulose

Conforme exposto, a remoção tanto da hemicelulose quanto da lignina durante a etapa de pré-tratamento resulta em aumentos significativos nos rendimentos de hidrólise enzimática da celulose. No entanto, há discussões a respeito de qual desses componentes representa o maior entrave à hidrólise enzimática, pois isso poderia direcionar o desenvolvimento de pré-tratamentos mais adequados. No caso de gramíneas, por exemplo, há trabalhos que mostram que a presença da hemicelulose na parede celular é mais

negativa para a hidrólise enzimática da celulose que a da lignina (CORTEZ et al., 2014). No entanto, uma análise comparativa de trabalhos que avaliaram a remoção desses componentes, de forma parcialmente seletiva, indica que a remoção de lignina tem um impacto maior no rendimento de conversão de celulose em glicose. Fixando, por exemplo, o valor de 50% de remoção de cada um dos componentes, é possível comparar o efeito da deslignificação de bagaço de cana com clorito de sódio em meio ácido (SIQUEIRA et al., 2013), com o efeito da remoção de xilana de forragem de milho utilizando o tratamento ácido sulfúrico diluído (TAI; KESHWANI, 2014). Ao remover essa quantidade de lignina do bagaço de cana, por interpolação, o valor estimado do rendimento de conversão da celulose chegaria a 80%, um incremento de 60%, ao comparar com a conversão do bagaço não deslignificado (Figura 12a). Removendo a mesma quantidade de xilana, por outro lado, o incremento no rendimento de hidrólise enzimática da celulose seria inferior a 10% (Figura 12b). Vale ainda ressaltar que ambos os trabalhos utilizaram o mesmo coquetel enzimático (Cellulclast), fixando o mesmo tempo de hidrólise, mas que a carga enzimática utilizada na hidrólise de forragem de milho pré-tratado foi 6 vezes maior que a utilizada para hidrolisar o bagaço de cana deslignificado. Dessa forma, fica evidente que a lignina tem um papel muito importante na recalcitrância da parede celular de gramíneas, e que a compreensão da limitação causada por esta na hidrólise enzimática se faz necessária.

Figura 12: Comparação do efeito da remoção da lignina de bagaço de cana (a) e da xilana de forragem de milho (b) na hidrólise enzimática da celulose.

Fonte: adaptado de (a) Siqueira et al. (2013) e de (b) Tai e Keshwani (2014)

2.4.1. Limitação da acessibilidade das enzimas hidrolíticas às cadeias de celulose

Uma das principais limitações da hidrólise enzimática da celulose é a dificuldade do acesso das enzimas hidrolíticas às moléculas de celulose (JEOH et al., 2007; MOONEY et al., 1997). A presença da lignina na parede celular, além de dificultar esse acesso, ainda limita a capacidade de inchamento das fibras de celulose, diminuindo ainda mais a área superficial acessível da celulose (ERIKSSON et al., 1991; NAKATANI et al., 2008). De fato, diversos trabalhos tem mostrado que a remoção da lignina resulta na criação de poros na parede celular, aumentando a área acessível às enzimas hidrolíticas (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; MOONEY et al., 1997, 1998; SANTI-JUNIOR et al., 2013). Em um trabalho recente, Santi-Junior et al. (2013) deslignificaram o bagaço de cana e observaram uma correlação positiva entre o aumento da porosidade do bagaço com os rendimentos de hidrólise da celulose, confirmando a importância da limitação da acessibilidade causada pela lignina na ineficiente hidrólise enzimática do bagaço de cana não tratado.

No entanto, nem sempre é necessário remover efetivamente a lignina para aumentar os rendimentos de hidrólise. Como discutido anteriormente, determinados pré-tratamentos, como a explosão a vapor, podem alterar a distribuição topoquímica da lignina na parede celular, sem alterar, contudo, o teor desse componente (DONOHUE et al., 2008; SUN; CHENG, 2002). Em alguns casos, essa realocização da lignina é suficiente para que maiores rendimentos de conversão da celulose sejam alcançados (VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010).

Algumas técnicas têm sido utilizadas para medir a porosidade da parede celular e a acessibilidade da celulose. A exclusão por solutos, por exemplo, utiliza dextranas de diferentes massas molares como sondas para medir a distribuição do tamanho de poros do material (SANTI-JUNIOR et al., 2013; STONE; SCALLAN, 1986). Outra técnica é a termoporometria, um método calorimétrico que mede a porosidade baseado nas diferenças nos pontos de fusão de água confinada em poros (LANDRY, 2005). No entanto, essas técnicas medem apenas o quão poroso é um material, não medindo, diretamente, a celulose acessível às celulasas. Por essa razão, uma técnica inicialmente desenvolvida para a indústria de papel e celulose com a finalidade de medir o grau de desfibramento das fibras celulósicas tem sido aplicada na compreensão de modificações estruturais nos materiais lignocelulósicos submetidos a pré-tratamentos: a coloração de Simons. Proposta por

Simons (1950), a técnica se baseia nas diferenças químicas e estereométricas de dois corantes, um laranja (*Direct Orange*) e um azul (*Direct Blue*), que refletem na adsorção desses nas fibras celulósicas. A razão entre as quantidades de corantes adsorvidos nas fibras (laranja/azul) é um indicativo da celulose superficial acessível dos materiais lignocelulósicos (ARANTES; SADDLER, 2011).

2.4.2. Adsorção improdutiva

A hidrólise enzimática da celulose é uma reação heterogênea e requer a adsorção das celulasas nas moléculas de celulose (JEOH et al., 2007). A ligação das enzimas hidrolíticas à celulose envolve o pareamento de resíduos de aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina, e os anéis de anidroglicose, além de ligações de hidrogênio entre resíduos de glutamina e hidroxilas do polissacarídeo (LINDER et al., 1995). Como essas interações não são específicas, as enzimas podem ser ligar a outras superfícies, como a lignina, diminuindo a quantidade de enzimas disponíveis para ligar à celulose. Esse efeito, chamado de adsorção improdutiva, tem sido observado em diversos materiais lignocelulósicos, submetidos a diferentes pré-tratamentos, e tem sido considerado um importante efeito inibitório da lignina (BERLIN et al., 2005a; CHERNOGLAZOV; ERMOLOVA; KLYOSOV, 1988; NAKAGAME; CHANDRA; SADDLER, 2010; PALONEN et al., 2004; RAHIKAINEN et al., 2011).

Os grupos funcionais da lignina exercem importante influência na adsorção improdutiva. Como é uma molécula poliaromática, esta pode ser ligar às enzimas por pareamento de anéis e outras interações hidrofóbicas (LINDER et al., 1995; PALONEN et al., 2004). Durante o pré-tratamento, modificações químicas na lignina podem alterar a sua afinidade por proteínas. Pré-tratamentos que resultem no aumento de hidroxilas fenólicas podem aumentar a capacidade adsorptiva da lignina residual (RAHIKAINEN et al., 2013; SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997; YU et al., 2014). Por outro lado, pré-tratamentos que aumentam a hidrofilicidade da lignina, principalmente pela introdução de grupos ácidos, resultam em materiais menos susceptíveis a essa inibição (LOU et al., 2013; NAKAGAME et al., 2011a). Isso ocorre devido às repulsões eletrostáticas, importantes forças opostas à adsorção improdutiva. Como o ponto isoelétrico da maioria das celulasas varia de 3,6 a 8,5, algumas delas estão carregadas negativamente em pH 4,8,

normalmente utilizando para hidrólise enzimática, causando repulsão pelos grupos ácidos também negativamente carregados da lignina (NAKAGAME et al., 2011b). Além das diferenças devido ao pré-tratamento, ligninas de diferentes materiais lignocelulósicos apresentam diferentes capacidades adsorptivas. Em geral, ligninas de madeiras, tanto coníferas, quanto folhosas, adsorvem mais celulasas que as ligninas de resíduos agroindustriais (NAKAGAME; CHANDRA; SADDLER, 2010). No entanto, a adsorção improdutiva não depende apenas dos grupos funcionais da lignina, mas também das propriedades das enzimas, como ponto isoelétrico e superfície hidrofóbica (LAI et al., 2014; SAMMOND et al., 2014).

Outro ponto importante é o papel dos domínios de ligação a carboidratos (CBMs). Como a adsorção improdutiva não é específica, diversas proteínas podem adsorver na lignina, mesmo sem CBMs (BERLIN et al., 2005a). No entanto, os CBMs possuem três resíduos de tirosina alinhados (Y5, Y31 e Y32), importantes para o pareamento de anéis da interação CBM-celulose (LINDER et al., 1995). Provavelmente, esses resíduos também exerçam influência na adsorção improdutiva, uma vez que tem sido observado aumento na adsorção improdutiva pela presença de CBM (RAHIKAINEN et al., 2013).

A adsorção improdutiva representa um problema para a hidrólise enzimática não só por diminuir a quantidade de enzimas disponíveis, mas também pela inativação térmica das enzimas. A maior parte dos estudos de adsorção são conduzidos em baixas temperaturas (4 °C), para evitar modificações estruturais nos substratos devido à hidrólise. Nessa temperatura, as enzimas que adsorvem na lignina podem ser recuperadas, com perdas mínimas na atividade catalítica. No entanto, na temperatura de hidrólise (acima de 45 °C), as interações proteínas-lignina são intensificadas, e as enzimas perdem suas estruturas nativas, desnaturando e se ligando irreversivelmente à lignina (RAHIKAINEN et al., 2011).

A adsorção improdutiva é um fenômeno dependente da concentração, de forma que a superfície disponível para a interação diminui à medida que a concentração de proteínas aumenta. Por essa razão, o efeito negativo da adsorção improdutiva pode ser contornado se a quantidade de enzima adicionada for relativamente alta (KUMAR et al., 2012; NAKAGAME; CHANDRA; SADDLER, 2010). Também é possível contornar o efeito da adsorção improdutiva adicionando outras proteínas, como albumina sérica bovina (BSA), antes de adicionar as celulasas (YANG; WYMAN, 2006). O bloqueio dos sítios de adsorção da lignina pela adição de BSA ocorre não só pelo efeito da concentração de proteínas, mas também devido a propriedades químicas dessa proteína. A albumina sérica

bovina tem uma das mais elevadas hidrofobicidades superficiais, o que contribui para a sua adsorção preferencial na lignina (LIJNZAAD; BERENDSEN; ARGOS, 1996; SAMMOND et al., 2014). O efeito da adsorção improdutiva também pode ser diminuído pela adição de surfactantes (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002). No entanto, contornar a adsorção improdutiva ao utilizar baixas concentrações de proteínas ainda representa um desafio.

2.4.3. Inibição das enzimas celulolíticas por compostos fenólicos

Durante a hidrólise enzimática, componentes de baixa massa molar provenientes do material lignocelulósico podem ser solubilizados na fase aquosa. Esses compostos também exercem influência negativa nos níveis de hidrólise enzimática da celulose (XIMENES et al., 2010). De todos os compostos solúveis presentes no meio de hidrólise enzimática, os derivados da lignina são os mais limitantes, inibindo competitivamente as enzimas do complexo celulolítico (JING; ZHANG; BAO, 2009). Dentre os compostos liberados a partir da lignina estão os monoméricos siringaldeído, vanilina e ácido 4-benzóico, todos inibidores de celulasas de *T. reesei* e de β -glicosidase de *A. niger* (XIMENES et al., 2010). A vanilina, por exemplo, é um inibidor não-competitivo das enzimas celulolíticas (LI; QI; WAN, 2014). Além dos fenóis monoméricos, o ácido tânico, um polifenol, também tem mostrado potencial inibitório, inclusive, maior que o dos fenóis supracitados (XIMENES et al., 2011). No caso das gramíneas, outros dois compostos fenólicos podem estar presentes, com potencial inibitório considerável: ácidos ferúlico e cumárico.

Além de inibir, os fenóis também podem inativar as celulasas. Ximenes et al. (2011) mediram o efeito dos fenóis monoméricos e do ácido tânico na inibição, a qual ele considerou um processo reversível, e na inativação, processo irreversível, através da incubação prévia das enzimas celulolíticas em soluções desses fenóis. Todos os fenóis testados inativaram, em diferentes graus, a β -glicosidase de *T. reesei*, e a maioria inativou a β -glicosidase de *A. niger*. A inativação das celulasas ocorreu com menor intensidade, mas, ainda assim, a presença do ácido tânico foi mais severa para as enzimas.

A inibição por compostos fenólicos depende não só da espécie fenólica, mas também da concentração dos mesmos em solução. As diferenças no grau de inibição causadas por compostos fenólicos distintos estão relacionadas aos seus grupos funcionais.

As hidroxilas fenólicas, por exemplo, inibem mais fortemente as enzimas hidrolíticas que os grupos metoxila (PAN, 2008). Os grupamentos aldeído também tem papel importante na inibição (LI; QI; WAN, 2014). O efeito da concentração pode ser observado, uma vez que em baixas concentrações, alguns compostos fenólicos não afetam a hidrólise enzimática, mas pequenos incrementos resultam em inibição significativa das enzimas (PAN, 2008).

Outra consideração a respeito da inibição das enzimas hidrolíticas por compostos fenólicos é a solubilidade desses no meio de hidrólise. Dependendo do material lignocelulósico e do tipo de pré-tratamento os compostos provenientes da lignina podem ter solubilidades diferentes. Nesse caso, materiais com ligninas mais solúveis podem afetar afetar mais rápida e significativamente a hidrólise da celulose, mesmo que o potencial inibitório delas seja menor (KIM, 2012).

No entanto, alguns efeitos positivos podem ser associados à presença de fenóis durante a hidrólise enzimática da celulose. Como mencionado anteriormente, um importante grupo de enzimas no processo de despolimerização da celulose é o das AA9, que catalisam a clivagem oxidativa da celulose (HORN et al., 2012; HU; ARANTES; SADDLER, 2011). A ação dessa enzima depende da presença de doadores de elétrons, que podem ser compostos fenólicos, como ácido gálico (HU et al., 2014). Além disso, outros compostos aromáticos, que podem ser fenólicos, como os lignossulfonatos, podem potencialmente aumentar os rendimentos de hidrólise da celulose (WANG; LAN; ZHU, 2013). A explicação para esse aumento se deve ao caráter anfipático dos lignossulfonatos, que podem atuar como surfactantes, diminuindo o efeito da adsorção improdutiva causada pela lignina residual (WANG et al., 2013).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivos gerais

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da limitação da acessibilidade, da adsorção improdutiva e da inibição enzimática causados pela lignina na hidrólise enzimática da celulose de bagaços de cana pré-tratados por processos ácidos e alcalinos, bem como avaliar qual destes entraves comprometem mais intensamente a conversão satisfatória da celulose.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as diferenças na acessibilidade da celulose do bagaço de cana-de-açúcar submetido aos pré-tratamentos com NaOH; Na₂SO₃/NaOH; H₂SO₄; NaHSO₃/H₂SO₄ e explosão a vapor/SO₂
- Avaliar o efeito da adição de lignina de diferentes fontes na reação de hidrólise da celulose;
- Medir a capacidade adsortiva de proteínas das ligninas isoladas dos bagaços de cana pré-tratados;
- Avaliar a adsorção improdutiva das enzimas celulolíticas nas ligninas dos bagaços pré-tratados;
- Avaliar o efeito dos compostos solubilizados a partir dos bagaços pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose e na diminuição das atividades de CBHI e β -glicosidase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

O bagaço de cana utilizado nesse trabalho foi obtido da Companhia Açucareira Vale do Rosário, Orlândia, SP. A holocelulose foi obtida pelo processamento Kraft de eucalipto, seguido do branqueamento, gentilmente cedida pela Empresa Melhoramentos, Caieiras, SP. A polpa de dissolução foi obtida através da hidrólise ácida de polpa kraft de álamo (*Populus sp.*), cedida pelo *Forest Products Laboratory – USDA Forest Services*.

As amostras de lignina extraídas de diferentes biomassas (Indulin, de pinus; KEL-HCl, de eucalipto; e SEBL-HCl, de bagaço de cana) foram cedidas pelo Laboratório de Química da Madeira, na Escola de Engenharia de Lorena / Universidade de São Paulo, cujos métodos de extração são descritos por Ferraz et al. (1997).

Os extratos enzimáticos utilizados foram Celluclast (130 mg de proteínas / mL; 65 FPU/mL) e Cellic CTec 3 (233 mg de proteínas / mL; 170 FPU/mL) como fonte de celulasas (Novozymes); Novozym 188 (458 UI/mL) como fonte de β -glicosidase; e Cellic HTec.

Foram também utilizadas enzimas comerciais isoladas: CBHI de *Trichoderma logibrachiatum*; EGII, do mesmo microrganismo; e β -glicosidase família 3 de *Aspergillus niger* (Megazymes).

4.2. Pré-tratamentos do bagaço de cana

4.2.1. Pré-tratamento alcalino (NaOH)

O tratamento alcalino foi conduzido adicionando 900 mL de uma solução de NaOH 0,55% (m/v) a 100 g (massa seca) de bagaço, resultando em uma tratamento NaOH 5,0% (massa de NaOH / massa de bagaço) (MENDES et al., 2011). Antes de adicionar a solução alcalina, o bagaço seco foi submetido ao vácuo, em frasco kitassato por 30 min. Em

seguida, a solução de NaOH foi adicionada ao sistema, mantendo o vácuo por 15 min, para que permitir a impregnação da solução alcalina no lumen celular. Em seguida, a mistura foi aquecida a 120 °C, por 1 h, em autoclave, e resfriada após esse tempo. Utilizando um funil de Büchner, o material foi filtrado a vácuo. Para que não houvesse perda de finos, o líquido foi recirculado até que não houvesse mais turbidez no filtrado. Uma fração de bagaço não lavado foi separada, e o restante foi lavado com água (a massa de água utilizada na lavagem foi 20 vezes a massa do bagaço pré-tratado). Ambas as frações foram congeladas até que fossem utilizadas.

4.2.2. Pré-tratamento sulfito alcalino ($\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$)

A reação foi preparada e conduzida da mesma forma que no item 4.2.1, exceto pela adição de Na_2SO_3 (10,0 g) à solução de NaOH 0,5% (m/v), resultando em um tratamento 5,0% NaOH e 10% Na_2SO_3 (massa de reagente / massa de bagaço) (MENDES et al., 2011). As condições de impregnação e tratamento, bem como as de processamento do material tratado foram as mesmas descritas no item 4.2.1.

4.2.3. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4)

O bagaço de cana-de-açúcar (100 g, massa seca) foi pré-tratado em um digestor com rotação produzido por Aurora Products Ltd (Savona, BC, Canadá). Foram adicionados ao digestor (capacidade para 2,0 L) o bagaço e uma solução de ácido sulfúrico (0,75 g de H_2SO_4 e 900 mL de água), resultando em uma concentração de ácido 0,75% (massa de ácido / massa de bagaço). A temperatura de cozimento foi 160 °C e o tempo de tratamento foi 1 h, considerando a rampa de aquecimento (30 min). Após esse tempo, os digestores foram imersos em água fria. Terminado o tratamento, o material foi processado conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.4. Pré-tratamento sulfito ácido ($\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$)

O tratamento foi preparado e conduzido da mesma forma que no item 4.2.3, exceto pela adição de NaHSO_3 à solução de H_2SO_4 , resultando em um tratamento 0,75% H_2SO_4 e 5% NaHSO_3 (massa / massa de bagaço), conforme proposto por Shuai e colaboradores (2010), com algumas adaptações para bagaço de cana. Foram utilizados 100 g de bagaço (massa seca), 900 mL de água, 0,75 g de H_2SO_4 e 5,0 g de NaHSO_3 . Terminada a reação, o material foi processado conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.5. Pré-tratamento por explosão à vapor catalisada com SO_2

Antes de iniciar o pré-tratamento, o teor de umidade do bagaço aumentado para 50%, através da adição de água, para facilitar a absorção de SO_2 . As condições de pré-tratamentos foram baseadas em estudo prévio (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). O bagaço de cana umedecido foi dividido em dois sacos plásticos (50 g massa seca em cada) e em cada saco foram adicionados 1,5 g de SO_2 , resultando em uma concentração de SO_2 de 3,0% (massa de SO_2 / massa de bagaço). Os sacos plásticos foram selados e o conteúdo foi mantido em capela de exaustão por 12 horas, para permitir a absorção do SO_2 . O bagaço contendo SO_2 foi adicionado a um reator com injeção de vapor com capacidade para 2,0 L (StakeTech., Ontario Canadá). O tratamento foi realizado em duas bateladas (50 g em cada), e as condições de temperatura e tempo foram 190 °C, por 5 minutos. Após o pré-tratamento, a fração líquida e sólida foram removidas do reator e o material foi processado conforme descrito no item 4.2.1.

Para não comprometer a fluidez do texto, a partir desse ponto, esse tratamento será discutido apenas como explosão a vapor.

4.3. Digestibilidade dos bagaços pré-tratados

A digestibilidade dos bagaços tratados (e lavados) foi determinada hidrolisando enzimaticamente os mesmos com o extrato Celluclast, suplementando com Novozym 188. Variou-se a quantidade de proteína adicionada em cada ensaio, com base no teor protéico do extrato Celluclast, em 2,5 mg de proteína / g de celulose, 5 mg/g, 10 mg/g, 20 mg/g e 30 mg/g. A cada um desses ensaios foi adicionado o extrato Novozym 188, com base na sua atividade de β -glicosidase. Foram adicionados, na mesma sequência, 2,5 UI / d de celulose, 5 UI/g, 10 UI/g, 20 UI/g e 30 UI/g. Os bagaços utilizados nesse experimento foram lavados. A quantidade de proteína adicionada foi baseada apenas no extrato Celluclast para que fossem feitas comparações com o extrato Cellic CTec3, o qual não necessita suplementação com β -glicosidase. Com esse extrato, foram feitas hidrólises utilizando 2,5 mg de proteína / g de celulose.

As hidrólises foram conduzidas em tubos de microcentrífuga de 2 mL com tampa rosqueada, e o volume total foi 1,5 mL. O teor de sólidos em todos os ensaios foi 2%. As amostras foram colocadas em uma incubadora com sistema de rotação Combi H-12 (FINEPCR), a 50 °C, 120 rpm. O pH foi mantido em 4,8 com tampão acetato de sódio 50 mmol/L. A hidrólise foi conduzida por 72 h. Após esse tempo, as amostras foram aquecidas a 100 °C para desnaturação das enzimas.

O rendimento de hidrólise de celulose (RHC) foi calculado a partir da equação 1,

$$RHC = \frac{[g] \times V \times 0,9}{\frac{[c]}{100} \times m_s} \times 100 \quad (1)$$

na qual [g] é a concentração de glicose no hidrolisado enzimático (mg/mL), V é o volume de líquido no hidrolisado enzimático (mL), [c] é a porcentagem de celulose no substrato e m_s é a massa seca de substrato utilizada no ensaio de hidrólise enzimática.

4.4. Determinação da celulose superficial acessível dos bagaços de cana pré-tratados

A celulose superficial acessível foi determinada pela metodologia proposta por Simons (1950) e melhorada por outros pesquisadores (CHANDRA; SADDLER, 2012; CHANDRA et al., 2008, 2009; YU; MINOR; ATALLA, 1995).

Foram preparadas soluções de dois corantes: o corante laranja, Direct Orange (Pontamine Fast Orange 6RN, lote nº 814071) e o corante azul, Direct Blue (Pontamine Fast Sky Blue 6BX, lote nº 327081), ambos adquiridos da Pylam Products Co. Inc. O corante azul foi preparado em uma concentração de 10 mg/mL. O corante laranja foi originalmente preparado em concentração de 10 mg/mL e submetido a ultrafiltração com aparato de filtração Amicon, utilizando 28 psi de nitrogênio e membrana de 100 kDa, até que restasse 20% do volume inicial. A membrana foi trocada e a fração retida foi filtrada utilizando a nova membrana, com mesmo corte (100 kDa). Esse procedimento foi repetido e, após as 3 filtrações, a concentração da solução foi determinada através de peso seco, em estufa a 105 °C, e reajustada para 10 mg/mL.

A absorvidade molar dos corantes foi determinada diluindo as soluções e medindo absorbância de ambos os corantes em dois comprimentos de onda: 455 nm, máximo de absorção do corante laranja, e 624 nm, máximo de absorção do corante azul. Foram construídas curvas relacionando a concentração das soluções de cada corante com a absorbância dessas soluções. A absorvidade molar dos corantes, em cada comprimento de onda, foi a inclinação dessa curva em cada uma das condições.

Para cada bagaço tratado, os experimentos de adsorção dos corantes foi realizado em 5 condições, variando a concentração dos corantes. Em tubos de microcentrífuga de 2 mL, foram adicionados 10 mg (massa seca) do bagaço tratado e a cada um dos tubos foram adicionados 100 µL de tampão fosfato salino pH 6,0 (PO_4 0,3 mol/L, NaCl 1,4 mmol/L) e água deionizada. A quantidade de água adicionada variou de forma que a quantidade de líquido no tubo fosse 1,0 mL (considerando o volume de água do bagaço, de tampão e de corantes adicionados). A mistura foi incubada por 12 h, a 25 °C. Após esse tempo, foram adicionadas as soluções dos corantes DO e DB, ambos a 10 mg/mL. A quantidade de cada corante adicionada foi 25 µL, 50 µL, 75 µL, 100 µL, 150 µL e 200 µL, em cada uma das condições. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 70 °C, 200 rpm, por 6 h. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 1800 rpm, por 5 min e a leitura da absorbância do

sobrenadante foi feita em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 455 nm e 624 nm. A concentração de cada corante em solução foi calculada através das equações,

$$[DO] = \frac{(\epsilon_{DB624} \times A_{455}) - (\epsilon_{DB455} \times A_{624})}{(\epsilon_{DO455} \times \epsilon_{DB624}) - (\epsilon_{DB455} \times \epsilon_{DO624})} \quad (2)$$

$$[DB] = \frac{(\epsilon_{DO455} \times A_{624}) - (\epsilon_{DO624} \times A_{455})}{(\epsilon_{DO455} \times \epsilon_{DB624}) - (\epsilon_{DB455} \times \epsilon_{DO624})} \quad (3)$$

Nas quais [DO] e [DB] são as concentrações dos corantes laranja e azul nas soluções, respectivamente, em mg/mL; ϵ_{DB455} e ϵ_{DB624} são as absorvidades molares do corante azul nos comprimentos de onda 455 nm e 624 nm, respectivamente, em $L \ g^{-1} \ cm^{-1}$; ϵ_{DO455} e ϵ_{DO624} são as absorvidades molares do corante laranja nos comprimentos de onda 455 nm e 624 nm, respectivamente, em $L \ g^{-1} \ cm^{-1}$; e A_{455} e A_{624} são os valores de absorbância das soluções nos comprimentos de onda 455 nm e 624 nm, respectivamente.

A quantidade de cada corante adsorvido nos bagaços foi calculada através da diferença entre a quantidade de corante adicionado e a quantidade de corante em solução. A partir desses valores, foram construídas isotermas, relacionando a quantidade de corante adsorvido, em $mg_{corante} / g_{bagaço}$, com a concentração de corante em solução, após a incubação, em mg/mL. As isotermas foram construídas para cada corante, em cada um dos bagaços testados.

A medida da celulose superficial acessível foi calculada através da razão entre a quantidade máxima de corante laranja adsorvido, e a quantidade máxima de corante azul adsorvido (DO/DB), considerando o primeiro patamar de adsorção, uma vez que corantes *Direct* podem adsorver em dupla camada (KHALFAOUI et al., 2014).

4.5. Efeito de ligninas isoladas de diferentes fontes na hidrólise de holocelulose

4.5.1. Hidrólise enzimática de holocelulose na presença das amostras de lignina

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 0,402 g (massa seca) de holocelulose previamente moída a 20-mesh em moinho de facas e 0,134 g da amostra de

lignina (Indulin, KEL-HCl e SEBL-HCl). Adicionou-se em cada frasco tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, e os extratos comerciais Celluclast e Novozym 188. Duas cargas enzimáticas foram testadas: 20 mg de proteínas / g de celulose (10 FPU/g), com base no extrato Celluclast, suplementado com 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (Novozym 188); e 40 mg de proteína / g de celulose (20 FPU/g) e 40 UI de β -glicosidase / g holocelulose. O volume de tampão adicionado variou de acordo com a carga enzimática testada, de forma que o volume total de líquido em cada frasco fosse 10 mL. Os frascos foram incubados em agitador com controle de temperatura, a 50 °C, com agitação de 120 rpm. Foram retirados 250 μ L de cada frasco após 1, 2, 4 e 8 horas de hidrólise. Os rendimentos de hidrólise de celulose foram calculados de acordo com a Equação 1.

4.5.2. Hidrólise enzimática de holocelulose em meio contendo compostos aromáticos

Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 1,34 g de lignina em 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. Essa mistura foi incubada em agitador com controle de temperatura, a 50 °C, com agitação de 120 rpm, por 24 horas. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 4.637 g, por 10 minutos. A fração líquida foi coletada e a foi feita a varredura do espectro entre 240 e 400 nm em espectrofotômetro para avaliar a presença de compostos aromáticos. Esse procedimento foi feito para as três amostras de lignina (Indulin, KEL-HCl e SEBL-HCl).

Os ensaios de hidrólise enzimática foram feitos adicionando 0,402 g (massa seca) de holocelulose (20-mesh) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, Celluclast e Novozym 188, utilizando as mesmas cargas enzimáticas descritas no item 4.5.1, e solução tampão contendo os compostos aromáticos solubilizados a partir de cada amostra de lignina. O volume de tampão adicionado variou de acordo com a carga enzimática, de forma que o volume total de líquido na reação fosse 10 mL. Após 1, 2, 4 e 8 horas de hidrólise, 250 μ L foram retirados de cada frasco para posterior quantificação de açúcares. Os ensaios foram feitos em triplicata. O rendimento de hidrólise de celulose foi calculado utilizando a Equação 1.

4.6. Isolamento das ligninas dos bagaços de cana pré-tratados

O isolamento das ligninas dos bagaços tratados foi feito adaptando duas metodologias (BERLIN et al., 2006; GUERRA et al., 2006). Os bagaços tratados (30 g, massa seca) foram hidrolisados com Celluclast (130 mg de proteína / g de celulose) e Novozym 188 (120 UI de β -glicosidase / g de celulose). Além desses coquetéis enzimáticos, também foi adicionado Cellic HTec (Novozymes), como fonte de enzimas para hidrolisar a hemicelulose residual, em uma proporção de 20 mg de proteína / g de celulose. A hidrólise foi conduzida a 50 °C, 120 rpm, por 72 h, com teor de sólidos de 5%.

Realizada a hidrólise enzimática, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 60 min, o sobrenadante foi descartado e o sólido residual foi lavado com 700 mL de água destilada, seguido de nova centrifugação, nas mesmas condições. Depois de descartar a água de lavagem, o sólido foi ressuspensionado em 400 mL de tampão fosfato-salino 50 mM, pH 7,0, contendo 0,2 UI/ml de protease tipo XIV (Sigma), 40 mg/L de tetraciclina e 30 mg/L de cicloheximida. A mistura foi incubada por 12 h, a 37 °C, 120 rpm, para hidrolisar proteínas possivelmente adsorvidas no sólido. O resíduo foi lavado com 800 mL de solução NaCl 1 mol/L, centrifugado nas mesmas condições citadas acima, e lavado novamente com mais 1,6 L de água destilada, para remover resíduos de proteínas e carboidratos solúveis. O sólido residual foi seco ao ar e moído a 60-mesh.

A lignina presente no sólido residual foi extraída utilizando uma solução acidificada de dioxano em meio aquoso (dioxano/água 85:15, contendo HCl 0,01 mol/L), adicionando 200 mL de solução a 10 g de sólido residual, em balão de destilação acoplado a um condensador. A mistura foi constantemente agitada e aquecida (ponto de ebulição do azeótropo, 86 °C), sob atmosfera de argônio, para evitar oxidação da lignina extraída, por 2 h. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada, e o filtrado foi neutralizado com carbonato de sódio e concentrado em evaporador rotativo, até aproximadamente 50 mL. A solução concentrada foi adicionada gota a gota a 1,0 L de água deionizada, acidificada com HCl (pH 2,0), agitando constantemente, com agitador magnético. A suspensão foi deixada em repouso por 12 h, centrifugada a 5.000 rpm, por 60 min e o sobrenadante foi descartado. O sólido residual, a lignina extraída, foi lavado com 800 mL de água deionizada, centrifugado nas mesmas condições e liofilizado.

4.7. Medida da capacidade adsorptiva das ligninas dos bagaços pré-tratados

A capacidade das amostras de lignina de adsorver proteínas foi medida adicionando soluções de celulasas (extrato Celluclast diluído) em diferentes concentrações, à mesma quantidade de lignina (TU; PAN; SADDLER, 2009). Em tubos de microcentrífuga de 2 mL, foram adicionados 20 mg da amostra de lignina e 1,0 mL da solução de celulase (variando de 0,05 mg de proteína / mL a 0,45 mg/mL). Os tubos foram incubados a 50 °C, 120 rpm, para simular as condições de hidrólise. Após 3 h de incubação, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e a concentração de proteínas no sobrenadante foi medida pelo método da ninidrina, adaptado de Starcher (2001). A quantidade de proteína adsorvida na lignina foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína em solução antes e após incubação. Foi construído um gráfico relacionando a quantidade de proteína adsorvida na lignin (mg/g de lignina) e a concentração de proteína no sobrenadante após a incubação (mg/mL). Os dados foram ajustados no modelo de Langmuir, utilizando o programa OriginPro 9 (OriginLab), conforme descrito por Tu, Pan e Saddler (2009). O ajuste foi feito utilizando a equação 4,

$$P = \frac{P_{\max} \times K \times C}{1 + (K \times C)} \quad (4)$$

na qual P é a quantidade de proteína adsorvida por grama de lignina (mg/g), P_{max} é a quantidade máxima de proteína adsorvida na lignina (mg/g), K é a constante de Langmuir (mg/mL) e C é a concentração de proteínas não adsorvidas, no sobrenadante (mg/mL).

4.8. Medida dos grupos ácidos dos bagaços pré-tratados

Os ácidos fortes e fracos nos substratos tratados foram medidos por titulação condutimétrica (KATZ; BEATSON; SCALLON, 1984). Foram colocados 0,1 g dos bagaços (massa seca) em tubos de centrífuga de 50 mL, e a estes foram adicionados 15,0 mL de uma solução de HCl 1 mol/L. Após agitação em vórtex, a mistura foi mantida a 4 °C por 12 h. Após esse tempo, adicionou-se aproximadamente 30 mL de água deionizada e,

após agitar novamente em vórtex, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e mais 45 mL de água deionizada foram adicionados. Esse procedimento de lavagem (adição de 45 mL de água deionizada e centrifugação) foi repetido 6 vezes, cautelosamente para não haver perda de massa.

Após descartar o sobrenadante da última lavagem, a amostra de bagaço foi transferida para um béquer de 250 mL e a ela foram adicionados 50 mL de uma solução de NaCl 0,001 mol/L. A suspensão foi constantemente agitada com barra magnética e 20 µL de uma solução de HCl 0,5 mol/L foram adicionados. A mistura foi então titulada adicionando 10 µL de uma solução de NaOH 0,05 mol/L, e a cada adição a condutividade da solução foi registrada. O decréscimo no valor de condutividade após a neutralização da solução de HCl (após adição de 200 µL de NaOH) foi associado à presença de grupos ácidos fortes no bagaço. A próxima fase da curva de titulação, na qual a condutividade da solução não variou com a adição de NaOH, foi atribuída à presença de ácidos fracos no bagaço. A neutralização dos grupos ácidos, fortes e fracos, foi confirmada pelo aumento da condutividade da solução com a adição da solução de NaOH.

O cálculo quantidade de grupos ácidos nos bagaços foi feito dividindo a quantidade de NaOH, em mmoles, necessária para neutralizar os grupos ácidos fortes e fracos, pela massa de bagaço (em kg). No caso dos ácidos fortes, a quantidade de NaOH em mmoles também foi dividida pela massa de lignina nos bagaços.

4.9. Medida do efeito da adsorção improdutiva nos bagaços pré-tratados

Os experimentos de hidrólise para verificar o efeito da adsorção improdutiva foram conduzidos com Celluclast, suplementando com Novozym 188; e com Cellic CTec 3. As hidrólises dos bagaços com Celluclast foram realizadas utilizando 2,5 mg de proteína (1,25 FPU) / g de celulose (quantidade de proteína com base no extrato Celluclast), adicionando 2,5 UI de β-glicosidase do coquetel Novozym 188 / g de celulose. As hidrólises utilizando Cellic CTec3 foram conduzidas utilizando 2,5 mg de proteína / g de celulose. Em ambas as situações (com Celluclast ou Cellic CTec3), foi testada a adição de 250 mg de albumina sérica bovina (BSA) / g de celulose, 1 h antes de adicionar as enzimas, com a finalidade de

bloquear os sítios de adsorção improdutiva na lignina. Todos os experimentos foram conduzidos com bagaços lavados.

As condições de hidrólise e de análise foram as mesmas apresentadas no item 4.3. O efeito da adsorção improdutiva foi avaliado comparando os rendimentos de hidrólise da celulose dos bagaços tratados ao adicionar BSA, com a hidrólise convencional, sem adição de BSA.

4.10. Adsorção das proteínas do extrato Celluclast em amostras de lignina

Foi avaliado o perfil de adsorção das proteínas do extrato Celluclast nas ligninas extraídas dos bagaços tratados com NaOH e por explosão a vapor catalisada por SO₂. Em tubos de 2,0 mL, foram adicionados 20 mg de cada amostra de lignina. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do extrato enzimático Celluclast diluído em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, de forma que a concentração de proteína fosse 0,4 mg/mL. A mistura foi incubada em banho com agitação (50 °C, 120 rpm) por 3 h. Os ensaios foram feitos em triplicata. Como controle, a solução preparada a partir do extrato Celluclast foi incubada nas mesmas condições, sem adicionar a amostra de lignina. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi analisado quanto às atividades enzimáticas, teor de proteínas e quanto ao perfil eletroforético, por SDS-PAGE.

4.11. Adsorção das enzimas purificadas na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor

Foi avaliada a adsorção das proteínas purificadas (CBHI, EGII e β -glicosidase) na lignina extraída de bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Para realizar esses ensaios, foi necessário o preparo prévio das enzimas comerciais, pois estas se encontravam dissolvidas em sulfato de amônio 3,2 mol/L, o que poderia afetar os ensaios de adsorção. Além do sal, a β -glicosidase se encontrava estabilizada com BSA, de forma que uma purificação desta foi necessária.

A purificação da β -glicosidase foi realizada através de uma cromatografia de troca iônica, utilizando como fase estacionária a resina DEAE-Sepharose CL6B (GE Healthcare) e como fase móvel tampão acetato de sódio, 50 mmol/L, pH 4,5. As dimensões da coluna foram 1,2 cm de diâmetro e 28 cm de altura (aproximadamente 30 mL). A β -glicosidase comercial foi diluída no tampão (fase móvel) na proporção 1:1, resultando em 1,0 mL de amostra, aplicada na coluna. O fluxo utilizado foi 0,46 mL/min e frações de 1,0 mL foram coletadas. A eluição da β -glicosidase da coluna foi feita através de um gradiente de NaCl (0 – 0,5 mol/L), monitorando a presença de proteínas em cada fração por espectrofotometria (absorbância em 280 nm) e a atividade enzimática. A fração contendo a atividade de β -glicosidase foi coletada e liofilizada.

A dessalinização das proteínas purificadas foi feita utilizando um módulo de ultrafiltração com faixa de corte de 10 kDa Vivaspin (GE Healthcare). As amostras (1,0 mL) foram adicionadas nos módulos e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. Após esse tempo, foi adicionado tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 (volume suficiente para completar 1,0 mL) e uma nova centrifugação, nas mesmas condições, foi realizada. O procedimento foi repetido até que 10 mL de tampão fossem utilizados na dessalinização.

Os ensaios de adsorção das enzimas CBHI, EGII e β -glicosidase na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor foram conduzidos com cada uma das enzimas isoladamente e em mistura. Foram preparadas soluções de cada uma das enzimas em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, de forma que a concentração de proteínas fosse 0,4 mg/mL. Foi também preparada uma solução contendo as 3 enzimas, sendo que a concentração de cada uma representasse 1/3 da concentração de proteínas total. O procedimento experimental e as análises foram os mesmos descritos no item 4.10.

4.12. Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose

4.12.1. Efeito da pré-incubação dos bagaços tratados na solubilização de fenóis

Para avaliar o efeito da pré-incubação dos bagaços na solubilização de fenóis, e sua possível inibição na hidrólise enzimática, os bagaços tratados, lavados e não lavados, foram incubados nas mesmas condições de hidrólise (item 4.3), porém sem adicionar as

enzimas, por 24 h. Após esse tempo, foram adicionadas as enzimas Celluclast e Novozym 188. Foram testadas 3 cargas enzimáticas: 5 (2,5 FPU) mg/g e 5 UI/g; 10 (5 FPU) mg/g e 10 UI/g; e 20 (10 FPU) mg/g e 20 UI/g, com base no coquetel Celluclast e Novozym 188, respectivamente. Como controle, foram realizadas hidrólises sem pré-incubar os bagaços, adicionando o tampão juntamente com as enzimas.

As condições experimentais foram realizadas conforme descrito no item 4.3. Os rendimentos de conversão de celulose calculados nos experimentos com preincubação dos bagaços foram comparados com os experimentos em que não houve preincubação.

4.12.2. Efeito dos compostos solúveis nas atividades de CBHI e β -glicosidase

Os bagaços tratados não lavados foram incubados em tampão acetato de sódio, 50 mmol/L, pH 4,8, por 24 h, nas condições de hidrólise (50 °C, 120 rpm), sem adição de enzimas. A incubação foi realizada utilizando 2% e 10% de sólidos. Após esse tempo, as frações líquidas (extratos) foram separadas das frações sólidas por filtração a vácuo. O pH dos extratos foi ajustado para 4,8, com HCl ou NaOH.

Os extratos foram utilizados para diluir os coquetéis Celluclast e Novozym 188, e como substituto do tampão acetato nos ensaios de atividade CBHI e β -glicosidase.

4.12.3. Efeito dos compostos solúveis na hidrólise de celulose

Os extratos obtidos no item 4.12.2 foram utilizados na hidrólise de polpa de dissolução. As condições experimentais foram semelhantes às descritas no item 4.3, substituindo, no entanto, o tampão acetato de sódio pelos extratos obtidos através da incubação. Como controle, foi realizada a hidrólise da polpa de dissolução, utilizando tampão acetato de sódio, pH 4,8, 50 mmol/L. As cargas enzimáticas utilizadas, dos extratos Celluclast e Novozym 188, foram 2,5 (1,25 FPU) mg/g e 2,5 UI/g; e 20 (10 FPU) mg/g e 20 UI/g.

Os rendimentos de hidrólise de celulose obtidos nos controles, no tempo de 72 h, foram considerados 100%, e os rendimentos de hidrólise dos testes (utilizando os extratos), foram calculados com relação a este.

4.13. Métodos analíticos

4.13.1. Análise composicional dos bagaços de cana

A composição química dos bagaços tratados, lavados, foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Ferraz e colaboradores (2000). O método consistiu na hidrólise dos polissacarídeos com H_2SO_4 72%, à 30 °C, seguida de uma pós-hidrólise a 121 °C, em concentração mais baixa de ácido (4%), devido à adição de 79 mL de água. Após resfriamento, o material foi filtrado em filtros de placa porosa nº 3 (Schott-Duran) e a lignina insolúvel foi determinada por gravimetria. A lignina solúvel foi medida em espectrofotômetro a 205 nm (DENCE, 1992). A fração solúvel também foi analisada quanto aos monossacarídeos, provenientes da hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna HPX-87H (Bio-rad) a 45 °C, eluída com ácido sulfúrico 5 mmol/L a 0,6 mL/min. A concentração dos açúcares foi determinada utilizando um detector de índice de refração com temperatura controlada (35 °C), e as áreas do cromatograma foram convertidas em concentração utilizando curvas de calibração previamente construídas utilizando soluções padrão de glicose, xilose, arabinose e ácido acético.

4.13.2. Determinação da concentração de glicose após hidrólise enzimática

A quantidade de glicose liberada após hidrólise enzimática foi determinada por teste enzimático em microplaca, baseado na atividade da enzima glicose oxidase (BERLIN et al., 2005b). Foi preparada uma mistura adicionando 1,609 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,0; 6,25 mL de solução de glicose oxidase 20 UI/mL (Sigma); 0,125

mL de solução de peroxidase de *horseradish* 200 U/mL (Sigma) e 2,016 mL de solução de *o*-dianisidina 0,62 mg/mL (Sigma). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 50 µL da amostra a ser analisada e 50 µL da mistura. A placa foi incubada a 37 °C, sob agitação de 400 rpm, por 30 min. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de uma solução H₂SO₄ 32%, e a placa foi mantida sob mesma agitação e temperatura por mais 2 min. A absorbância da mistura foi medida em leitor de microplaca Thermomax Microplate Reader (Molecular Devices) no comprimento de onda 560 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva de calibração previamente construída (0 – 200 µg de glicose / mL).

4.13.3. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi medida por metodologia adaptada de Starcher (2001). Em tubos de microcentrífuga de 2 mL, com tampa rosqueada e com anel de vedação, foram adicionados 100 µL de amostra e 300 µL de solução HCl 9 mol/L. Os tubos foram fechados, agitados em vórtex e mantidos a 100 °C por 24 h, para que as proteínas fossem hidrolisadas. Após esse tempo, os tubos foram resfriados e centrifugados a 10.000 rpm, por 1 min. Em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (tipo Eppendorf) contendo 100 µL de NaOH 5 mol/L, foram adicionados 100 µL da amostra hidrolisada. A mistura foi agitada em vórtex e a ela foram adicionados 100 µL do reagente Ninidrina 2% (Sigma), e novamente agitada. A mistura foi incubada a 100 °C por 10 minutos, centrifugada a 10.000 rpm por 1 min, e a ela foram adicionados 500 µL de solução de etanol 50%. Após agitar em vórtex, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 560 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de proteínas utilizando uma curva de calibração previamente construída de albumina sérica bovina, BSA (0 – 800 µg de BSA / mL).

4.13.4. Determinação da concentração de fenóis totais

Em microplacas com 96 poços, foram adicionados 20 µL da amostra a ser analisada e 88 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma). A mistura foi agitada em incubadora de microplacas a 200 rpm, 25 °C, no escuro, por 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 80 µL de uma solução carbonato de sódio 7,5%. A placa foi novamente colocada na incubadora e mantida, nas mesmas condições, por 2 h. A absorbância da mistura foi medida em leitor de microplaca Thermomax Microplate Reader (Molecular Devices) no comprimento de onda 750 nm (ZHANG et al., 2006). Os valores de absorbância foram convertidos em concentração utilizando uma curva de calibração de floroglucinol previamente construída (0 – 100 µg de floroglucinol / mL).

4.13.5. Determinação das atividades enzimáticas

4.13.5.1. Celulases totais (FPA)

A atividade de celulases totais foi determinada adaptando a metodologia descrita por (GHOSE, 1987). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1 x 6 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático nas diluições de 100, 200, 300 e 400 vezes. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho a 50 °C por 60 min. Após esse tempo, foram adicionados 3,0 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 min (MILLER, 1959). Foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a mistura foi agitada. Parte desta foi coletada em tubos de microcentrifuga de 2,0 mL e centrifugada a 10.000 rpm. A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva de calibração e usados para construir um gráfico relacionando o inverso das diluições da enzima (1/diluição) com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor do inverso da diluição da enzima (eixo y) que

resultou na liberação de 2,0 mg de glicose (correspondente a 4% de conversão da celulose). Para o cálculo da atividade em FPU/mL dividiu-se 0,37 por esse valor. O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 micromol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra e o tempo de reação. O resultado obtido correspondeu à atividade de celulasas totais (FPU/mL) dos extratos enzimáticos.

4.13.5.2.Celobiohidrolase

A atividade de celobiohidrolase foi determinada adaptando a técnica descrita por Wood e Bhat (1988), que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de Avicel (celulose microcristalina) 1% (m/v) com o extrato enzimático. A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Foram adicionados em um tubo de ensaio 0,9 mL da solução de Avicel 1% e 0,1 mL do extrato enzimático (Celluclast ou enzima CBHI purificada). A mistura foi incubada a 50 °C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 min. Após o resfriamento, parte da mistura foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. O controle de reação foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva de calibração (1 – 10 μ mol glicose / mL).

4.13.5.3.Celobiohidrolase I (CBHI)

A atividade de CBHI foi medida utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (pNPC) (Sigma). Foi preparada uma solução de pNPC 10 mmol/L, adicionando a essa solução D-glucono-1,5- δ -lactona (0,5 mg/mL) para evitar a reação cruzada de β -glicosidase (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012). Foram adicionados aos poços de uma microplaca 25 μ L da solução de pNPC, 25 μ L do extrato Celluclast diluído em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, e adicionando mais 50 μ L do mesmo

tampão (o tampão foi substituído pelos extratos descritos no item 4.12.2 nos experimentos de inibição). A microplaca foi incubada a 50 °C por 30 min, 200 rpm. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão NaOH-glicina 400 mmol/L, pH 10,8. A absorbância da mistura foi medida em leitor de microplaca Thermomax Microplate Reader (Molecular Devices) no comprimento de onda 410 nm, e os valores de absorbância foram convertidos em concentração de pNP (*p*-nitrofenol) liberado utilizando uma curva de calibração previamente construída (0 – 0,5 mmol de pNP / mL).

4.13.5.4. Endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada adaptando a técnica descrita por Tanaka et al. (1981), que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de carboximetilcelulose (CMC) de média viscosidade (Sigma) com o extrato enzimático. A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Foram adicionados em um tubo de ensaio 0,9 mL da solução de CMC 0,44% e 0,1 mL do extrato enzimático (Celluclast ou enzima EGII purificada). A mistura foi incubada a 50 °C por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 min. Após o resfriamento, foi feita a leitura da absorbância da mistura em espectrofotômetro a 540 nm. O controle de reação foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva de calibração (1 – 10 µmol glicose / mL).

4.13.5.5. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com base na metodologia de (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987), empregando *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (SIGMA) com substrato. As reações foram conduzidas a 50°C, adicionando-se uma alíquota de 0,4 mL de solução 0,1% pNPG, preparado em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, a 0,1 mL do extrato enzimático (Novozym 188 ou β -glicosidase

purificada) diluído no mesmo tampão. No caso dos ensaios de inibição, o tampão foi substituído pelos extratos descritos no item 4.12.2. Após 15 minutos, foi adicionado 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%, para parar a reação, e a absorbância foi medida a 410 nm. O controle de reação foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, a solução de bicarbonato antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de pNP (*p*-nitrofenol) liberado utilizando uma curva de calibração previamente construída (0 – 0,5 mmol de pNP / mL).

4.13.6. SDS-PAGE

4.13.6.1. Preparo do gel e corrida

A eletroforese em gel de poliacrilamina contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os géis foram preparados misturando as soluções mostradas na tabela 1, adicionando o persulfato de amônio e o TEMED por último. Primeiramente, foi preparado o gel separador e, após sua polimerização, foi preparado o gel concentrador.

O preparo das amostras foi feito levando em consideração a quantidade de proteína a ser aplicada no gel. Procurou-se aplicar a menor quantidade de proteína, que resultasse em bandas visíveis e evidenciasse as pequenas diferenças nas quantidades de cada proteína individualmente. Aproximadamente 5 µg de proteínas foram aplicadas em cada canaleta do gel. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (2,0 mL de Tris-HCl 1 mol/L, pH 6,8; 4,0 mL de SDS 10%; 2,0 mL de β-mercaptoetanol; 5,0 mL de glicerol; e 10 mg de azul de bromofenol), na proporção 1:2. O gel foi inserido na cuba eletroforética Ruby Complete (GE Healthcare) e o tampão de corrida (Tris 0,025 mol/L; glicina 0,25 mol/L; SDS 0,1%; pH ajustado para 8,3 com HCl) foi adicionado. As corridas foram conduzidas em temperatura ambiente, com diferença de potencial 200 V, utilizando a fonte de corrente contínua Electrophoresis Power Supply – EPS 301 (GE Healthcare).

Tabela 1: Soluções utilizadas no preparo do gel de eletroforese em condições desnaturantes.

Componentes	Quantidade (mL)	
	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4,5%)
Água	8,2	6,8
Tampão Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8	-	1,25
Tampão Tris-HCl 1,5 mol/L, pH 8,8	6,3	-
SDS 10%	0,25	0,1
Bis/acrilamida (30%)	10,0	1,7
Persulfato de Amônio 10%	0,25	0,1
TEMED	0,01	0,01

4.13.6.2. Revelação e análise do gel

A revelação das proteínas nos géis de poliacrilamida foi realizada utilizando nitrato de prata, conforme metodologia proposta por Blum, Beier e Gross (1987).

Terminada a corrida, os géis foram embebidos em solução fixadora (metanol, ácido acético e água, na proporção 50:12:38), permanecendo nesta por pelo menos 2 h. Passado esse tempo, os géis foram lavados com etanol 50% (3 lavagens, de 8 min cada). Depois de descartar a última solução de etanol de lavagem, os géis foram imersos em solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 min e lavados, em seguida, com água destilada (3 lavagens, de 20 s cada). Os géis foram então incubados em 100 mL de uma solução de nitrato de prata 0,2%, contendo 37 µL de formaldeído 37%. Os géis foram novamente lavados com água destilada (3 lavagens, de 20 s cada) e imersos em solução reveladora (100 mL de solução carbonato de sódio 4%, contendo 2 mL da solução de tiosulfato de sódio e 50 µL de formaldeído 37%) até que as bandas proteicas fossem visualizadas. A interrupção do processo de revelação foi realizado adicionando 3,0 mL de ácido acético.

Os géis corados foram analisados no ImageScanner III (GE Healthcare) e a quantificação das densidades de bandas foi realizada utilizando o *software* LabScan (Ge Healthcare).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento e caracterização dos bagaços de cana

Os bagaços foram pré-tratados em condições ácida ou alcalina, conforme descrito no item 4.2. O teor de celulose foi o que menos variou em função dos pré-tratamentos, entre 50,5%, no bagaço pré-tratado com NaOH, e 56,1%, no bagaço pré-tratado por explosão a vapor catalisada por SO₂ (Tabela 2). Observou-se o enriquecimento da fração celulósica com relação ao bagaço original, devido à solubilização parcial dos demais componentes. Nos pré-tratamentos alcalinos, no máximo 2,3% da celulose do bagaço de cana foram solubilizadas. Essa baixa solubilização pode ser explicada pelo fato de que, em meio alcalino, as reações de hidrólise dos polissacarídeos ocorrem em velocidades muito baixas, e a solubilização destes ocorre principalmente por reações de *peeling* (GELLERSTEDT, 2009). Já nos tratamentos ácidos, a solubilização da celulose foi maior, chegando a 13,5% no tratamento com ácido diluído, 21,7% no sulfito ácido e 21,9% no tratamento por explosão a vapor catalisada por SO₂. De fato, em meio ácido a hidrólise dos polissacarídeos é favorecida, o que explica a maior solubilização dessa fração nos bagaços de cana submetidos aos pré-tratamentos ácidos (GELLERSTEDT, 2009).

A fração solubilizada da hemicelulose do bagaço de cana, em todos os pré-tratamentos avaliados, foi maior que a da celulose. Em partes, isso pode ser explicado pela total remoção dos grupos acetila, em todos os pré-tratamentos, e pela solubilização parcial dos grupos arabinosil, que variou de 5% a 10% nos bagaços tratados em condições alcalinas, e de 80 a 90% nos bagaços submetidos aos tratamentos ácidos. Além disso, a taxa de hidrólise da xilana é maior que a da celulose, principalmente porque as regiões cristalinas da celulose dificultam o acesso dos reagentes às ligações glicosídicas (GEHLEN, 2010; HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010). Os teores de xilana nos bagaços pré-tratados com NaOH e com sulfito alcalino foram, respectivamente, 23,4% e 23,9%, ou seja, apenas 9,3% da xilana foram solubilizadas no pré-tratamento alcalino, e 12,9% no pré-tratamento sulfito alcalino. A baixa solubilização da xilana em meio alcalino é uma característica desse tipo de pré-tratamento, que mantém grande parte dos polissacarídeos na fração sólida (GELLERSTEDT, 2009; MENDES et al., 2011). No entanto, os pré-tratamentos do bagaço de cana em condições ácidas resultou em maior solubilização da

xilana, chegando à remoção quase completa no pré-tratamento por explosão a vapor (95,6%). A elevada solubilização de xilana nesse pré-tratamento, em comparação com os outros pré-tratamentos ácidos, pode ser explicada pela elevada temperatura (190 °C) e pela maior concentração do catalisador (SO₂, 3%). Os tratamentos com ácido diluído e com sulfito ácido, conduzidos a 160 °C, com 0,75% de H₂SO₄, resultaram na solubilização de 58,2% e 73,3%, respectivamente. Como resultado, os bagaços pré-tratados em meio ácido apresentaram teores de xilana variáveis, chegando a um valor mínimo de 1,7% no bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

Apesar de todos os tratamentos terem resultado na solubilização da lignina, o tratamento alcalino resultou na solubilização de 26,3% da lignina, e o tratamento ácido solubilizou apenas 14,6% da lignina. De fato, os tratamentos em condições ácidas favorecem a solubilização da fração hemicelulósica, enquanto que os tratamentos alcalinos têm como objetivo a solubilização da lignina (ALVIRA et al., 2010; GELLERSTEDT, 2009). Tratamentos em condições ácidas favorecem reações de condensação de lignina, aumentando a sua massa molar e diminuindo sua solubilidade. Já as reações em meio alcalino favorecem a sua solubilização, uma vez que resultam na despolimerização da mesma (FENGEL; WEGENER, 1983a; GELLERSTEDT, 2009). A utilização de sulfito aumentou a solubilização da lignina em meio alcalino de 26,3% no tratamento com NaOH, para 48,8% no tratamento sulfito alcalino, evidenciando a importância do sulfito como agente de deslignificação. Esse aumento se deve ao ataque nucleofílico dos íons sulfito aos carbonos α e β que, somado à fragmentação da lignina que ocorre em meio alcalino, resulta no aumento da solubilização dessa fração (GELLERSTEDT, 2009). Em meio ácido, a adição de íons sulfito também aumentou a solubilização de lignina, de 14,6% no tratamento ácido diluído, para 25,4% no tratamento sulfito ácido. Assim como ocorre em meio alcalino, os íons sulfito reagem com o carbono α da lignina, competindo com as reações de condensação que normalmente ocorrem em meio ácido. Além disso, a sulfonação da lignina aumenta a sua hidrofilicidade e, conseqüentemente, sua solubilidade em meio aquoso (GELLERSTEDT, 2009). O tratamento por explosão a vapor, também em meio ácido, foi o menos eficiente na solubilização da lignina, chegando a 10%. Como resultado, os bagaços pré-tratados com ácido diluído ou sulfito ácido apresentam 28% de lignina residual e o bagaço gerado do tratamento por explosão a vapor apresentou o maior teor de lignina (35,6%). Os bagaços tratados com NaOH e sulfito alcalino apresentaram 20,3% e 15,0% de lignina, respectivamente.

Tabela 2: Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar submetidos aos diferentes pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Composição química dos bagaços (%)						Rendimento de sólidos (%)	Remoção dos componentes do bagaço durante os pré-tratamentos (%)			
	Extrativos	Arabinosil	Glucana	Xilana	Acetil	Lignina		Arabinosil	Glucana	Xilana	Lignina
NaOH (5%)	-	2,2	50,5	23,4	N / d	20,3	87,3	5,0	0,0	9,3	26,3
Na ₂ SO ₃ /NaOH (10% / 5%)	-	2,2	52,2	23,9	N / d	15,0	81,8	10,0	2,3	12,9	48,8
H ₂ SO ₄ (0,75%)	-	0,6	53,1	13,2	N / d	28,8	71,1	80,0	13,5	58,2	14,6
NaHSO ₃ /H ₂ SO ₄ (9% / 0,75%)	-	0,6	54,0	9,5	N / d	28,3	63,3	80,0	21,7	73,3	25,4
Explosão a vapor / SO ₂ (3,0%)	-	0,3	56,1	1,7	N / d	35,6	60,8	90,0	22,0	95,6	10,0
Bagaço não tratado	4,5	2,0	43,7	22,5	2,9	24,0	-	-	-	-	-

(-) Análise não realizada; (N / d) não detectado.

As diferenças nas composições químicas dos bagaços pré-tratados, mostradas na tabela 2, foram importantes para evidenciar o papel da lignina residual na recalcitrância do sólido pré-tratado, como será discutido adiante.

5.2.Digestibilidade dos bagaços pré-tratados

A medida dos rendimentos de hidrólise de celulose utilizando diferentes cargas de enzima fornece informações a respeito da digestibilidade dos substratos. Essa abordagem experimental foi utilizada para comparar a acessibilidade da celulose dos bagaços submetidos a diferentes pré-tratamentos. Caso o aumento da carga enzimática não resulte em aumento no rendimento de hidrólise da celulose, possivelmente o acesso das enzimas às moléculas de celulose esteja limitado, devido à presença de lignina e hemicelulose. Por outro lado, caso a celulose do substrato esteja acessível, valores maiores de rendimento de hidrólise de celulose serão obtidos com o aumento da carga de enzima (KUMAR et al., 2012).

Os bagaços pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática, utilizando Celluclast, como fonte de celulasas, e Novozym 188, como suplemento de β -glicosidase. A concentração de proteínas variou de 2,5 a 30 mg/g de celulose, valor calculado apenas a partir das proteínas presentes no extrato celulolítico, no caso, Celluclast, e por isso a quantidade de proteínas devido à adição do extrato Novozym 188 foi desconsiderada. As cargas enzimáticas, com base em FPA (atividade de papel de filtro), foram 1,25; 2,5; 5; 10 e 15 FPU/g de celulose, com o extrato Celluclast, e a suplementação com Novozym 188 variou, de forma que 2 UI de β -glicosidase foram adicionadas para cada FPU. Os resultados estão mostrados na figura 13.

Figura 13: Rendimento de hidrólise de celulose (72 h) dos bagaços pré-tratados, utilizando Celluclast como fonte de celulases e suplementado com β -glicosidase (Novozym 188). As cargas de proteínas/g de celulose, correspondente apenas à Celluclast foram: (■) 2,5 mg/g; (■) 5 mg/g; (■) 10 mg/g; (■) 20 mg/g; e (■) 30 mg/g. Os desvios foram calculados a partir dos dados gerados pelas triplicatas de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

Os bagaços pré-tratados com NaOH e ácido diluído (H₂SO₄) apresentaram valores de rendimento de hidrólise de celulose inferiores a 40%, mesmo ao utilizar 30 mg de proteína / g de celulose. Além disso, o aumento do rendimento de hidrólise nesses substratos não foi proporcional ao aumento da carga de enzima, principalmente de 20 mg/g para 30 mg/g, nos quais valores semelhantes de conversão de celulose foram observados, indicando que a acessibilidade da celulose nesses substratos é limitada.

O bagaço pré-tratado por sulfito ácido apresentou digestibilidade superior à dos bagaços mencionados acima, atingindo 51% de rendimento de hidrólise de celulose na carga enzimática máxima testada. A maior digestibilidade desse bagaço, quando comparada à digestibilidade do bagaço pré-tratado com ácido, pode estar relacionada à maior solubilização de lignina e de hemicelulose nesse tratamento.

Os bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (Na₂SO₃/NaOH) e por explosão a vapor catalisada por SO₂ apresentaram as maiores digestibilidades enzimáticas dentre os substratos testados. Ao utilizar carga enzimática de 20 mg/g, a hidrólise do bagaço pré-tratado por sulfito alcalino chegou a 70%, e no bagaço pré-tratado por explosão a vapor, a 85%. O aumento da carga enzimática para 30 mg/g resultou em 85% de conversão da celulose do bagaço tratado com sulfito alcalino e 92% no bagaço pré-tratado por explosão

a vapor, evidenciando a elevada digestibilidade desses substratos. A digestibilidade superior do bagaço pré-tratado por explosão a vapor é um indicativo de que este seja o substrato com celulose mais acessível, mesmo apresentando o maior teor de lignina. Kristensen e colaboradores (2008) concluíram que a realocização da lignina é um fator importante para diminuir a recalcitrância do material pré-tratado, mesmo que a remoção desse componente seja baixa. A alteração topoquímica do bagaço pode levar a um aumento da acessibilidade da celulose, o que pode ter ocorrido no bagaço pré-tratado por explosão a vapor, resultando no aumento da digestibilidade. No entanto, ainda comparando os dois bagaços menos recalcitrantes, ao utilizar baixas cargas enzimáticas (2,5 mg/g e 5 mg/g), a conversão de celulose foi maior no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, indicando que outros fatores, além da acessibilidade, limitam a hidrólise do bagaço tratado por explosão a vapor ao utilizar menos enzima.

5.3. Determinação da celulose superficial acessível dos bagaços de cana

Os bagaços obtidos a partir dos diferentes pré-tratamentos foram adicionados a soluções contendo os corantes: laranja (Direct Orange) e azul (Direct Blue) para realizar uma avaliação da área superficial de celulose, conforme metodologia proposta por Simons (1950) e adaptada por diversos autores (CHANDRA; SADDLER, 2012; CHANDRA et al., 2008, 2009; YU; MINOR; ATALLA, 1995). A metodologia baseia-se na propriedade do corante laranja de se ligar com maior afinidade à celulose que o corante azul. Além disso, por apresentar raio hidrodinâmico semelhante ao das celulasas, o corante laranja se liga em sítios nos quais as celulasas poderiam se ligar. Já o corante azul, devido ao seu tamanho menor, se liga em regiões da celulose às quais o corante laranja não tem acesso (YU; MINOR; ATALLA, 1995). Dessa forma, medindo a razão entre a quantidade dos corantes adsorvidos (DO/DB) aos substratos, é possível inferir sobre a celulose superficial acessível em cada um deles (ARANTES; SADDLER, 2011). A tabela 3 mostra as quantidades de corantes adsorvidos nos substratos e a razão entre eles.

Tabela 3: Corantes Direct Orange (DO) e Direct Blue (DB) adsorvidos nos substratos após 6 horas de incubação à 70 °C, e a razão entre eles (celulose superficial acessível).

Pré-tratamento	DO adsorvido no substrato (mg/g)	DB adsorvido no substrato (mg/g)	DO/DB
NaOH	18,35	26,41	0,69
Na ₂ SO ₃ /NaOH	24,27	21,19	1,14
H ₂ SO ₄	17,38	24,9	0,69
NaHSO ₃ /H ₂ SO ₄	19,84	25,43	0,78
Explosão a vapor/SO ₂	23,92	22,65	1,05

Nos bagaços que se mostraram mais recalcitrantes à ação das celulasas (tratados com NaOH, H₂SO₄, NaHSO₃/H₂SO₄), a quantidade de corante azul adsorvido foi maior que a do corante laranja, indicando que os poros que garantiram acesso à celulose nesse substrato eram de tamanho inferior ao do corante laranja. Nos substratos pré-tratados com Na₂SO₃/NaOH, e por explosão a vapor, a quantidade de corante laranja adsorvido foi maior que a do corante azul, confirmando que a celulose desses substratos estava mais exposta (Figura 13).

Maiores valores de DO/DB estão relacionados a substratos nos quais a celulose está mais exposta, sendo mais susceptível ao ataque das celulasas. De fato, os substratos menos recalcitrantes apresentaram razão DO/DB mais elevada, chegando a 1,14 no bagaço tratado com sulfito alcalino e 1,05 no bagaço tratado por explosão a vapor. Os bagaços mais recalcitrantes, tratados com NaOH e H₂SO₄, nos quais os rendimentos de hidrólise não passaram de 40%, a razão DO/DB foi 0,69, em ambos. O bagaço tratado com sulfito ácido, com recalcitrância intermediária, apresentou razão DO/DB de 0,78. Chandra e Saddler (2012) ressaltam a dificuldade de comparação dos dados obtidos para a razão DO/DB com dados da literatura, uma vez que há variações em diferentes lotes dos corantes, e também no preparo da solução do corante laranja, que deve ser filtrado de forma adequada. No entanto, como os corantes utilizados nesse experimento foram os mesmos, é possível comparar os bagaços quanto aos seus valores de celulose superficial acessível.

Para avaliar o efeito da acessibilidade dos substratos na hidrólise enzimática, a celulose superficial acessível (razão DO/DB) foi correlacionada com o rendimento de hidrólise de celulose em 72 h de cada um dos bagaços, em todas as cargas enzimáticas testadas (Figura 14). Diversos trabalhos utilizam essas correlações, como uma forma de

estimar o efeito da acessibilidade dos substratos na hidrólise enzimática da celulose (ARANTES; SADDLER, 2011; BRIENZO et al., 2014; CHANDRA; SADDLER, 2012; CHANDRA et al., 2008). Com exceção da condição em que baixa carga enzimática foi utilizada (2,5 mg/g, figura 14a), os rendimentos de hidrólise de celulose correlacionaram bem com a celulose superficial acessível dos bagaços, com valores de R^2 superiores a 0,83. Esse resultado evidencia a importância da acessibilidade da celulose na digestibilidade do material. Os bagaços tratados com sulfito alcalino e por explosão a vapor apresentaram altos valores de celulose superficial acessível, o que refletiu na alta digestibilidade. O tratamento sulfito alcalino tem como característica a solubilização da lignina, o que deve ter contribuído para o aumento da acessibilidade do bagaço pré-tratado. Já o tratamento por explosão a vapor, mesmo não visando à solubilização da lignina, resulta na sua realocação, o que também pode contribuir para o aumento da acessibilidade das celulasas às fibras de celulose (KRISTENSEN et al., 2008; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). O bagaço pré-tratado com sulfito alcalino foi o que apresentou o menor teor de lignina, mas uma alta concentração de xilana (Tabela 2). Mesmo presente em grande quantidade no bagaço pré-tratado por explosão a vapor (35,6%), a lignina não representou um empecilho à hidrólise enzimática, ao utilizar elevadas cargas de enzima, uma vez que não obstruiu o acesso das celulasas às moléculas de celulose. É provável que a alta remoção de xilana do bagaço pré-tratado por explosão a vapor também tenha aumentado a acessibilidade da celulase neste material.

No entanto, não se obteve uma boa correlação entre a acessibilidade da celulose, medida pelos corantes, e o rendimento de hidrólise quando se usou uma baixa carga enzimática. O baixo valor de R^2 , obtido no ensaio com 2,5 mg de Celluclast, evidencia que, quando a quantidade de enzima utilizada é baixa, outros fatores, como a adsorção improdutiva e inibição por compostos solúveis estejam limitando a hidrólise enzimática da celulose. Kumar e colaboradores (2012) mostraram que ao hidrolisar a celulose de álamo tratado por explosão a vapor com baixa carga enzimática (5 FPU/g de celulose, equivalente à 10 m/g) a adsorção improdutiva contribuiu para diminuir o rendimento de conversão da celulose em aproximadamente 50%. Essa inibição foi contornada pelo aumento da carga enzimática.

Figura 14: Rendimentos de hidrólise de celulose dos substratos em função da celulose superficial acessível (DO/DB), variando a carga enzimática (quantidade de proteína adicionada) com base no extrato Celluclast: (a) 2,5 mg/g; (b) 5 mg/g; (c) 10 mg/g; (d) 20 mg/g; (e) 30 mg/g. Em todos os ensaios houve suplementação com Novozym 188.

Fonte: arquivo pessoal.

O aumento da acessibilidade, seja pela remoção de lignina ou pela sua realocação, foi suficiente para resultar na conversão efetiva da celulose (valores superiores a 80%), o que indica que limitação da acessibilidade seja o principal efeito limitante da lignina na hidrólise enzimática da celulose. No entanto, os rendimentos

satisfatórios de conversão de celulose, bem como as boas correlações entre esses valores e a celulose superficial acessível, foram obtidos utilizando cargas de enzima consideradas altas para propósitos comerciais (HUMBIRD et al., 2011), evidenciando que, ao utilizar baixas cargas enzimáticas, outros fatores além da acessibilidade exercem influência na conversão enzimática da celulose. Esses fatores serão discutidos mais adiante nesse trabalho.

5.4. Hidrólise enzimática dos bagaços de cana com Cellic CTec3

Os bagaços pré-tratados utilizados neste trabalho apresentaram grande diferença no conteúdo de xilana, sendo que o tratamento sulfito alcalino foi o que resultou em um bagaço com teor de xilana mais elevado, em comparação com os outros tratamentos testados. É sabido que a xilana residual do bagaço pré-tratado, assim como a lignina, pode limitar a acessibilidade das enzimas à celulose (CORTEZ et al., 2014; HU; ARANTES; SADDLER, 2011). Como mostraram Hu, Arantes e Saddler (2011), a adição de xilanases aos coquetéis celulolíticos resulta em aumentos nos rendimentos de conversão de celulose em substratos que contenham xilana residual. O extrato enzimático Celluclast contém atividade de xilanase, como reportado por Mendes e colaboradores (2011). No entanto, a falta de enzimas acessórias para a hidrólise da hemicelulose nesse coquetel pode comprometer a hidrólise em substratos ricos em xilana (GOURLAY et al., 2013; HU; ARANTES; SADDLER, 2011).

Na tentativa de diminuir o efeito da xilana na hidrólise da celulose, foi utilizado o extrato enzimático Cellic CTec3, o mais recente coquetel disponibilizado pela empresa Novozymes (Dinamarca), rico em celulasas, xilanases e enzimas acessórias (LI et al., 2013). A hidrólise foi realizada utilizando a mesma carga enzimática, baseada no teor de proteína, utilizada com o extrato Celluclast, 2,5 mg de proteína / g de celulose. Os rendimentos de hidrólise da celulose dos bagaços após 72 h estão mostrados na figura 15.

Figura 15: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, utilizando Celluclast e Novozym 188 (■) e Cellic CTec3 (■), ambas com 2,5 mg de proteína / g de celulose. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

Em todos os bagaços foram observadas diferenças estatísticas (teste Tukey, 5% de significância) entre os rendimentos de hidrólise de celulose após 72 h, utilizando Celluclast e Cellic CTec3, evidenciando a maior capacidade hidrolítica desse coquetel. No entanto, nos bagaços nos quais a celulose se encontra menos acessível (tratados com NaOH, H₂SO₄ e NaHSO₃/H₂SO₄) e no bagaço com baixo teor de xilana (tratado por explosão a vapor) a melhora não passou de 10% ao utilizar o coquetel Cellic CTec3. Essa é uma evidência de que nos bagaços com baixa acessibilidade da celulose e com alto teor de xilana, a lignina parece ser a principal barreira ao acesso das enzimas, uma vez que a presença das enzimas com potencial para hidrolisar a hemicelulose residual não resultou em grandes diferenças na conversão de celulose. No bagaço tratado por explosão a vapor, no qual o teor de xilana é quase nulo, também não foi observada diferença expressiva.

No entanto, no bagaço tratado com sulfito alcalino, que apresentou baixo teor de lignina residual e ainda alto grau de sulfonação dessa lignina, a melhora no rendimento de conversão de celulose chegou a 37,2% ao utilizar o extrato Cellic CTec3. Esse resultado mostrou que, uma vez que a lignina residual não limite a acessibilidade, e nem exerça uma forte influência negativa na hidrólise através da adsorção improdutiva, a presença de enzimas acessórias no coquetel enzimático é suficiente para resultar em valores elevados de conversão enzimática da celulose. De fato, esse resultado é bastante satisfatório, uma vez que foi alcançado um rendimento de conversão de 67,2% com 72 h de hidrólise,

utilizando apenas 2,5 mg de proteína / g de celulose. Humbird e colaboradores (2011), em uma análise técnico-econômica, reforçam a importância de realizar a etapa de hidrólise enzimática utilizando baixas cargas de enzima, devido ao seu alto custo de produção. Os autores projetam um cenário favorável, considerando a produção de etanol, utilizando quantidades inferiores a 20 mg de proteína / g de celulose. A hidrólise do bagaço tratado com sulfito alcalino utilizando Cellic CTec3 alcançou um valor relativamente satisfatório (aproximadamente 70% de conversão) utilizando 8 vezes menos enzima que a quantidade recomendada.

5.5. Efeito de ligninas isoladas na hidrólise enzimática da celulose

5.5.1. Redução nos níveis de hidrólise por ligninas de diferentes fontes

Foram realizados ensaios de hidrólise de holocelulose de eucalipto (polpa kraft branqueada) com os preparados enzimáticos Celluclast e Novozym 188, utilizando 4 mg de proteína (2 FPU) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose; e 20 mg de proteína (10 FPU) e 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose. A estes ensaios foram adicionadas amostras de lignina de diferentes matérias primas, a fim de avaliar a possível diminuição dos rendimentos de conversão de celulose devido à presença destas. Foram testadas lignina Kraft comercial de pinus (Indulin), lignina de licor Kraft de eucalipto precipitada com HCl e lignina de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, extraída com soda e precipitada com HCl (FERRAZ et al., 1997). No texto, estas ligninas serão citadas como Indulin, KEL-HCl e SEBL-HCl, respectivamente.

A adição de SEBL-HCl ao meio de hidrólise de holocelulose não resultou em diminuição da conversão enzimática de celulose, comparada com o controle (sem adição de lignina), independentemente da carga enzimática testada (Figura 16). As amostras de lignina Indulin e KEL-HCl diminuíram em 30% os níveis de hidrólise da celulose, utilizando 2 FPU (≈ 1 mg) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (Figura 16a).

A presença de lignina no meio influenciou negativamente a hidrólise da celulose em baixa carga enzimática, com exceção da amostra SEBL-HCl. Como nesses ensaios a lignina não estava associada quimicamente aos polissacarídeos, acredita-se que não tenha

havido limitação da acessibilidade das enzimas hidrolíticas por esse componente. É possível inferir que a redução dos níveis de hidrólise tenha sido causada pela adsorção improdutiva das celulasas na lignina ou pela inibição das celulasas causada por compostos aromáticos liberados no decorrer da hidrólise. Berlin e colaboradores(2005) observaram diferenças de até 10% na conversão de celulose após 30 min de hidrólise, utilizando extratos enzimáticos de *Trichoderma sp.* e *Penicillium sp.*, após adicionar amostras de lignina isoladas de pseudotsuga (*Douglas-fir*) e álamo. Nesse trabalho, os pesquisadores quantificaram a adsorção das enzimas às amostras de lignina e concluíram que a redução dos níveis de hidrólise foi causada pela diminuição da concentração de enzimas livres.

Em outro trabalho do mesmo grupo, Nakagame, Chandra e Saddler (2010) mostraram diferenças na capacidade adsortiva de 12 amostras de lignina e os efeitos causados por elas na hidrólise de Avicel. A diminuição dos níveis de hidrólise variou, dependendo da fonte de lignina, do pré-tratamento e do método de extração. Independentemente do pré-tratamento ou da forma de extração, as amostras de lignina de forragem de milho não afetaram a hidrólise de Avicel. Da mesma forma, a hidrólise enzimática da holocelulose não foi influenciada negativamente pela lignina extraída de bagaço de cana-de-açúcar (SEBL-HCl). Vale ressaltar que tanto o milho quanto a cana-de-açúcar são gramíneas e a provável semelhança estrutural entre as ligninas pode ser a explicação para os resultados obtidos neste trabalho.

O aumento da carga enzimática, de 2 FPU e 4 UI de β -glicosidase/g de holocelulose, para 10 FPU e 20 UI de β -glicosidase/g foi suficiente para eliminar a influência negativa da lignina (Figura 16b). Nessa condição, a conversão de celulose do controle foi a mesma daquela na presença das ligninas. Nakagame, Chandra, Saddler (2010) também observaram o mesmo efeito, aumentando a carga enzimática para 20 FPU e 40 CBU/g de Avicel.

Figura 16: Conversão enzimática de celulose de holocelulose (polpa) de eucalipto com adição de amostras de lignina, utilizando 2 FPU (≈ 1 mg de proteína) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (a); e 10 FPU (≈ 5 mg de proteína) e 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (b). ($\diamond$) Controle; ($\times$) SEBL-HCl; ($\triangle$) KEL-HCl; ($\blacksquare$) Indulin.

Fonte: arquivo pessoal.

Outro fator a ser considerado em uma reação de hidrólise enzimática na presença de ligninas extraídas por diferentes processamentos é a variação nas características químicas das mesmas. Nakagame e colaboradores (2011a) reportaram uma correlação positiva entre

a quantidade de grupos carboxílicos em amostras de lignina isoladas e a eficiência da hidrólise de Avicel na presença dessas, sugerindo que a adsorção da lignina possa ser diminuída com o aumento da hidrofilicidade das amostras, provocada pela presença dos grupos carboxílicos. Os autores mostraram que nas amostras de lignina extraídas de forragem de milho, o teor de grupos carboxílicos foi maior que nas ligninas de outras fontes, sugerindo que esse tenha sido o motivo para a menor adsorção das enzimas em ligninas de gramíneas. No entanto, deve ser levado em consideração que a adsorção é um fenômeno de superfície, e a área superficial das amostras de lignina pode ter influência significativa nos ensaios de adsorção. Como a área superficial das amostras de lignina testadas no presente trabalho não foi medida, a maior concentração de grupos carboxílicos de gramíneas pode não ser a única explicação para os resultados observados.

Na tentativa de separar os efeitos de adsorção improdutiva e da inibição por compostos aromáticos solúveis, as amostras de lignina foram incubadas por 24 h em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A fração líquida (extratos aquosos) foi separada e o espectro de absorção obtido de cada amostra pode ser observado na figura 17. Para realizar a varredura do espectro, os extratos de Indulin e KEL-HCl foram diluídos 20 vezes, enquanto que a amostra de SEBL-HCl foi diluída apenas 2 vezes.

Em todos os extratos analisados, pôde ser observada a presença de compostos aromáticos solúveis, evidenciada pela intensa absorção em 280 nm. A absorbância do extrato de SEBL-HCl diluído 2 vezes foi 0,952. No entanto, os demais extratos foram diluídos 20 vezes e a absorbância dos extratos de Indulin e de KEL-HCl foram, respectivamente, 0,900 e 0,791, o que indica que a concentração de compostos aromáticos dissolvidos nesses dois extratos é aproximadamente 10 vezes maior que no extrato de SEBL-HCl.

Figura 17: Espectro de absorção da fração líquida das amostras de lignina incubadas por 24 horas em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. (—) Extrato aquoso de SEBL-HCl, diluído 2 vezes; (—) extrato aquoso de Indulin diluído 20 vezes; extrato aquoso de KEL-HCl diluído 20 vezes (—).

Fonte: arquivo pessoal

Os ensaios de hidrólise da holocelulose de eucalipto foram realizados na presença desses extratos, como alternativa ao tampão de hidrólise (tampão acetato de sódio, pH 4,8, 50 mM). A concentração de aromáticos não foi igualada, através de diluições, pois a intenção dos experimentos foi avaliar a influência dos aromáticos liberados pela quantidade de lignina testada no ensaio. Mesmo com as diferenças apresentadas nos espectros de absorção, todos os extratos mostraram considerável grau de inibição das celulasas (Figura 18).

Na carga menor de enzima, o extrato de KEL-HCl apresentou o maior grau de inibição, diminuindo o rendimento de hidrólise da celulose de 17,1% para 9,7%. Dentre os extratos de lignina testados, o SEBL-HCl foi o menos inibitório para a ação das enzimas, diminuindo o rendimento de hidrólise em 2,6% (Figura 18a). O aumento da carga enzimática reduziu em parte o grau de inibição causado pelos compostos solubilizados a partir das amostras de lignina, porém não foi eficiente em superar totalmente a inibição em nenhuma das condições testadas (Figura 18b). Esse resultado mostra a capacidade inibitória dos compostos aromáticos na hidrólise enzimática da celulose. Entretanto, é necessário avaliar se a solubilização dos compostos aromáticos provenientes da lignina

depende do tempo de incubação. Neste caso, a hidrólise rápida da celulose, favorecida em substratos com maior acessibilidade à celulose, pode ser uma forma de contornar a inibição pelos compostos aromáticos liberados da lignina.

Figura 18: Conversão enzimática de celulose de holocelulose (polpa) de eucalipto utilizando extratos das amostras de lignina como tampão de hidrólise, testando duas cargas enzimáticas: 2 FPU (≈ 1 mg) e 4 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (a); e 10 FPU (≈ 5 mg) e 20 UI de β -glicosidase / g de holocelulose (b). ($\blacklozenge$) Controle; ($\blacksquare$) SEBL-HCl; ($\times$) KEL-HCl; ($\blacktriangle$) Indulin.

5.5.2. Isolamento de ligninas dos bagaços de cana pré-tratados

Amostras de lignina foram isoladas dos bagaços pré-tratados por hidrólise com alta carga de enzimas, incluindo celulasas e hemicelulasas (Celluclast: 65 FPU / g celulose; Novozym 188: 120 UI / g celulose; Cellic HTec: 20 mg proteínas / g celulose), seguida da extração, utilizando uma solução de dioxano:água (85:15) e acidólise branda (BERLIN et al., 2006; GUERRA et al., 2006). Os rendimentos de extração estão mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Rendimento de extração da lignina dos bagaços de cana pré-tratados.

Pré-tratamento do bagaço	Massa seca inicial (g)	Massa seca após hidrólise enzimática (g)	Massa seca após extração e precipitação (g)	Rendimento % ($\text{g}_{\text{lignina}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)	Rendimento % ($\text{g}_{\text{lignina}}/\text{g}_{\text{lignina}}$ inical)
NaOH	30,0	13,0	0,8040	2,7	13,2
Na ₂ SO ₃ /NaOH	16,0	8,6	0,8024	5,0	33,4
H ₂ SO ₄	30,0	10,0	1,3032	4,3	15,1
NaHSO ₃ /H ₂ SO ₄	30,0	10,0	1,3606	4,5	16,0
Explosão a vapor/SO ₂	30,0	11,0	2,8480	9,5	26,7

Como a metodologia de extração envolve uma etapa de digestão dos polissacarídeos com enzimas hidrolíticas, era de se esperar que o rendimento de extração fosse maior nos bagaços menos recalcitrantes. De fato, foram extraídas 33,4% da lignina do bagaço tratado por sulfito alcalino e 26,7% da lignina do bagaço tratado por explosão a vapor. O rendimento de extração da lignina dos demais materiais variou de 13,2% a 16,0%. Guerra e colaboradores (2006) mostraram que é possível obter rendimentos maiores de extração, resultando, no entanto, em amostras de lignina menos representativas. Nas condições definidas como ótimas para a extração, mantendo a integridade da lignina de *Picea abies* não tratado, foram observados rendimentos em torno de 20%. Nakagame e colaboradores (2011), utilizando metodologia semelhante para a extração de lignina de álamo pré-tratado por explosão a vapor, obtiveram rendimentos de 10,9% a 19,8%, dependendo da severidade do pré-tratamento.

5.5.3. Grupos ácidos dos bagaços pré-tratados

Os pré-tratamentos podem incorporar ou expor grupos ácidos na estrutura dos materiais lignocelulósicos. A presença de grupos ácidos fracos nas frações polissacarídicas e também na lignina é atribuída a ácidos carboxílicos. Já os ácidos fortes presentes na lignina sulfonada referem-se a grupos sulfônicos (KATZ; BEATSON; SCALLON, 1984). Através da medida de condutividade, foi possível identificar os dois tipos de grupos ácidos em alguns dos bagaços e a soma dos ácidos fracos e fortes foi reportada como ácidos totais (Figura 19).

Figura 19: Curva de titulação condutimétrica do bagaço tratado por sulfito alcalino.

Fonte: arquivo pessoal.

A concentração de grupos ácidos totais variou entre os bagaços pré-tratados, e foi maior nos bagaços processados em condições alcalinas. No bagaço tratado com NaOH e sulfito alcalino determinou-se 35,7 mmol de grupos ácidos/kg e 78,5 mmol/kg, respectivamente (Figura 20a). Nos bagaços submetidos a tratamentos ácidos, a quantidade de grupos ácidos foi comparativamente menor, chegando a 20,6 mmol/kg no bagaço tratado com H_2SO_4 , 25,9 mmol/kg no bagaço tratado com $NaHSO_3/H_2SO_4$, e 21,4 mmol/kg no bagaço tratado por explosão a vapor.

Nos bagaços tratados com sulfito alcalino, sulfito ácido e explosão a vapor foram detectados ácidos fortes. Como os ácidos fortes se referem aos grupos sulfônicos, presentes na lignina, foi construído outro gráfico relacionado a quantidade desses ácidos fortes com a

quantidade de lignina nos bagaços (Figura 20b). O bagaço tratado com sulfito alcalino apresentou maior grau de sulfonação da lignina, com 218 mmols de grupos ácidos/kg de lignina. O tratamento sulfito ácido resultou em 42,8 mmol/kg de lignina e o bagaço tratado por explosão a vapor apresentou menor grau de sulfonação da lignina residual, com apenas 13,9 mmols de grupos ácidos / kg. Nesse tratamento, não foram adicionados íons sulfito diretamente, mas a dissolução do SO_2 em meio aquoso resulta na formação de íons bissulfito, que agem sulfonando a lignina. No entanto, o tempo curto do tratamento por explosão a vapor (5 min) não foi suficiente para resultar na sulfonação efetiva da lignina.

Figura 20: Teor de grupos ácidos fracos (■) e fortes (■) nos bagaços pré-tratados, com relação à massa de substrato (a) e à massa de lignina (b). Apenas os ácidos fortes foram relacionados com a quantidade de lignina.

Fonte: arquivo pessoal.

5.5.4. Medida da capacidade adsortiva das ligninas dos bagaços de cana pré-tratados

A medida da capacidade adsortiva das amostras de lignina foi feita preparando soluções com concentrações crescentes de proteína (Celluclast), mantendo constante a concentração de lignina (TU; PAN; SADDLER, 2009). As curvas de adsorção obtidas estão mostradas na figura 21, e as constantes obtidas através do ajuste dos dados na isoterma de Langmuir, na tabela 5.

Figura 21: Curvas de adsorção de proteínas (Celluclast) nas amostras de lignina isoladas, mantendo constante a concentração de lignina (20 mg/mL) e variando a concentração de proteína inicial de 0,05 a 0,45 mg/mL. Cada curva representa a capacidade adsortiva de uma amostra de lignina extraída dos bagaços de cana pré-tratados com (●) NaOH; (◆) $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$; (▲) H_2SO_4 ; (▼) $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; (■) explosão a vapor.

Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 5: Parâmetros da isoterma de adsorção das proteínas do extrato Celluclast nas ligninas isoladas dos bagaços de cana pré-tratados.

Pré-tratamento do bagaço	$P_{\max}$ (mg/g)	K (mL/mg)	R^2
NaOH	17,0±11,2	1,5±0,3	0,93
Na ₂ SO ₃ /NaOH	1,6±0,4	50,8±70,3	0,63
H ₂ SO ₄	6,2±1,1	8,0±3,2	0,90
NaHSO ₃ /H ₂ SO ₄	5,8±1,5	4,2±2,1	0,91
Explosão a vapor/SO ₂	23,2±8,7	2,7±1,5	0,93

A capacidade máxima de adsorção (de proteínas) das amostras de lignina variou de 1,6 mg de proteína / g de lignina, na lignina de bagaço tratado com sulfito alcalino, a 23,2 mg/g, na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor. A lignina extraída de bagaço tratado com NaOH apresentou a segunda maior capacidade adsortiva dentre as amostras de lignina testadas, chegando a 17,0 mg/g. As amostras de lignina extraídas dos bagaços tratados com H₂SO₄ e com NaHSO₃/H₂SO₄ apresentaram capacidades adsortivas próximas, chegando a 6,2 mg/g e 5,8 mg/g, respectivamente. Tu, Pan e Saddler (2009) determinaram a capacidade adsortiva de amostra de lignina extraída de *Pinus contorta*, tratado por explosão a vapor, em celluclast e reportaram uma adsorção de 10,2 mg /g. Em outro trabalho do mesmo grupo, a capacidade adsortiva de ligninas isoladas de álamo, pré-tratado por explosão a vapor, foram ainda maiores, chegando a 82,0 mg/g. (NAKAGAME et al., 2011b)

Foi possível observar o efeito dos íons sulfito, utilizados em alguns tratamentos, na diminuição da capacidade adsortiva das amostras de lignina. Tanto em meio ácido quanto alcalino, a presença do íon sulfito aumenta a solubilização da lignina e também resulta na sulfonação da lignina residual, que permanece na fração sólida (GELLERSTEDT, 2009). Os grupos sulfônicos presentes na lignina residual são ácidos fortes e se encontram desprotonados nas condições em que os experimentos foram realizados (pH 4,8) (WANG et al., 2013). A maior parte das celulasas presentes no extrato de *T. reesei* possui ponto isoelétrico inferior a esse valor de pH (SAMMOND et al., 2014) e, consequentemente, em pH 4,8, também se encontram carregadas negativamente. Dessa forma, a carga negativa presente na lignina sulfonada pode promover a repulsão das celulasas, diminuindo a capacidade adsortiva da lignina. De fato, a utilização do sulfito no tratamento alcalino contribuiu para diminuir a capacidade adsortiva da lignina residual de 17,0 mg/g (tratamento com NaOH) para 1,6 mg/g (tratamento com Na₂SO₃/NaOH). Nos tratamentos com H₂SO₄ e NaHSO₃/NaOH, a diferença não foi tão evidente, quando

comparada com as condições alcalinas, mas ainda assim foi possível observar a diminuição da capacidade adsortiva da lignina residual, de 6,2 mg/g para 5,8 mg/g.

A grande quantidade de grupos sulfônicos na lignina de bagaço tratado com sulfito alcalino (Figura 20b) relacionou-se com a baixa capacidade adsortiva (Figura 21). Além disso, a presença de ácidos fortes no bagaço tratado com $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, quando comparada ao bagaço tratado com H_2SO_4 , reflete na diferença entre a capacidade adsortiva das ligninas destes bagaços. Apesar de terem sido detectados grupos sulfônicos na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor, o grau de sulfonação dessa lignina foi baixo, não sendo suficiente para diminuir a capacidade adsortiva desta.

5.6. Ensaio de adsorção enzimática

5.6.1. Adsorção improdutiva

Esse estudo foi feito nos bagaços pré-tratados utilizando baixa carga de Celluclast (2,5 mg de proteína / g de celulose). Para bloquear os sítios de adsorção improdutiva na lignina, adicionou-se albumina sérica bovina (BSA) ao meio de hidrólise, 1 h antes de adicionar as celulasas (KUMAR et al., 2012). O rendimento de hidrólise da celulose dos bagaços pré-tratados foi comparado nos ensaios realizados na presença e ausência de BSA (Figura 22).

A figura 22a mostra os rendimentos de hidrólise no início da reação (3h) e a figura 22b, após 72 h. Nos tempos iniciais, observou-se uma diminuição na conversão de celulose na presença de BSA, com exceção do bagaço tratado por explosão a vapor (Figura 22a). Esse efeito negativo pode ter sido causado pela elevada concentração de BSA, 100 vezes maior que a concentração de proteínas do extrato Celluclast, o que pode ter dificultado a ação das celulasas no início da hidrólise. Por outro lado, no bagaço tratado por explosão a vapor, o efeito da adição da BSA foi positivo, mesmo na hidrólise inicial, aumentando de 1,9% para 5,3%. É interessante ressaltar que a celulose superficial acessível desse bagaço foi considerada alta (razão DO/DB, tabela 3) e, ainda assim, foi o que apresentou o menor rendimento de hidrólise, sem adição de BSA, utilizando baixa carga de enzima, com 3 h de hidrólise. Essa é uma evidência do efeito negativo da adsorção improdutiva da lignina nesse bagaço, já que a adição de BSA resultou em maior

conversão enzimática da celulose, possivelmente pelo bloqueio dos sítios de adsorção na lignina.

Figura 22: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços de cana pré-tratados utilizando Celluclast e Novozym 188, na ausência de BSA (□), e com BSA(■); nos tempos de 3 h (a) e 72 h (b) de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

Após 72 h de reação, a adição de BSA à reação resultou no aumento da conversão da celulose não só do bagaço tratado por explosão a vapor, mas também dos bagaços tratados com NaOH, Na₂SO₃/NaOH. O aumento mais expressivo foi observado na hidrólise do bagaço tratado por explosão a vapor, na qual o rendimento de hidrólise aumentou 24,6 pontos percentuais, seguido do bagaço tratado com NaOH, cujo rendimento de conversão aumentou em 14,5 pontos percentuais. Como discutido anteriormente, esse aumento da conversão de celulose está relacionado à ocorrência da adsorção improdutiva

das enzimas hidrolíticas na lignina desses materiais. De fato, esses dois bagaços apresentaram ligninas com maiores capacidades adsorptivas de proteínas (figura 21), o que corrobora esse resultado. Por outro lado, não se esperava obter um aumento no rendimento de hidrólise da celulose do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino pela adição de BSA, uma vez que a lignina desse material apresentou menor capacidade adsorptiva e maior teor de grupos sulfônicos, características que minimizam a adsorção improdutiva. Ainda sim, comparativamente, o aumento observado nos rendimentos de hidrólise desse bagaço ao adicionar BSA foi menor (6,2%). Nos bagaços tratados com H_2SO_4 e $NaHSO_3/H_2SO_4$, a adição de BSA não resultou em diferenças nos rendimentos de hidrólise de celulose em 72 h, comparando as médias pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Kumar e colaboradores (2012) também observaram um resultado semelhante ao adicionar BSA à reação de hidrólise enzimática de álamo tratado por explosão a vapor, utilizando 5 FPU/g de celulose (Celluclast, suplementada com Novozym 188), condição na qual o aumento dos valores de conversão de celulose chegou a 50%. O maior aumento observado, quando comparado aos resultados obtidos no presente trabalho, deve-se, possivelmente, à maior capacidade adsorptiva de lignina de coníferas, conforme mostrado por Nakagame, Chandra e Saddler (2010).

Foi avaliado também o efeito da adsorção improdutiva utilizando o coquetel enzimático Cellic CTec3 (Figura 23). Após 3 h de hidrólise, foram observadas diferenças positivas nos valores de conversão de celulose após a adição de BSA nos bagaços tratados com NaOH, $Na_2SO_3/NaOH$ e por explosão a vapor (Figura 18a). Esse resultado sugere a ocorrência de adsorção improdutiva nesses bagaços no início da reação (Figura 23a). No entanto, após 72 h de hidrólise, não foi observada diferença significativa (teste Tukey, 5% de significância) no rendimento de conversão de celulose do bagaço tratado com sulfito alcalino, ao realizar a hidrólise na presença de BSA. Tal resultado demonstra que mesmo que as enzimas tenham sido parcialmente adsorvidas improdutivamente à lignina, a quantidade de enzimas em solução foi suficiente para hidrolisar a celulose do material, o que explica os valores semelhantes de conversão (Figura 23b). Nos bagaços tratados com H_2SO_4 e $NaHSO_3/H_2SO_4$, da mesma forma que no experimento utilizando o extrato Celluclast, não foram observadas diferenças na conversão enzimática de celulose na presença de BSA. No entanto, nos bagaços tratados com NaOH e por explosão a vapor, a adsorção improdutiva limitou a hidrólise da celulose. A adição de BSA aumentou a conversão de celulose em 18,5% no bagaço tratado com NaOH e 13,6% no bagaço tratado por explosão a vapor.

Figura 23: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, utilizando Cellic CTec3, sem pré-incubação com BSA (■), e pré-incubando com BSA (■), nos tempos de 3 h (a) e 72 h (b) de hidrólise. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

É interessante observar que mesmo tendo ocorrido adsorção improdutiva no bagaço tratado por explosão a vapor ao utilizar Cellic CTec3, essa limitação à hidrólise ocorreu de forma menos intensa que ao utilizar Celluclast. O ganho de conversão ao adicionar BSA, utilizando Celluclast, foi 24,6%, enquanto que, utilizando Cellic CTec3, o ganho foi de 13,6%. Essa pode ser uma evidência de que esse coquetel enzimático tenha sido melhorado de forma que as enzimas que o compõe sejam menos susceptíveis à adsorção improdutiva, pelo menos em substratos tratados por explosão a vapor. Berlin e colaboradores (2005) já reportaram a necessidade do desenvolvimento das enzimas com

relação à adsorção improdutiva, ao mostrar diferentes enzimas com atividades semelhantes, que adsorviam menos à lignina.

5.6.2. Adsorção de proteínas e de enzimas presentes no extrato Celluclast nas ligninas extraídas dos bagaços pré-tratados

Como os bagaços pré-tratados com NaOH e por explosão à vapor, catalisada por SO₂, apresentaram maior efeito de adsorção improdutiva (Figura 24) e também as ligninas extraídas destas amostras adsorveram mais proteínas (Figura 21), tais ligninas foram utilizadas para caracterizar o perfil de adsorção das enzimas do extrato Celluclast. A figura 24a mostra as atividades enzimáticas de uma solução de Celluclast (0,4 mg_{proteínas}/mL) após incubação com lignina de bagaço tratado com NaOH.

Foi possível observar uma diminuição de todas as atividades testadas, sendo que a mais afetada foi a β -glicosidase (utilizando-se como substrato *p*-NPG), da qual apenas 40,6% da atividade inicial permaneceram em solução. A atividade de celobiohidrolase, medida com o substrato Avicel, foi a menos afetada pela presença da lignina extraída de bagaço tratado com NaOH, perdendo apenas 6,9% da atividade inicial. Ao medir a atividade de endoglucanase em solução (atividade medida com CMC), foi possível observar uma diminuição de 9,1% da atividade inicial.

Além de medir as atividades em solução, também foi medida a concentração de proteínas antes e depois da incubação, para confirmar que a perda da atividade não foi apenas devido à inibição por possíveis compostos liberados a partir da lignina, mas pela adsorção improdutiva das enzimas. De fato, pôde-se observar que aproximadamente 18,4% das proteínas inicialmente em solução adsorveram na lignina de bagaço tratado com NaOH, evidenciando que a diminuição da atividade em solução ocorreu devido à adsorção.

Figura 24: Variação na atividade enzimática e no teor de proteínas em solução após incubar o extrato Celluclast com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (a) e por explosão a vapor (b). Os valores do controle, que não foram incubados com as amostras de lignina, foram considerados 100%, e os testes submetidos a incubação foram calculados com relação ao controle.

Fonte: arquivo pessoal.

O mesmo experimento foi realizado utilizando a lignina de bagaço tratado por explosão a vapor/SO₂, do qual os resultados estão mostrados na figura 24b. Corroborando os resultados de capacidade adsorptiva e de adsorção improdutiva, essa amostra de lignina afetou mais severamente as atividades em solução. Como no experimento com lignina de bagaço tratado com NaOH (Figura 22a), a atividade de β -glicosidase foi a mais afetada, sendo que apenas 6,7% da atividade inicial permaneceram em solução. As atividades de celobiohidrolase e endoglucanase após incubação foram 78,9% e 52,9% da atividade inicial, respectivamente. Confirmando a ocorrência de adsorção de proteínas na lignina,

houve uma diminuição de 34,3% da concentração de proteínas em solução após incubação com essa amostra de lignina.

Berlin e colaboradores (2005) incubaram o coquetel enzimático Celluclast com amostras de lignina extraídas de pseudotsuga (*Douglas-fir*) submetida ao pré-tratamento organosolve (etanol/ácido sulfúrico). Após o período de incubação, foi medida a atividade de celulasas totais (FPA), e observou-se a diminuição de 27% da atividade em solução. O mesmo grupo reportou o procedimento de extração de duas amostras de lignina, uma a partir da precipitação da lignina presente no liquor do pré-tratamento, e outra pela extração por hidrólise enzimática do sólido pré-tratado (BERLIN et al., 2006). De forma semelhante ao trabalho anterior, os autores incubaram Celluclast com as duas amostras de lignina e mediram a atividade de celobiohidrolase em solução, quantificando a hidrólise de Avicel. A incubação com ambas as amostras de lignina resultou em diminuição da atividade em solução para 60% (lignina precipitada) e 25% (lignina extraída).

As atividades celulolíticas do extrato Celluclast após incubação com amostras de lignina isoladas (*spruce* pré-tratado por explosão a vapor) também foram monitoradas em um trabalho mais recente, conduzido por Rahikainen e colaboradores (2011). Após incubação, foi observada a diminuição de todas as atividades celulolíticas em solução, sendo que as atividades de celobiohidrolase e endoglucanase foram reduzidas a aproximadamente 60% da atividade inicial e a atividade de β -glicosidase, a aproximadamente 85%. Vale ressaltar que, com exceção da atividade de β -glicosidase, as atividades foram medidas de forma diferente que no presente trabalho.

Outra metodologia foi usada para avaliar a adsorção de enzimas à lignina. Foram feitos géis de eletroforese das soluções de Celluclast, antes e depois da incubação com lignina (Figura 25). As intensidades das bandas observadas no gel SDS-PAGE foram medidas por densitometria e a massa referente a cada uma delas foi determinada em relação a um padrão de proteínas (LMW-SDS Marker kit, GE Healthcare). As bandas I, II e III apresentaram massas molares de 80 kDa, 55 kDa e 45 kDa, respectivamente. A análise para relacionar cada uma das bandas selecionadas nos géis (figura 25) com as atividades das enzimas presentes no extrato Celluclast foi feita utilizando dados da literatura.

Kubicek-Pranz, Gsur, Hayn e Kubicek (1991) determinaram o perfil eletroforético do extrato Celluclast por SDS-PAGE, identificando algumas proteínas das bandas por *Western Blot*. Foram identificadas CBHI nas bandas de 45, 55 e 60-70 kDa, e CBHII nas bandas de 45 e 55 kDa. Vinzant et al.(2001), identificaram por espectrometria de massas as

proteínas em um gel bidimensional de extrato de *T. reesei*. As manchas entre 60-80 kDa foram identificadas como CBHI, CBHII e β -glicosidase. As enzimas CBHI e CBHII também foram identificadas em manchas com massa aproximada de 55 kDa, assim como a EGI. A endoglucanase II (EGII) foi identificada nas manchas na região de 45 kDa. Pribowo e colaboradores (2012) compararam as bandas de um extrato de *T. reesei* com o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZy – *Carbohydrate Active EnZymes*). Uma das proteínas presentes na banda de 83 kDa é a β -glicosidase. CBHI, CBHII e EGI são as principais proteínas da banda entre 56-62 kDa e a EGII é uma das proteínas da banda de 47 kDa..

Feitas essas considerações, as bandas no gel mostrado na figura 23 foram identificadas da seguinte forma: a β -glicosidase foi considerada uma das proteínas presentes na banda I, com aproximadamente 80 kDa (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012; VINZANT et al., 2001); a banda II (55 kDa) foi atribuída às enzimas CBHI, CBHII e EGI (KUBICEK-PRANZ et al., 1991; PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012; VINZANT et al., 2001). No entanto, como CBHI e CBHII podem totalizar até 80% das proteínas do extrato de *T. reesei* (ROSGAARD et al., 2007), é muito provável que essa banda seja representada principalmente por enzimas com atividade de celobiohidrolase. Finalmente, a EGII foi considerada a principal proteína presente na banda III, com massa aproximada de 45 kDa (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012; VINZANT et al., 2001).

Figura 25: Gel de eletroforese em condições desnaturantes do extrato Celluclast sem incubação (canaletas 2 e 4) e após incubação com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (canaleta 3) e por explosão a vapor (canaleta 5). As bandas I, II e III foram atribuídas principalmente às enzimas β -glicosidase, CBHI e EGII, respectivamente. Na canaleta 1, foi aplicado o marcador de massa molar.

Fonte: arquivo pessoal.

As três bandas selecionadas apresentaram diminuição na intensidade de coloração no gel depois que o extrato enzimático foi incubado com as ligninas. Os valores de

intensidade relativa das bandas estão mostrados na Tabela 6. Em geral, as medidas das intensidades das bandas corroboraram as medidas das atividades celulolíticas em solução após incubação com as amostras de lignina (Figura 25 e Tabela 6).

Tabela 6: Intensidades relativas das bandas I, II e III do gel de eletroforese mostrado na figura 25. A intensidade das bandas após incubação foi calculada com relação à intensidade das mesmas sem incubação.

Intensidade relativa das bandas (%)				
Banda	Lignina NaOH		Lignina Vapor/SO₂	
	Antes da incubação (canaleta 2)	Depois da incubação (canaleta 3)	Antes da incubação (canaleta 4)	Depois da incubação (canaleta 5)
I - 80 kDa	100	34,9 (14,4)	100	33,0 (28,9)
II - 55 kDa	100	94,8 (0,2)	100	57,9 (2,4)
III - 45 kDa	100	101,4 (0,7)	100	47,9 (12,2)

Os valores em parênteses correspondem ao desvio das triplicatas de incubação.

A banda correspondente à β -glicosidase (banda I) foi a que apresentou diminuição de intensidade mais acentuada, em ambas as amostras de lignina testadas. A intensidade média da banda I após a incubação com as ligninas NaOH e vapor/SO₂ foi 34,9% e 33,0%, respectivamente (Tabela 6). Sabe-se que a atividade de β -glicosidase do extrato Celluclast é baixa, comparada às outras enzimas celulolíticas (MENDES et al., 2011), e isso pode ser confirmado pela análise dos géis, uma vez que é a banda mais fraca (Figura 25). Como consequência, pequenas variações experimentais podem ter resultado em diferenças nas triplicatas de incubação, o que explica o alto desvio para os valores de intensidade relativa dessa banda, bem como seus valores médios semelhantes, com as duas amostras de lignina. Mesmo com os desvios mais altos, fica claro que a β -glicosidase é a enzima mais sensível à adsorção improdutiva do extrato Celluclast.

Apesar da semelhança na intensidade das bandas, os resultados da determinação de atividade de β -glicosidase nos sobrenadantes, após incubação da solução de Celluclast com as ligninas, apresentou resultados diferentes (Figura 24). A amostra de lignina extraída de bagaço tratado por explosão à vapor adsorveu grande parte da β -glicosidase presente na Celluclast, restando 7% da atividade em solução. Em comparação, a lignina do bagaço pré-tratado com NaOH adsorveu menos a β -glicosidase e 40% da atividade permaneceu em solução.

Apesar de a β -glicosidase não ser uma enzima que atua diretamente na celulose, sua presença no meio de hidrólise é de grande importância, já que é capaz de hidrolisar moléculas de celobiose, forte inibidor de celobiohidrolases (LEE; FAN, 1983; ZHAO et al., 2004). Essa intensa adsorção de β -glicosidases do extrato de Celluclast na lignina talvez seja um dos motivos para que melhoras consideráveis sejam observadas quando o extrato enzimático é suplementado com β -glicosidase (SIQUEIRA et al., 2013).

Com relação à banda II, a diminuição da intensidade no gel foi diferente para cada amostra de lignina. Após incubação do extrato Celluclast com a lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor/SO₂, a intensidade da banda diminuiu 42,1%; já com a lignina extraída de bagaço tratado com NaOH a análise do gel permitiu observar uma diminuição de 5,2% da intensidade da banda (Tabela 6). A essa banda foi atribuída a atividade de celobiohidrolases.

A atividade de celobiohidrolase diminuiu 7% ao incubar a solução de Celluclast com amostra de lignina extraída de bagaço tratado com NaOH (Figura 24a). Comparando com a diminuição da intensidade da banda II (5,2%) os dados foram bastante coerentes. No ensaio enzimático na presença de lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor/SO₂, houve diminuição de 21% da atividade de celobiohidrolase em solução (Figura 25b), ao passo que a intensidade da banda referente a essas enzimas (banda II) diminuiu 42,1% devido à incubação. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que essa banda é composta por várias outras proteínas que não apresentam a atividade catalítica medida (VINZANT et al., 2001), de forma que a adsorção destas na lignina não contribuiu para a diminuição da atividade de celobiohidrolase.

Com relação à banda III, a incubação com as duas amostras de lignina também resultou em valores diferentes de intensidade relativa (Tabela 6). A intensidade da banda não diminuiu após incubar o extrato Celluclast com a lignina extraída de bagaço tratado com NaOH. Por outro lado, a lignina de bagaço tratado por explosão a vapor adsorveu de forma mais intensa as proteínas dessa banda, evidenciado pela diminuição em 53% da intensidade da mesma após incubação. Conforme dito anteriormente, a essa banda foi atribuída principalmente a atividade de endoglucanases.

De acordo com os resultados de atividade de endoglucanase, após incubação do extrato enzimático com a lignina de bagaço tratado com NaOH, houve diminuição de 9% da atividade. Assim como observado no gel de eletroforese, a adsorção de endoglucanases (banda III) foi bem mais pronunciada para a lignina de bagaço tratado por explosão de vapor, confirmado pela diminuição de 47% da atividade em solução (Figura 24).

5.6.3. Adsorção de CBHI, EGII e β -glicosidase purificadas na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor/SO₂

Berlin et al. (2005a) mostraram que enzimas com atividade catalítica semelhante, mas de diferentes microrganismos, adsorviam com intensidades diferentes na lignina, definindo as “enzimas de baixa ligação à lignina”. Nesse sentido, procurou-se avaliar neste trabalho o efeito da adsorção improdutiva de celulases de outros microrganismos à lignina. Foram utilizadas as enzimas comerciais, CBHI e EGII, purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* e β -glicosidase de *Aspergillus niger*. A amostra de lignina escolhida para esse experimento foi a lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor. Conforme já descrito neste trabalho, essa lignina apresentou a maior capacidade adsortiva, maior adsorção improdutiva e que afetou mais substancialmente as atividades celulolíticas do extrato Celluclast. Cada enzima foi incubada isoladamente com a amostra de lignina, e em mistura, de forma que a quantidade de proteína total fosse a mesma em todos os experimentos. A figura 26 mostra a atividade relativa das enzimas após incubação com a lignina.

Ao incubar as enzimas isoladamente com a lignina de bagaço tratado por explosão a vapor, o efeito na diminuição da atividade foi menor (Figura 26a). As atividades de CBHI e de EGII de *T. longibrachiatum* diminuíram aproximadamente 5%, ao passo que a atividade de β -glicosidase de *A. niger* foi ligeiramente aumentada após a incubação, indicando que a presença da lignina não afetou a atividade dessa enzima. Como as enzimas utilizadas nesse experimento eram purificadas, a concentração de cada uma em solução foi maior em comparação com os experimentos utilizando o extrato Celluclast (mistura de proteínas), uma vez que a concentração inicial de proteínas em solução foi a mesma. Como a lignina apresenta uma capacidade máxima de adsorção, ao utilizar concentrações elevadas de proteínas, o efeito de adsorção improdutiva pode ter sido atenuado. Por esse motivo, uma provável explicação para a diferença entre este resultado e aquele obtido com a Celluclast (Figura 26), especialmente no caso da enzima β -glicosidase, pode se referir à diferença de concentração proteica usada nos experimentos.

Figura 26: Variação na atividade enzimática em solução após incubar as enzimas purificadas CBHI e EGII, de *T. longibrachiatum* com amostras de lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor. As enzimas foram incubadas isoladamente (a) e em mistura (b), mantendo em ambos os casos a mesma concentração de proteínas total. No caso da incubação em mistura (b), a concentração de cada enzima correspondeu a 1/3 da concentração de proteínas total. Os valores do controle, que não foram incubados com as amostras de lignina, foram considerados 100%, e os testes submetidos à incubação foram calculados com relação ao controle.

Fonte: arquivo pessoal

A fim de tentar reproduzir o resultado do ensaio com Celluclast, as três enzimas purificadas foram misturadas e incubadas com a amostra de lignina, de forma que a concentração de proteínas fosse a mesma dos experimentos anteriores, e, conseqüentemente, a concentração de cada uma das proteínas fosse 1/3 da concentração total.

Em concentrações menores, as atividades de CBHI e EGII foram mais afetadas pela presença da lignina (Figura 26b). A incubação da mistura de proteínas com lignina de bagaço tratado por explosão a vapor resultou na diminuição de 23,4% da atividade de

CBHI e 17,7% da atividade de EGII. Surpreendentemente, a atividade de β -glicosidase não foi afetada, mesmo em concentração mais baixa, indicando que a β -glicosidase produzida por *A. niger* não se liga à lignina.

Para confirmar visualmente o efeito observado pela medida de atividade, foi realizado um SDS-PAGE, analisando tanto as enzimas isoladamente, quanto em mistura (Figura 27). As canaletas de 2 a 7 representam as soluções contendo as enzimas isoladas, antes e depois de incubar com a lignina, e as canaletas 8 e 9, a mistura de proteínas.

Figura 27: Gel de eletroforese em condições desnaturantes das proteínas purificadas e em mistura, antes e após incubação com a amostra de lignina extraída de bagaço tratado por explosão a vapor. As canaletas 2, 4 e 6 representam, respectivamente, as enzimas CBHI (b), EGII (c) e β -glicosidase (a) sem incubação, e as canaletas 3, 5 e 7, as mesmas enzimas, após incubação com a amostra de lignina. A canaleta 8 representa a mistura das 3 proteínas sem incubação, e a canaleta 9, a mesma mistura, após incubação com a amostra de lignina. As canaletas 2 e 4) e após incubação com as amostras de lignina extraídas de bagaço tratado com NaOH (canaleta 3) e por explosão a vapor (canaleta 5). As bandas I, II e III foram atribuídas principalmente às enzimas β -glicosidase, CBHI e EGII, respectivamente. Na canaleta 1, foi aplicado o marcador de massa molar.

Fonte: arquivo pessoal.

Apenas a β -glicosidase, mostrada nas canaletas 6 e 7, apresentou banda única no gel. Nas canaletas referentes à CBHI (2 e 3) e EGII (4 e 5), é possível observar a presença de várias bandas no gel. Como o fornecedor das enzimas (Megazyme) informa que ambas as proteínas são puras e apresentam apenas uma banda em SDS-PAGE, analisou-se por densitometria apenas a banda mais forte em cada canaleta do gel, comparando-se a intensidade das bandas antes e depois de incubar com a amostra de lignina, isoladamente e

em mistura. As demais bandas foram atribuídas a produtos de degradação proteica e desconsideradas na análise.

Tabela 7: Intensidades relativas das bandas de β -glicosidase, CBHI e EGII do gel de eletroforese mostrado na figura 27, incubadas com a amostra de lignina de bagaço tratado por explosão a vapor, isoladamente e em mistura. A intensidade das bandas após incubação foi calculada com relação à intensidade das mesmas sem incubação.

Intensidade relativa das bandas (%)				
Proteína	Banda		Antes da incubação	Depois da incubação
β-Glicosidase	a	Isoladamente	100	99,0
		Mistura	100	100,7
CBHI	b	Isoladamente	100	96,4
		Mistura	100	76,9
EGII	c	Isoladamente	100	87,4
		Mistura	100	80,0

Não houve diminuição da intensidade da banda de β -glicosidase, tanto isoladamente (canaletas 6 e 7, figura 27), quanto em mistura (canaletas 8 e 9, figura 27), corroborando os resultados de medida de atividade (figura 26). Entretanto, esse resultado é diferente daquele mostrado na Tabela 6, com o extrato de *T. reesei* (Celluclast), pois a β -glicosidase deste fungo adsorveu com bastante intensidade na lignina. Essa observação suporta a conclusão de Berlin et al. (2005a), sobre enzimas com a mesma atividade catalítica, porém com diferentes afinidades pela lignina. Haven e Jørgensen (2013) chegaram à mesma conclusão, utilizando extratos diferentes. Ao testarem a atividade de β -glicosidase do extrato CellicCTec 2, também de *T. reesei*, após incubação com lignina extraída de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor, os autores observaram diminuição de aproximadamente 70% da atividade de β -glicosidase em solução. O mesmo experimento, realizado com o extrato Novozym 188, de *A. niger*, mostrou que toda a atividade de β -glicosidase permaneceu em solução. No entanto, foi reportado diminuição significativa na atividade de β -glicosidase da família 3 de *A. niger* em solução após incubação com lignina de bagaço de cana (LIMA et al., 2013). Os autores relatam a presença de um domínio fibronectina III-like na enzima que seria responsável pela adsorção em lignina. Porém, os autores não informaram o procedimento de isolamento da

lignina, o que dificulta a comparação, uma vez que o presente trabalho mostra que o tratamento químico ao qual o bagaço é submetido resulta em amostras de lignina com diferentes capacidades adsorptivas (Figura 21). Além disso, como os autores apenas monitoraram a atividade em solução, e não a concentração de proteínas, o resultado pode ser atribuído a um fenômeno inibitório, e não à adsorção improdutiva.

A atividade de CBHI em solução, após incubação com a amostra de lignina, diminuiu 4,5% e 23,4%, utilizando a enzima isolada e em mistura, respectivamente (Figura 26). A medida da intensidade das bandas (banda b) confirmou os resultados de atividade, uma vez que houve diminuição de 3,6% da intensidade ao incubar a enzima isolada, e 23,1% ao incubar a mistura de enzimas (Tabela 7).

No caso da EGII (banda c), a diminuição em 12,6% na intensidade da banda (Tabela 7) foi maior que a queda de atividade (4,8%) em solução (Figura 27), após incubação da enzima isolada. Na mistura de proteínas, entretanto, a diminuição de atividade de endoglucanase e da intensidade da banda correspondente foram mais próximos, com valores de 17,7% e 20,0%, respectivamente.

A incubação das enzimas isoladas e em mistura não foi conduzida apenas para avaliar o efeito da concentração de cada uma das proteínas, mas também para comparar a afinidade das mesmas pela lignina. Caso a incubação de uma mistura de proteínas, com mesma concentração inicial, com uma amostra de lignina resulte em diferentes concentrações individuais em solução, é provável que essas proteínas tenham afinidades diferentes por essa amostra de lignina. Aparentemente, tanto a CBHI quanto a EGII de *T. longibrachiatum* apresentaram afinidades semelhantes pela amostra de lignina, uma vez que a diminuição da atividade e da intensidade das bandas referentes a elas foi semelhante, quando incubadas em conjunto. Palonen et al. (2004), por sua vez, mostraram que a CBHI e EGII de *T. reesei* apresentaram diferentes afinidades pela lignina de *Picea sp.* pré-tratada por explosão a vapor, uma vez que a constante de afinidade de CBHI foi 3 vezes maior que a de EGII. No entanto, essa constante foi medida com as enzimas isoladas, e ao misturar as duas enzimas, os autores apenas reportaram o comportamento da CBHI, dificultando a comparação dos resultados.

A comparação direta da afinidade das enzimas de *T. longibrachiatum* e do extrato Celluclast (*T. reesei*) pela lignina de bagaço tratado por explosão a vapor não seria possível, pois a quantidade de cada enzima não foi a mesma nos experimentos. No entanto, ao padronizar o ensaio pela quantidade de proteína, pode-se inferir que a quantidade de CBHI presente na solução de Celluclast foi maior que no experimento com CBHI de *T.*

longibrachiatum, levando em consideração que CBHI representa 60% do total de proteínas no extrato Celluclast (ZHANG; LYND, 2004). Dessa forma, é possível inferir que as enzimas de *T. reesei* têm maior afinidade pela lignina testada que as enzimas de *T. longibrachiatum*, uma vez que a diminuição, tanto da intensidade das bandas, quanto da atividade de CBHI, foi maior ao testar o extrato Celluclast, mesmo incubando maior quantidade dessa enzima.

Com base nos resultados obtidos, e nos resultados da literatura, fica evidente que a origem da enzima representa uma grande influência na adsorção improdutiva, e não apenas o pré-tratamento ao qual a biomassa é submetida. Estudos devem ser direcionados para o desenvolvimento de melhores enzimas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, não levando em consideração apenas a capacidade catalítica, mas também a sua afinidade pela lignina.

5.7. Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose

5.7.1. Efeito da pré-incubação dos bagaços tratados na solubilização de fenóis

Conforme já apresentado neste trabalho, a solubilização de compostos fenólicos de lignina Kraft comercial de pinus (Indulin), lignina de licor Kraft de eucalipto precipitada com HCl e lignina de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, extraída com soda e precipitada com HCl, foi dependente do tempo de incubação dessas amostras (item 5.5.1). A partir desses resultados inferiu-se que a hidrólise rápida da celulose de materiais mais acessíveis pode ser uma estratégia a ser usada para contornar a inibição por fenóis. De fato, Kim (2012) observou um resultado semelhante, ao mostrar que ligninas que solubilizaram mais rapidamente afetaram mais a hidrólise da celulose de materiais pré-tratados. Com intuito de ampliar os dados para se chegar a resultados mais conclusivos, avaliou-se a solubilização dos compostos fenólicos, provenientes da lignina, dos bagaços de cana pré-tratados, e alguns ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos com bagaços lavados e não lavados, utilizando 2% de sólidos. Aos bagaços pré-tratados foram adicionados tampão e as enzimas (Celluclast e Novozym 188), e os rendimentos de conversão de celulose foram medidos em diferentes tempos. Paralelamente, aos bagaços

tratados foi adicionado apenas o tampão, e a mistura foi incubada por 24 h, nas condições de hidrólise. Após esse tempo, foram adicionadas as enzimas e a conversão de celulose foi medida, também em diferentes tempos.

Os fenóis dissolvidos, após 1 h e 24 h de incubação, foram quantificados pela metodologia de Folin-Ciocalteu (ZHANG et al., 2006). Os compostos fenólicos totais compreendem uma série de compostos provenientes da degradação parcial da lignina durante o pré-tratamento, os quais incluem fenóis monoméricos, como vanilina, siringaldeído, ácidos ferúlico e cumárico, dentre outros, e fenóis poliméricos, como ácido tânico (XIMENES et al., 2011).

Ao incubar bagaços pré-tratados lavados em tampão, a concentração de fenóis aumentou com o tempo de incubação. De acordo com o teste Tukey, a 5% de significância, o tempo de incubação influenciou na solubilização de fenóis, com exceção do bagaço tratado com NaOH (Figura 28a). No entanto, esse aumento foi inferior a 0,1 mg/mL em todos os bagaços. A incubação dos bagaços pré-tratados não lavados em tampão por 24 h apresentou um comportamento semelhante, porém as concentrações de fenóis no tampão foram mais elevadas, com exceção do bagaço tratado com NaOH (teste Tukey, 5% de significância) (Figura 28b). A maior solubilização de fenóis foi obtida para o bagaço tratado por explosão a vapor, não lavado, após 24 h de incubação (0,5 mg/ml).

Figura 28: Concentração de fenóis dissolvidos no tampão de hidrólise enzimática após incubação dos bagaços pré-tratados lavados (a) e não lavados (b), por 1 h () e por 24 h (). A incubação foi feita com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

Os bagaços pré-tratados foram pré-incubados ou não em tampão por 24 h e a hidrólise da celulose foi realizada com diferentes cargas de proteína. A figura 29 mostra os resultados da hidrólise da celulose dos bagaços lavados. O bagaço pré-tratado com sulfito alcalino apresentou a maior conversão de celulose na menor carga enzimática, seguido do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (Figura 29a). O aumento na carga enzimática favoreceu a hidrólise da celulose do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, ou seja, mesmo que parte das enzimas tenha se adsorvido improdutivamente à lignina residual, ainda restou enzima para hidrólise da celulose (Figura 29b, c). A incubação prévia dos bagaços em tampão por 24 h não resultou em diferenças estatísticas nos rendimentos de hidrólise da celulose, evidenciando que o aumento da concentração de fenóis, mostrado na figura 28, não foi suficiente para resultar em inibição da hidrólise enzimática, independentemente da carga de proteínas utilizadas (5 mg/g; 10 mg/g e 20 mg/g).

Figura 29: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, lavados, utilizando Celluclast e Novozym 188. (a – c) Hidrólise sem incubação dos bagaços em tampão antes de adicionar as enzimas. (d – f) Hidrólise incubando os bagaços em tampão por 24 h antes da adição das enzimas. (a,d) 5 mg/g; (b,e) 10 mg/g; (c,f) 20 mg/g. (▲) NaOH; (■) Na₂SO₃/NaOH; (▲) H₂SO₄; (X) NaHSO₃/H₂SO₄; (*) Explosão a vapor / SO₂. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

A figura 30 mostra os resultados da hidrólise da celulose em diferentes cargas enzimáticas dos bagaços não lavados. Os bagaços pré-tratados com sulfito alcalino e por explosão a vapor foram hidrolisados com maior eficiência. Como na hidrólise dos bagaços pré-tratados lavados, em baixa carga de proteína (5mg/g), o bagaço pré-tratado com sulfito apresentou o maior rendimento de hidrólise, sendo que a partir da carga intermediária (10 mg/g), o bagaço tratado por explosão a vapor resultou em maiores valores de conversão. No entanto, diferentemente do experimento de hidrólise dos bagaços lavados, a pré-incubação resultou em maior eficiência de conversão da celulose de todos os bagaços pré-tratados, ao utilizar baixa carga de enzima (5 mg/g). Esse resultado sugere que a presença dos compostos fenólicos dos extratos de alguma forma auxilia a ação das enzimas. De fato, estudos recentes têm mostrado o efeito positivo de fenóis em algumas enzimas importantes na degradação da celulose, como as enzimas oxidativas AA9 (HU et al., 2014). Além disso, nos extratos dos bagaços tratados com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ e $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, é possível que estejam presentes lignossulfonatos. Esses compostos, com ação surfactante, podem ter auxiliado a etapa de dessorção das enzimas da molécula de celulose. Enzimas processivas, como algumas celobiohidrolases, adsorvem à fibra de celulose, perdem a processividade e não dessorvem, prejudicando a hidrólise e resultando em um fenômeno chamado pelos autores de “engarrafamento” (IGARASHI et al., 2011). Mais recentemente, foi mostrado que a constante de dessorção das celulasas é uma medida importante da eficiência de degradação da celulose (BECKHAM et al., 2014). A hipótese proposta para explicar o efeito positivo observado nos extratos dos bagaços submetidos a esses dois tratamentos, especialmente no bagaço tratado com sulfito alcalino, é que a dessorção das enzimas, auxiliada pela presença dos lignossulfonatos, resultou em efeito positivo na hidrólise. Nas demais cargas de proteína, a incubação previa dos bagaços em tampão por 24 h não resultou em diferenças significativas nos valores de conversão de celulose em nenhum dos bagaços pré-tratados.

Mesmo nas condições em que os bagaços não foram lavados, a concentração de fenóis no meio de hidrólise foi baixa (máximo de 0,5 mg/mL). Li, Qi e Wan (2014) testaram o efeito inibitório da vanilina na hidrólise enzimática de celulose microcristalina e apenas observaram inibição das celulasas em concentrações de vanilina superiores a 10 mg/mL. Essa concentração é 20 vezes maior que a concentração de fenóis totais, encontrada no meio de hidrólise do bagaço tratado por explosão a vapor não lavado, bagaço que resultou em maior concentração de fenóis solubilizados.

Figura 30: Rendimento de hidrólise de celulose dos bagaços pré-tratados, não lavados, utilizando Celluclast e Novozym 188. (a – c) Hidrólise sem incubação dos bagaços em tampão antes de adicionar as enzimas. (d – f) Hidrólise incubando os bagaços em tampão por 24 h antes da adição das enzimas. (a,d) 5 mg/g; (b,e) 10 mg/g; (c,f) 20 mg/g. (▲) NaOH; (■) Na₂SO₃/NaOH; (▲) H₂SO₄; (X) NaHSO₃/H₂SO₄; (*) Explosão a vapor / SO₂. Hidrólises conduzidas com teor de sólidos de 2%.

Fonte: arquivo pessoal.

O baixo teor de sólidos usados nas hidrólises (2%) pode ter sido a principal causa da baixa concentração de fenóis nesses experimentos. A etapa de hidrólise enzimática de

um processo economicamente viável, pelo menos considerando a produção de etanol a partir da celulose, deve ser conduzida no mínimo com 10% de sólidos insolúveis (HUMBIRD et al., 2011). Nessa condição, é provável que seja evidenciada uma inibição das enzimas pelos compostos fenólicos, como foi relatado em outros estudos com celulases (LI; QI; WAN, 2014; XIMENES et al., 2010, 2011).

5.7.2. Efeito dos compostos solúveis nas atividades de CBHI e de β -glicosidase

Como a concentração de fenóis foi baixa, experimentos foram conduzidos utilizando os compostos solúveis liberados dos bagaços não lavados, a 2% e 10% de sólidos. Para tanto, foram preparados extratos a partir dos bagaços pré-tratados, não lavados, incubando-os em tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8, por 24 h. Após o período de incubação, a mistura foi filtrada e a fração líquida foi coletada. Foram detectadas alterações no valor de pH da solução, ultrapassando uma unidade em alguns dos bagaços pré-tratados, indicando que a força iônica do tampão (50 mM) não foi suficiente para manter o pH na faixa ideal para a hidrólise. O valor de pH dos extratos foi então reajustado para 4,8, com HCl ou NaOH, para a condução dos experimentos. O objetivo de produzir esses extratos foi utilizá-los nos ensaios de atividade enzimática e na hidrólise enzimática de celulose de polpa de dissolução, considerada nesse trabalho um substrato celulósico modelo. A figura 31 mostra a concentração de fenóis totais solubilizados em tampão pelos bagaços não lavados por 24 h.

As concentrações dos fenóis produzidos a partir da incubação dos bagaços com 10% de sólidos foram mais elevadas, em comparação com os extratos gerados pela incubação com 2% de sólidos. Além disso, com 10% de sólidos, maiores diferenças nas concentrações de fenóis foram observadas entre os bagaços obtidos dos diferentes pré-tratamentos. As concentrações de fenóis solubilizadas dos bagaços pré-tratados com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$, H_2SO_4 e por explosão a vapor foram 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,1 mg/mL, respectivamente. O bagaço pré-tratado por NaOH resultou em um extrato com 1,4 mg de fenóis / mL, e o tratado com $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, 1,6 mg/mL.

Figura 31: Concentração de fenóis dissolvidos no tampão de hidrólise enzimática após incubação dos bagaços pré-tratados não lavados, com teor de sólidos de 2% (■) e 10% (■).

Fonte: arquivo pessoal.

Os coquetéis enzimáticos, Celluclast e Novozym 188, foram diluídos nos extratos produzidos a partir da incubação dos bagaços com 2% e 10% de sólidos. As atividades de CBHI e β -glicosidase foram determinadas utilizando *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (Sigma), e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma), respectivamente. Como controle, os coquetéis foram diluídos em tampão acetato, pH 4,8 e as medidas de atividades foram conduzidas da mesma forma. As atividades relativas de CBHI e β -glicosidase estão mostradas na figura 32.

Os extratos produzidos a partir da incubação dos bagaços tratados com NaOH e Na₂SO₃/NaOH, com 2% de sólidos, não resultaram em inibição da atividade de β -glicosidase, quando comparada com o controle (Figura 32a). A incubação dos bagaços tratados com H₂SO₄, NaHSO₃/H₂SO₄ e por explosão a vapor, com 2% de sólidos, resultaram em 15%, 20% e 9% de inibição da atividade de β -glicosidase, respectivamente.

Os extratos produzidos a partir da incubação dos bagaços com 10% de sólidos foram mais inibitórios (Figura 32b,d), provavelmente pela maior concentração de fenóis (Figura 31). Os extratos produzidos a partir dos tratamentos em condições alcalinas resultaram em 25% de inibição da atividade de β -glicosidase, ao passo que os extratos gerados por bagaços tratados em condições ácidas inibiram a enzima em até 55%. Independentemente do teor de sólidos utilizado na incubação, os extratos produzidos a

partir dos bagaços tratados em condições ácidas apresentaram maior efeito inibitório na atividade de β -glicosidase.

Figura 32: Atividade enzimática relativa das enzimas β -glicosidase (a,b) e CBHI (c,d) na presença dos tampões gerados a partir da incubação dos bagaços pré-tratados não lavados a 2% de sólidos (□) e 10% (■) de sólidos. A atividade relativa representa a percentagem da atividade do controle, medida em tampão acetato de sódio, pH 4,8, 50 mM. Os desvios foram menores que as linhas de contorno das barras.

Fonte: arquivo pessoal.

A atividade de CBHI do coquetel Celluclast foi mais sensível aos compostos solúveis presentes nos extratos produzidos a partir da incubação dos bagaços não lavados, em comparação à atividade de β -glicosidase. Mesmo nos extratos com menor concentração de fenóis (Figuras 32a,c), a inibição chegou a 57% no extrato do bagaço tratado com H₂SO₄ e a 25% nos extratos dos bagaços tratados com NaOH, Na₂SO₃/NaOH e NaHSO₃/H₂SO₄. O extrato que se mostrou menos inibitório à atividade de CBHI foi o

produzido a partir do bagaço tratado por explosão a vapor, o qual resultou em diminuição de apenas 8% da atividade dessa enzima.

A atividade de CBHI diminuiu em até 80% na presença do extrato produzido a partir do bagaço tratado com H_2SO_4 (Figura 32d). Os extratos dos bagaços pré-tratados com NaOH e $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ diminuíram atividade de CBHI em 57% e 62%, respectivamente. Surpreendentemente, o aumento da concentração dos compostos inibitórios no extrato do bagaço tratado por explosão a vapor não resultou em maior inibição da atividade de CBHI, sugerindo que a inibição dessa enzima seja dependente do tipo de inibidor, e não apenas é influenciada pelo aumento de sua concentração no meio. No entanto, além dos compostos fenólicos, outros compostos com capacidade de inibir a CBHI podem ter sido solubilizados no tampão de hidrólise. É sabido que xilooligômeros e outros açúcares inibem a atividade das enzimas celulolíticas (DALE et al., 1985; HOLTZAPPLE; COGNATA; HENDRICKSON, 1990; QING; YANG; WYMAN, 2010). Dessa forma, para tirar mais conclusões sobre a influência dos fenóis presentes nesses extratos, seria necessário um estudo detalhado da composição desses extratos, bem como a influência de cada componente individual na atividade enzimática.

Não foi possível medir a da atividade de endoglucanases na presença desses extratos, uma vez que a coloração escura destes resultou em interferência na medida da atividade, que envolve reações com ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

5.7.3. Efeito dos compostos solúveis na hidrólise da celulose

Os extratos obtidos a partir dos bagaços pré-tratados, não lavados, foram utilizados na reação de hidrólise enzimática de polpa de dissolução, substrato modelo de celulose ($\approx 96\%$ celulose). Como controle, utilizou-se o tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 4,8). A figura 33 mostra a conversão relativa da celulose ao utilizar os extratos, obtidos da incubação de 2% ou 10% de bagaço pré-tratado, como tampão de hidrólise.

Os rendimentos de hidrólise de celulose, com 2,5 mg de proteínas / g de celulose, foram superiores ao controle, ao utilizar os extratos menos concentrados (provenientes da incubação com 2% de sólidos). O maior aumento observado foi de 28% na conversão da celulose com o extrato do bagaço tratado com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ (Figura 33a). Esse resultado corrobora os obtidos no item 5.7.1, mostrando que a presença de compostos fenólicos, em

baixas concentrações, resultou em um efeito benéfico na hidrólise da celulose, ao utilizar cargas inferiores de proteína. Como discutido anteriormente, no item supracitado, esses compostos podem ter auxiliado enzimas oxidativas, como a AA9, possivelmente presentes no extrato enzimático, ou contribuído para a dessorção das enzimas, principalmente nos extratos em que a presença de lignossulfonatos é bastante provável ($\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ e $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), evitando o “engarramento” enzimático.

Figura 33: Rendimento de hidrólise de celulose de polpa de dissolução utilizando os tampões gerados a partir da incubação dos bagaços pré-tratados a 2% (a,b) e 10% (c,d) de sólidos. As hidrólises foram conduzidas com Celluclast e Novozym 188, com as cargas enzimáticas de 2,5 mg/g (a,c) e 10 mg/g (b,d). A hidrólise enzimática do controle, realizada em tampão acetato, pH 4,8, 50 mM, no tempo de 72 h foi considerada o máximo de conversão e o percentual das demais foi calculado a partir desse valor. (♦) NaOH; (■) $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$; (▲) H_2SO_4 ; (X) $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; (*) Explosão a vapor / SO_2 ; (●) Controle. As hidrólises foram realizadas utilizando 2% de sólidos.

Fonte: arquivo pessoal.

Ao utilizar os mesmos extratos, aumentando a carga enzimática, não foram observadas diferenças estatísticas entre os rendimentos de hidrólise na presença de tampão

e dos extratos (Figura 33b). O efeito positivo dos extratos observado com baixa carga enzimática não se repetiu ao utilizar alta carga enzimática, provavelmente porque o excesso de enzimas foi suficiente para contornar a possível adsorção irreversível das enzimas na celulose.

No entanto, todos os extratos concentrados, provenientes da incubação dos bagaços com 10% de sólidos, resultaram em diminuição dos rendimentos de hidrólise da celulose, independentemente da carga enzimática utilizada (Figura 33c,d). Os extratos que menos inibiram a hidrólise da celulose de polpa de dissolução foram os de bagaço tratado com sulfito alcalino e por explosão a vapor, diminuindo os rendimentos de hidrólise da celulose em 14% e 20%, respectivamente, ao utilizar baixa carga de enzimas (Figura 33c). Os extratos dos bagaços tratados com NaOH e com H₂SO₄ limitaram a conversão de celulose em 30%. Os compostos presentes no extrato do bagaço tratado com NaHSO₃/H₂SO₄ diminuíram a conversão de celulose em quase 50%, ao utilizar baixa carga de enzima. Ao aumentar a carga de enzima para 20 mg/g, ainda utilizando os extratos mais concentrados, todos os extratos resultaram em valores de rendimento de hidrólise da celulose similares, porém aproximadamente 25% inferiores ao controle (Figura 25d).

Entretanto, como discutido neste trabalho, a inibição não pode ser atribuída apenas aos fenóis, e para que as hipóteses levantadas possam ser confirmadas, experimentos futuros precisariam ser realizados, uma vez que o efeito da presença dos açúcares pode estar combinado com o efeito dos fenóis.

6. CONCLUSÕES

A composição química dos bagaços diferiu bastante, como consequência do tipo de pré-tratamento. A lignina foi mais solubilizada no pré-tratamento com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$, ao passo que a xilana foi quase totalmente solubilizada no pré-tratamento por explosão a vapor catalisada por SO_2 . Os demais pré-tratamentos solubilizaram parcialmente ambos os componentes, sendo que em meio alcalino a solubilização preferencial foi da lignina, e em meio ácido, da xilana.

A celulose dos bagaços pré-tratados com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ e por explosão a vapor foi mais susceptível à digestão enzimática, alcançando valores superiores a 80% ao utilizar altas cargas de enzima. A maior digestibilidade desses dois bagaços está relacionada com a maior acessibilidade da celulose dos mesmos, confirmado pela coloração de Simons. No bagaço pré-tratado com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$, o aumento da acessibilidade foi resultado da solubilização da lignina. A solubilização da xilana e a possível realocação da lignina resultaram no aumento da acessibilidade da celulose do bagaço tratado por explosão a vapor.

A digestibilidade dos bagaços de cana, independentemente das condições de pré-tratamento, foi diretamente relacionada com a acessibilidade da celulose, sendo esse, um importante efeito limitante causado pela lignina na hidrólise da celulose. Com altas cargas de enzima, quanto maior a celulose superficial acessível, maior foi o rendimento de conversão de celulose. Com baixa carga de enzima, no entanto, a acessibilidade da celulose deixa de ser o fator determinante da eficiência de conversão de celulose, uma vez que não foi observada boa correlação entre os rendimentos de conversão e a celulose superficial acessível.

O extrato Cellic CTec3, em substituição ao extrato Celluclast, se mostrou eficiente na hidrólise do bagaço tratado com sulfito alcalino, resultando em rendimento de hidrólise de aproximadamente 70% com baixa carga de enzimas. Isso foi possível devido à presença das enzimas acessórias no extrato Cellic CTec3, associada ao baixo teor de lignina nesse bagaço. Esse coquetel também foi melhor que Celluclast na hidrólise dos demais bagaços, porém o aumento foi inferior a 10%.

A lignina extraída do bagaço pré-tratado por explosão a vapor apresentou a maior capacidade adsortiva de proteínas, seguida da lignina extraída de bagaço tratado com NaOH . A lignina com menor capacidade adsortiva foi a de bagaço pré-tratado com

Na₂SO₃/NaOH, como resultado da sua maior sulfonação. A sulfonação da lignina residual dos bagaços tratados por Na₂SO₃/NaOH e NaHSO₃/H₂SO₄ resultou na diminuição de suas capacidades adsorptivas, quando comparado com os tratamentos análogos sem a presença de sulfito.

O fenômeno de adsorção improdutivo foi observado nos bagaços pré-tratados com NaOH e por explosão a vapor, uma vez que a adição de BSA ao meio de hidrólise aumentou o rendimento de conversão de celulose, devido ao bloqueio dos sítios de adsorção na lignina. A maior adsorção improdutiva foi uma consequência da maior capacidade adsorptiva da lignina desses dois bagaços.

O melhoramento das enzimas comerciais com relação à diminuição da ligação das mesmas à lignina ficou evidente ao comparar os extratos Celluclast e Cellic CTec3, ambos de *Trichoderma reesei*, uma vez que o aumento dos rendimentos de hidrólise ao adicionar BSA foi menor ao utilizar o extrato mais moderno, indicando menor efeito de adsorção improdutiva, principalmente no bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

Dentre as enzimas celulolíticas do extrato Celluclast, a β -glicosidase foi a que mais adsorveu nas ligninas de bagaço tratado com NaOH e por explosão a vapor, sendo que nessa última, essa enzima ficou quase totalmente adsorvida. As amostras de lignina também adsorveram as endoglucanases e celobiohidrolases do mesmo extrato.

A origem da enzima mostrou grande influência na sua afinidade pela lignina. A β -glicosidase de *A. niger* não adsorveu na lignina de bagaço tratado por explosão a vapor e as CBHI e EGII de *T. longibrachiatum* adsorveram, mas com menor intensidade que as celobiohidrolases e endoglucanases de *T. reesei* (extrato Celluclast).

A inibição pela presença dos compostos fenólicos liberados a partir da lignina pode ser contornada pelo aumento da taxa de hidrólise inicial, uma vez que a solubilização desses compostos aumentou com o tempo de incubação. No entanto, a incubação prévia dos bagaços tratados, sem adição de enzima, resultou no aumento da concentração de fenóis totais no meio, mas não influenciou negativamente na conversão de celulose desses bagaços, utilizando teor de sólidos de 2%. A preincubação dos bagaços não lavados, nesse teor de sólidos, foi positiva ao utilizar baixa carga de enzimas, resultando em melhora na hidrólise devido à presença de compostos fenólicos. De fato, em baixas concentrações, os compostos solúveis liberados a partir dos bagaços pré-tratados, independentemente do pré-tratamento, tiveram efeito positivo na hidrólise da celulose em baixa carga de enzima, provavelmente, por favorecer a ação de enzimas oxidativas e pelo aumento da taxa de

dessorção das enzimas hidrolíticas. Em concentrações mais elevadas, esses mesmos compostos diminuíram o rendimento de hidrólise da celulose em todos os pré-tratamentos.

A enzima CBHI do extrato Celluclast se mostrou mais sensível à presença dos compostos solúveis liberados a partir da incubação dos bagaços não lavados, tanto a 2% de sólidos, quanto a 10%, quando comparada à β -glicosidase do extrato Novozym 188.

Os resultados a respeito da influência dos compostos fenólicos não foram totalmente conclusivos, e mais experimentos são necessários para melhor entender o que realmente acontece durante a hidrólise enzimática na presença desses. Para trabalhos futuros, sugiro a análise da composição dos extratos produzidos pela incubação com bagaços de cana pré-tratados, quanto aos compostos fenólicos monoméricos e poliméricos, para demonstrar o efeito (positivo ou negativo) destes na hidrólise. Com isso, será possível avaliar a influência de cada um desses compostos, individualmente ou em conjunto, determinando, inclusive, a afinidade desses pelas principais enzimas dos extratos enzimáticos, por calorimetria de titulação isotérmica (ITC), por exemplo.

A influência do pré-tratamento na capacidade adsorptiva da lignina ficou evidente nesse trabalho. Por essa razão, outra sugestão é com relação à produção de enzimas menos susceptíveis à adsorção improdutiva. O cultivo de diferentes microrganismos produtores de celulasas em bagaços pré-tratados poderia resultar na produção de enzimas que adsorvam menos à lignina desses materiais.

REFERÊNCIAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 2–16, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

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

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, p. 3, 2011.

ARAÚJO, J. D. P.; GRANDE, C. A.; RODRIGUES, A. E. Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, p. 1024–1032, 2010.

BECKHAM, G. T. et al. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 96–106, 2014.

BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121–124, p. 163–170, 2005a.

BERLIN, A. et al. A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 880–886, 2005b.

BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences**, v. 72, p. 51–56, 1992.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 519–46, 2003.

BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **The Biochemical journal**, v. 382, p. 769–781, 2004.

BRIENZO, M. et al. Comparison study on the biomass recalcitrance of different tissue fractions of sugarcane culm. **BioEnergy Research**, 2014.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 120–130, 2008.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199–204, 2009.

BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **BioEnergy Research**, 2014.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 3, p. 237–259, 2008.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 2011.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 47, p. 445–476, 1996.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CASTRO, R. C. A; ROBERTO, I. C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1553–1564, 2014.

CHANDRA, R. et al. The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, Part 1 : A Modified Simons' staining technique. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1178–1185, 2008.

CHANDRA, R. P. et al. Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 8, p. 1217–22, 2009.

CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Use of the Simons' staining technique to assess cellulose accessibility in pretreated substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 230–237, 2012.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84, p. 5–37, 2000.

CHEN, X. et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 98, 2014.

CHERNOGLAZOV, V. M.; ERMOLOVA, O. V; KLYOSOV, A. A. Adsorption of high-purity endo-1,4-B-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin and xylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 503–507, 1988.

CHERRY, J. R.; GRAY, D. **Integrated biorefinery**. 2013. 112 p. Amyris IBr Final Report.

CHIRAYIL, C. J.; MATHEW, L.; THOMAS, S. Review of recent research in nanocellulose preparation from different lignocellulosic fibers. **Reviews on advanced material science**, v. 37, p. 20–28, 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - Safra 2014/2015**. . Brasília. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 15 fev. 2015.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Optimization of D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton X-100. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 34–38, 2014.

CORTEZ, D. V. et al. Evaluation of cellulosic and hemicellulosic hydrolysate fermentability from sugarcane bagasse hybrids with different compositions. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 0–5, 2014.

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.

CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). **Variedades CTC**. Disponível em <www.ctcanavieira.com.br>. Acesso em: 15 fev. 2015.

DA SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402–7409, 2010.

DALE, M. P. et al. Reversible inhibitors of beta-glucosidase. **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3530–3539, 1985.

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

DENCE, C. W. The determination of lignin. In: LIN, S. Y.; DENCE C. W. **Methods in wood chemistry**. Berlin: Springer, 1992.

DONALDSON, L. A.; WONG, K. K. Y.; MACKIE, K. L. Ultrastructure of steam-exploded wood. **Wood Science Technology**, v. 114, p. 103–114, 1988.

DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913–925, 2008.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

ERIKSSON, I. et al. Fiber swelling favoured by lignin softening. **Wood Science and Technology**, v. 25, p. 135–144, 1991.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 353–364, 2002.

ESCOBAR, J. C. et al. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1275–1287, 2009.

ESTEVES, P. J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Polyoses Hemicelluloses. In: WOOD: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983a.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Utilization of wood and wood components for chemicals and energy. In: WOOD: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983b.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Reactions in acidic medium. In: FENGEL, D.; WEGENER, G. WOOD: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983c.

FERRAZ, A. et al. Controlled release of 2,4-D from granule matrix formulations based on six lignins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 45, p. 1001–1005, 1997.

FERRAZ, A. et al. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, 2000.

FERREIRA, S. DE S. et al. Biofuel and energy crops: high-yield Saccharinae take center stage in the post-genomics era. **Genome biology**, v. 14, p. 210, 2013.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 7, 2010.

FREDHEIM, G. E.; CHRISTENSEN, B. E. Polyelectrolyte Complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 232–239, 2003.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GEHLEN, M. H. Kinetics of autocatalytic acid hydrolysis of cellulose with crystalline and amorphous fractions. **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 245–252, 2010.

GELLERSTEDT, G. The reactions of lignin during sulfite pulping. **Svensk Papperstidning**, v. 79, n. 16, p. 537–546, 1976.

GELLERSTEDT, G. Chemistry of chemical pulping. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Pulping chemistry and technology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

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

GOURLAY, K. et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

GUERRA, A. et al. Toward a better understanding of the lignin isolation process from wood. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5939–47, 2006.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–500, 2010.

HALL, M. et al. Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **The FEBS journal**, v. 277, n. 6, p. 1571–82, 2010.

HAMES, B. et al. Rapid biomass analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 5–16, 2003.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305–3316, 2010.

HAVEN, M. O.; JØRGENSEN, H. Adsorption of β -glucosidases in two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 165, 2013.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.

HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, p. 275–287, 1990.

HOLTZAPPLE, M. T.; HUMPHREY, A. E. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. **Biotechnology and bioengineering**, v. 26, p. 670–676, 1984.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HSU, T.-C. et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4907–4913, 2010.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308, 2014.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

HUMBIRD, D. et al. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**: relatório técnico. Golden: NREL, 2011.

IGARASHI, K. et al. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1279–1282, 2011.

IRVINE, G. M. The significance of the glass transition of lignin in thermomechanical pulping. **Wood Science and Technology**, v. 19, p. 139–149, 1985.

ISHIZAWA, C. I. et al. Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2575-2581, 2007.

JEON, T. et al. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112–122, 2007.

JING, X.; ZHANG, X.; BAO, J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 696–707, 2009.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p. 119–134, 2007.

KANG, Y. et al. SO₂ -catalyzed steam explosion: the effects of different severity on digestibility, accessibility, and crystallinity of lignocellulosic biomass. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 4, p. 909–16, 2013.

KATZ, S.; BEATSON, R. P.; SCALLON, A. M. The determination of strong and weak acidic groups in sulfite pulps. **Svensk papperstidning**, v. 87, n. 6, p. 48–53, 1984.

KHALFAOUI, M. et al. Statistical thermodynamics of adsorption of dye DR75 onto natural materials and its modifications: Double-layer model with two adsorption energies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 3134–3144, 2014.

KIM, T. H. Comparison of inhibition effects of various isolated lignins on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 82–88, 2012.

KRISTENSEN, J. B. et al. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 5, 2008.

KUBICEK-PRANZ, E. M. et al. Characterization of commercial *Trichoderma reesei* cellulase preparations by denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) and immunostaining using monoclonal antibodies. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 14, n. 3, p. 317–323, 1991.

KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 201–208, 2012.

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

LAI, C. et al. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, 2014.

LAMED, R. et al. Efficient cellulose solubilization by a combined cellulosome-B-glucosidase system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, p. 173–183, 1991.

LANDRY, M. R. Thermoporometry by differential scanning calorimetry: Experimental considerations and applications. **Thermochimica Acta**, v. 433, p. 27–50, 2005.

LEE, S. H. et al. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1368–76, 2009.

LEE, Y. H.; FAN, L. T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, p. 939–966, 1983.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 41, p. 455–496, 1990.

LI, J. et al. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 174, 2013.

LI, Y.; QI, B.; WAN, Y. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 167C, p. 324–330, 2014.

LIJNZAAD, P.; BERENDSEN, H. J. C.; ARGOS, P. Hydrophobic patches on the surfaces of protein structures. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 25, n. 3, p. 389–397, 1996.

LIMA, M. A et al. *Aspergillus niger* β -glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape: Insights into glycoside hydrolase family 3 (gh3) β -glucosidase structure and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 32991–33005, 2013.

LINDER, M. et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Protein Science**, v. 4, p. 1056–1064, 1995.

LOU, H. et al. pH-Induced lignin surface modification to reduce nonspecific cellulase binding and enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **ChemSusChem**, v. 6, n. 5, p. 919–27, 2013.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–739, 2002.

MCNEIL, M. et al. Structure and fuction of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625–663, 1984.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 4, p. 890–895, 2013.

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

MILNE, T. A. et al. Standardized analytical methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 2, n. 1991, p. 341–366, 1992.

MING, R. et al. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. In: JANICK, J. **Plant Breeding Reviews**, New York: John Wiley, 2006.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941–94, 2011.

MOONEY, C. A. et al. The effect of lignin content on cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of softwood pulps. In: PROCEEDINGS OF 1997 BIOLOGICAL SCIENCES SYMPOSIUM, 1997. **Anais**. San Francisco, CA: Tappi press

MOONEY, C. A. et al. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwood. **Bioresource technology**, v. 64, p. 113–119, 1998.

MOORE, P. H. Anatomy and morphology. In: SUGARCANE Improvement through Breeding. Developments in Crop Science. [s.l.] Elsevier, 1987. v. 11, p. 85–142.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673–86, 2005.

NAKAGAME, S. et al. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 538–548, 2011a.

NAKAGAME, S. et al. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4507–4517, 2011b.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 871–9, 2010.

NAKATANI, T. et al. Micropore structure of wood: Change in micropore structure accompanied by delignification. **Journal of Wood Science**, v. 54, p. 252–255, 2008.

NOGUEIRA, L. A. H. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008.

O’SULLIVAN, A. Cellulose : the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173–207, 1997.

PAKARINEN, A. et al. Cellulases without carbohydrate-binding modules in high consistency ethanol production process. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 27, 2014.

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

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65–72, 2004.

PAN, X. Role of Functional Groups in Lignin Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 1, p. 25–32, 2008.

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

PRIBOWO, A.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 3, p. 195–203, 2012.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource technology**, v. 101, n. 24, p. 9624–9630, 2010.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843–1246843, 2014.

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood--study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2823–34, 2011.

RAHIKAINEN, J. L. et al. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource technology**, v. 133, p. 270–278, 2013.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, p. 485–497, 1950.

ROSGAARD, L. et al. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 6, p. 1270–1276, 2007.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAMMOND, D. W. et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20960–20969, 2014.

SANTI-JUNIOR, C. et al. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v. 20, n. 6, p. 3165–3177, 2013.

SANTOS, M. F. R. F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. Biorefinery in brazil: New technological trends adopted by domestic companies. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 5, n. 2, p. 84–90, 2010.

SANTOS, V. T. O. et al. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1089–98, 2011.

SEABRA, J. E. A. et al. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1065–1078, 2010.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. 8 p. Master of Science Thesis. Department of Chemical Engineering, Lund University, 2005.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1823–1828, 1997.

SHUAI, L. et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 9, p. 3106–14, 2010.

SIMONS, F. L. A stain for use in the microscopy of beaten fibers. **TAPPI**, v. 33, n. 7, p. 312–314, 1950.

SIQUEIRA, G. et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011.

SIQUEIRA, G. et al. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

SLININGER, P. J. et al. Evaluation of a kinetic model for computer simulation of growth and fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* fed D-xylose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 8, p. 1532–1540, 2014.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–11, 2004.

STARCHER, B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. **Analytical biochemistry**, v. 292, n. 1, p. 125–9, 2001.

STONE, J. E.; SCALLAN, A. M. A Structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules. **Cellulose Chemistry Technology**, v. 2, p. 343–358, 1986.

SUN, J.-X. et al. Inhomogeneities in the Chemical Structure of Sugarcane. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 6719–6725, 2003.

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

TAI, C.; KESHWANI, D. Impact of pretreatment with dilute sulfuric acid under moderate temperature on hydrolysis of corn stover with two enzyme systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2628–2639, 2014.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689–692, 1987.

TANAKA, M. et al. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p. 177–183, 1981.

TEERI, T. T. et al. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? **Biochemical Society transactions**, v. 26, n. 1997, p. 173–178, 1998.

TEMPLETON, D. W. et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9054–9062, 2010.

TIAN, S. et al. Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8678–85, 2010.

TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource technology**, v. 157, p. 68–76, 2014.

TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Adsorption of cellulase on cellulytic enzyme lignin from lodgepole pine. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7771–7778, 2009.

ÚNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Bioeletricidade**: a energia verde e inteligente do brasil. Disponível em: <www.unicadata.com.br>. Acesso em 15 fev. 2015.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, p. 219–222, 2010.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 185–193, 2010.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 30, 2013.

VINZANT, T. B. et al. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91-93, p. 99–107, 2001.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 301–307, 2008.

WANG, Z. et al. Lignosulfonate-mediated cellulase adsorption: enhanced enzymatic saccharification of lignocellulose through weakening nonproductive binding to lignin. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 156, 2013.

WANG, Z.; LAN, T.; ZHU, J. Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 9, 2013.

WENDE, G.; FRY, S. C. o-Feruloylated, o-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1011–1018, 1997.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGS, S. T. (Eds.). **Methods in enzymology**. London: Academy Press, 1988.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170–176, 2010.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 88–95, 2004.

YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 611–7, 2006.

YU, X.; MINOR, J. L.; ATALLA, R. H. Fiber Analysis Mechanism of action of Simons ' stain. **TAPPI**, v. 78, n. 6, p. 175–180, 1995.

YU, Z. et al. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. **ChemSusChem**, v. 7, n. 7, p. 1942–50, 2014.

ZENG, M. et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: Enzymatic hydrolysis (part 1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 390–397, 2012.

ZHANG, Q. et al. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3-5, p. 445–450, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815–27, 2009.

ZHAO, Y. et al. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China Series C**, v. 47, n. 1, p. 18, 2004.

ZHU, J. Y. et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–8, 2009.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4992–5002, 2010.

APÊNDICE A – COEFICIENTES DE EXTINÇÃO MOLAR DOS CORANTES *DIRECT ORANGE* E *DIRECT BLUE*

Figura A1: Determinação do coeficiente de extinção molar ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$) em 455 nm (a) e 624 nm (b) da solução do corante laranja (*Direct Orange*), utilizado nos experimentos da medida da celulose superficial acessível. Os coeficientes de extinção molar correspondem ao coeficiente angular das curvas.

Fonte: arquivo pessoal

Figura A2: Determinação do coeficiente de extinção molar ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$) em 455 nm (a) e 624 nm (b) da solução do corante azul (*Direct Blue*), utilizado nos experimentos da medida da celulose superficial acessível. Os coeficientes de extinção molar correspondem ao coeficiente angular das curvas.

Fonte: arquivo pessoal.

APÊNDICE B – CURVAS DE ADSORÇÃO DOS CORANTES NOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS

Figura B1: Curvas de adsorção do corante laranja (a) e do corante azul (b) no bagaço de cana tratado com NaOH.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura B2: Curvas de adsorção do corante laranja (a) e do corante azul (b) no bagaço de cana tratado com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$.

Fonte: arquivo pessoal

Figura B3: Curvas de adsorção do corante laranja (a) e do corante azul (b) no bagaço de cana tratado com H_2SO_4 .

Fonte: arquivo pessoal.

Figura B4: Curvas de adsorção do corante laranja (a) e do corante azul (b) no bagaço de cana tratado com $\text{NaHSO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura B5: Curvas de adsorção do corante laranja (a) e do corante azul (b) no bagaço de cana tratado por explosão a vapor.

Fonte: arquivo pessoal.