UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

OMAR ANTONIO UYARTE NORIEGA

Sistemas oxidativos e biomiméticos aplicados à hidrólise enzimática de
materiais lignocelulósicos

Lorena
2016

OMAR ANTONIO UYARTE NORIEGA

Sistemas oxidativos e biomiméticos aplicados à hidrólise enzimática de
material lignocelulósico

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.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz

Versão original

Lorena

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

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

Uyarte Noriega, Omar Antonio

Sistemas oxidativos e biomiméticos aplicados à
hidrólise enzimática de material lignocelulósico /
Omar Antonio Uyarte Noriega; orientador André Luís
Ferraz - Versão Original. - Lorena, 2016.
127 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. 2016
Orientador: André Luís Ferraz

1. Bagaço-de-cana de açúcar. 2. Sistemas
biomiméticos oxidativos. 3. Reação de fenton. 4.
Deslignificação. 5. Hidrólise enzimática. I. Título.
II. Ferraz, André Luís , orient.

Dedico este trabajo a mis padres Patricia y Omar, por entregarnos lo mejor de sí. A mis hermanos, Leonardo, Rodolfo y Patricio, por su inamovible voluntad de aprender y disfrutar de ello. Para Carlaile, por todo su apoyo, paciencia y confianza. Para mis abuelas Susana y Doris por todo el amor compartido. Para mis abuelos Juan y Samuel, in memoriam.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por entregar a oportunidade de cumprir seu plano.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e incentivo para cumprir meus objetivos de vida.

Ao professor Dr. André Ferraz, por estar presente em todos os momentos, por todos seus ensinamentos, paciência e conselhos ao longo de todos esses anos.

À professora Dra. Adriane Milagres, pelo seu constante apoio e suporte.

Aos meus queridos amigos, Zé Moreira e Zé Cobrinha, pelo grande apoio técnico amizade, e alegria.

Ao professor David Contreras, pelo suporte, disposição e ensinamentos.

Aos professores Flavio Ferraz e João Paulo, pela ajuda objetiva e crítica do trabalho.

Aos professores Dr. Barry Goodell e Dra Jody Jellison, pela amizade, ensinamentos e suporte.

Aos meus caros colegas do laboratório em VT Huichiro Otsuka, Tomonori Sonoki, Ata, Lam, Yimin, Alison, pela amizade, ajuda, camaradaria e discussões de trabalho.

Aos meus amigos de Blacksburg, Javiera e Marcelo, Lourdes, Katia, Betty, Valentina e Kristóbal, Ma Cristina, Miguel e Josse, Sandra e Carlos, pela grande amizade e convivência.

Aos meus tios, que contribuíram no meu crescimento.

Aos meus primos, afilhado e sobrinhos, pela alegria de compartilhar bons momentos e poder vê-los crescer.

À Carlaile, por caminhar junto de meu lado e demonstrar que, com coragem e perseverança, pode-se cumprir grandes metas.

A María Fernanda e Felipe, pelos momentos de patriotismo e sanas convivências.

À Escola de Engenharia de Lorena, pelo suporte e estrutura.

Aos meus grandes amigos do departamento Debiq, Flavio, Guedes, Fernando M., Claudinho, Ceceu, Aline, Paula, Victor, Germano, Pepel, Thales, Fernanda V., Maiara P., Dayelle, Paulinha, Angela, André Silva, Larissa, Isabela F., Wagner, Gabi, Segato, Dani, Pará, Japa, Eduardo, Lázaro, Renan, Andrés, Diego, Orerves, Annie, Javier, Ruly, Lina, Sara e Rodrigo por todos os momentos de alegria e descontração.

Aos meus amigos da EEL, Said, Ned, Passivo, Vini, Mary, Jader, Gabs, Amanda, Baea, Gabriel, Ian, à Laje em geral, pelo grande recebimento e momentos de relaxo.

Aos projetos Fapesp 2012/074120 e BEPE 2013/04481-3 pelo auxílio durante o doutorado direto e financiamento no exterior, respectivamente.

*“La posibilidad de innovar siempre
está ahí si uno está dispuesto a reflexionar, a
soltar la certidumbre de donde está parado, y
a preguntarse si quieres estar donde estás”*

Alberto Maturana

RESUMO

UYARTE NORIEGA, O. A. **Sistemas oxidativos e biomiméticos aplicados à hidrólise enzimática de material lignocelulósico**. 2016. 127p Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena - SP. 2016.

Inúmeros trabalhos da literatura científica mostram que a remoção parcial de lignina é útil para facilitar o processo de sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos. No entanto, a maioria dos processos de deslignificação aplica condições severas de reação e apresenta custos elevados de processo. Uma alternativa aos processos mais severos de deslignificação envolve a aplicação de sistemas biomiméticos. Estes sistemas demandam condições amenas de reação, compatíveis com a etapa de hidrólise enzimática, porém geralmente são mais lentos e menos eficientes do que os pré-tratamentos químicos e quimiotermodinâmicos convencionais. Ponderando estes fatos, o objetivo desta tese foi estudar a aplicação de sistemas oxidativos e biomiméticos na deslignificação de materiais lignocelulósicos prévios a uma etapa de hidrólise enzimática da fração polissacarídica. A estratégia de trabalho consistiu em pré-tratar bagaço de cana (foram empregados 3 cultivares diferentes de cana no presente estudo) com um processo quimiotermodinâmico (CTM) em condições amenas de reação (5,0% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH) seguido de um tratamento biomimético oxidativo. Esta abordagem visou gerar um material parcialmente deslignificado que pudesse ter a recalcitrância significativamente diminuída pela aplicação de um processo biomimético. Um segundo pré-tratamento foi aplicado em condições mais severas de reação (10% de Na_2SO_3 e 5,0% de NaOH) e visou gerar um material de referência, com baixa recalcitrância. Os sistemas biomiméticos empregados tiveram origem nos processos naturais de biodegradação de madeira por fungos de decomposição branca e parda e envolveram a ação de: a) Manganês peroxidase, Lacase, ferro e Oxigênio; b) reação de Fenton mediada por quelantes. Estes sistemas foram suplementados ou não com ácidos graxos insaturados, visando gerar radicais organoperoxila no caso dos sistemas suplementados. As reações de Fenton mediadas por quelantes apresentaram emissão de quimiluminescência, o que permitiu otimizar o sistema reacional com base na máxima quimiluminescência obtida. A remoção de lignina obtida com o pré-tratamento CTM variou de acordo com a carga de sulfito alcalino empregada, sendo que para as severidades baixa e alta, a remoção de lignina atingiu 26% e 54%, respectivamente. Os sistemas biomiméticos aplicados no bagaço de cana, após pré-tratamento com sulfito alcalino na condição branda, produziram graus de deslignificação variáveis, sendo que as principais remoções de lignina foram obtidas com o tratamento de Fenton mediado por quelantes e com Oxigênio, atingindo remoções acumuladas de lignina de 44% e 62%, respectivamente. Em todos os casos avaliados, a remoção adicional de lignina promoveu maiores eficiências de conversão enzimática das frações polissacarídicas residuais. A maior conversão de celulose e hemicelulose (acima de 80%) foi obtida com o tratamento Fenton mediado por quelantes aplicado sobre um cultivar de cana de açúcar que apresentava elevado teor de ácidos hidroxicinâmicos, sugerindo uma ação eficiente destes sistemas para a remoção destes ácidos hidroxicinâmicos.

Palavras-chave: Bagaço de cana de açúcar. Sistemas biomiméticos oxidativos. Reação de Fenton. Radical hidroxila. Deslignificação. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

UYARTE NORIEGA, O. A. **Oxidative-biomimetic systems applied to enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials**. 2016. 127p Thesis (Doctor in Science). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena - SP. 2016.

The current scientific literature shows that lignin removal can facilitate subsequent processes of enzymatic saccharification of lignocellulosic materials. However, most of the delignification processes use severe reaction conditions and present high process costs. One alternative for the severe delignification processes includes the use of biomimetic systems. These systems can be applied under mild reaction conditions, which are compatible with the enzymatic hydrolysis step. Nevertheless, biomimetic systems usually present low reaction rates and are less efficient than the more severe chemical and chemithermomechanical processes. Weighing these facts, the main subject of the current PhD thesis was to study oxidative biomimetic systems suitable for delignification of lignocellulosic materials as a previous step to the enzymatic hydrolysis of the polysaccharide fraction. The experimental approach involved the pretreatment of sugar cane bagasse (three different sugar cane cultivars were evaluated) by a chemithermomechanical (CTM) process under mild reaction conditions (5% of Na_2SO_3 and 2.5% NaOH), followed by an oxidative-biomimetic system. This approach aimed to prepare a partially delignified material suitable to be treated by the subsequent biomimetic systems, providing significant changes in the material recalcitrance. A second pretreatment under more severe reaction conditions (10% Na_2SO_3 and 5% NaOH) was performed to prepare a reference material with low recalcitrance. The biomimetic systems used in the current work were based on natural wood decay processes involving white- and brown-rot fungi, and include the actions of: a) Manganese peroxidase, Laccase, Iron ions and Oxygen; b) Chelator Mediated Fenton reactions (CMF). This reaction systems used (or not) the presence of unsaturated fatty acids to induce formation of organoperoxyl radicals. The CMF reactions presented chemiluminescence, which enabled the reaction optimization with basis on maximal chemiluminescence. The lignin removal during the CTM pretreatment varied according to the alkaline-sulfite load used in the reaction. The delignification increased with increased alkaline sulfite loads reaching 26% and 54% for the less severe and more severe reaction conditions, respectively. Biomimetic systems applied over the mild pretreated sugar cane bagasse produced varied delignification levels, reaching maximal values for cumulative lignin removal of 44% and 62% for the CMF and Oxygen, respectively. In all cases, the supplementary removal of lignin resulted in more efficient enzymatic hydrolysis of the polysaccharide fraction. The highest cellulose and hemicellulose conversions (over 80%) was obtained with the CMF system applied on a sugar cane cultivar that contained high hydroxycinnamic acids contents, suggesting an efficient action of CMF systems for hydroxycinnamic acids removal.

Keywords: Sugarcane bagasse. Biomimetic system. Fenton reaction. Hydroxyl radical. Delignification. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de acoplamento entre lignina e hemicelulose via ácidos	27
Figura 2 – Relação entre a extensão da remoção de lignina em <i>Acer sp.</i> com a digestibilidade enzimática da celulose	32
Figura 3 – Ciclo catalítico simplificado de Lignina-peroxidase (LiP). S representa um substrato aromático não fenólico	35
Figura 4 – Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (MnP). RH representa um substrato fenólico.....	36
Figura 5 – Ciclo catalítico da Lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu ²⁺ (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O ₂	36
Figura 6 – Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn ³⁺ ou radical hidroxila....	38
Figura 7 - Degradação de composto modelo de lignina por radicais organoperoxila. Duas vias de oxidação são possíveis: a) oxidação de C α seguida de clivagem β -O-4 e b) oxidação inicial do anel aromático seguida de clivagem (oxidação) C α -C β	39
Figura 8 - Consumo de oxigênio durante a peroxidação de ácido linoléico iniciada por íons A) Fe ²⁺ e B) Fe ³⁺ (controle).....	41
Figura 9 - Alterações no n° kappa (A) e alvura (B) de polpa de <i>E. globulus</i> tratada com Lacase e mediadores naturais e artificial (HBT). (AS Siringaldehído; AS acetosiringona; PCA ácido p-cumárico; HBT 1- hidroxibenzotriazole).	43
Figura 10 – A Formação de radicais fenoxila e superoxiânion por reação de estruturas fenólicas com O ₂ em meio alcalino do OH fenólico, B) Decomposição de estruturas fenólicas em estruturas secundárias com oxigênio em meio alcalino.....	44
Figura 11 - Reações secundárias de radicais de oxigênio com carboidratos de carboidratos	45
Figura 12 - Principais reações de decomposição do polímero de celulose a través da quebra de ligação B-O-4 da cadeia de celulose	45
Figura 13 - Ciclo redox da reação de Fenton mediada por agentes quelantes.	50
Figura 14 - Absorção no UV dos sobrenadantes da reação de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: A) 5% Na ₂ SO ₃ , 2,5% NaOH e; B) 10% Na ₂ SO ₃ , 5% NaOH, com sistemas oxidativos baseados na ação de MnP. (+MnP) corresponde à mistura reacional contendo MnP / Mn ²⁺	71

Figura 15 - Hidrólise enzimática de amostras de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: (10/5) 10% Na ₂ SO ₃ , 5% NaOH e; (5/2,5) 5% Na ₂ SO ₃ , 2,5% NaOH. (+MnP) corresponde à mistura reacional contendo MnP / Mn ²⁺ / Tween 80 / Glicose – Glicose...	72
Figura 16 - Hidrólise enzimática de amostras de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: (10/5) 10% Na ₂ SO ₃ , 5% NaOH e; (5/2,5) 5% Na ₂ SO ₃ , 2,5% NaOH. (+Lacase) corresponde à mistura reacional contendo Lacase comercial / Tween 80 / ácido hidróxibenzoico / MnSO ₄ / tampão acetato de sódio, além das enzimas celulolíticas comerciais; (-Lacase) corresponde aos controle sem a adição de Lacase no meio reacional.....	73
Figura 17 - A) Conversão dos polissacarídeos após 72 hrs de reação e B) velocidades iniciais de reação determinadas após 4 h de hidrólise de bagaço de cana tratado com sulfito alcalino e O ₂ na presenças de distintas concentrações de Tween 80 ou ácido linoleico.Tratamentos: somente O ₂ , (B) Sulfito alcalino; (C) Sulfito alcalino seguido de O ₂ ;	80
Figura 18 - Conversão de celulose após 72 h de hidrólise com enzimas comerciais. Os tratamentos baseados em MnP e Lacase foram aplicados sobre material previamente pré-tratado com sulfito alcalino. (1) Bagaço de cana <i>in natura</i> (sem pré-tratamento) (Mendes et al., 2011); (2). Bagaço tratado somente com O ₂ ; (3). Bagaço tratado com sulfito alcalino na condição branda (5% Na ₂ SO ₃ , 2,5% NaOH); (4) Sulfito alcalino na condição branda + MnP; (5) Sulfito alcalino na condição branda + Lacase comercial; (6) Sulfito alcalino na condição severa + MnP; (7). Sulfito alcalino na condição severa (condição pré-otimizada usada como referência); (8). Sulfito alcalino condição severa + Lacase comercial; (9) Sulfito Alcalino condição branda + O ₂ + Tween 80; (10). Sulfito alcalino condição branda + O ₂	83
Figura 19 - Decaimento de QL gerada pela reação de Fenton em presença de Tween 80 e bagaco de cana	90
Figura 20 - Perfil de QL em função do tempo de reação para reações CMF ausência (A) ou	94
Figura 21 - Perfil de QL em função do tempo de reação para reações CMF na ausência (A) ou presença de Tween 80 (B), Tween 80 + bagaço pré-tratado (C) e Tween 80 + Avicel (D).....	95
Figura 22 - Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) na Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino submetido a uma etapa posterior de tratamento oxidativo no sistema CMF. T1: sistema CMF (0.15mM Fe ³⁺ e catecol; 50mM	

H₂O₂; 0.35 % p/p Tween 80; 4 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe³⁺; T4: controle sem lavagem alcalino.100

Figura 23 - Conversão enzimática de açúcares estruturais de bagaço de cana de usina pré – tratado com sulfito alcalino e subsequente aplicação de sistema oxidativo CMF T1: sistema CMF (1mM Fe³⁺, 0.15mM catecol; 50mM H₂O₂; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe³⁺; T4: controle sem lavagem alcalino.102

Figura 24 - Conversão enzimática de celulose e hemicelulose de bagaço de referência (RC) pré- tratado com sulfito alcalino e subsequentemente com o sistema oxidativo CMF. T1: sistema CMF (1mM Fe³⁺, 0.15mM catecol; 50mM H₂O₂; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe³⁺; T4: controle sem lavagem alcalino.110

Figura 25 - Conversão de celulose e xilana de clone 58, pré-tratado com sulfito alcalino (SA) e subsequentemente com sistema oxidativo CMF. T1: sistema CMF (1mM Fe³⁺, 0.15mM catecol; 50mM H₂O₂; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe³⁺; T4: controle sem lavagem alcalino.111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da biomassa lignocelulósica segundo o tipo de planta	25
Tabela 2 - Características do pré-tratamento com sulfito alcalino, rendimento de sólidos e composição do bagaço de cana submetido ao pré-tratamento	68
Tabela 3 - Atividade de MnP e absorbância relativa em 280 nm de extratos enzimáticos oriundos do cultivo de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira de <i>E. grandis</i>	69
Tabela 4 - Detalhes dos tratamentos, rendimentos de sólidos e composição química de bagaço industrial tratado com O ₂ em meio alcalino	77
Tabela 5 - Área total de QL calculadas a partir dos gráficos de QL em função do tempo de (gráficos gerados para sistemas Fenton aplicados no tratamento de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino). Os sinais - e + para a variável H ₂ O ₂ representam concentrações de 2mM e 50 mM, respectivamente. Para Tween 80, e ácido linoléico, os sinais - e + representam 0,00 e 0,35 g do ácido graxo/100 g bagaço seco, respectivamente. Para o bagaço pré-tratado os sinais - e + representam 0 ou 10g/L de bagaço pré-tratado, respectivamente	89
Tabela 6 - Efeitos das variáveis de reação sobre a quimiluminescência decorrente da reação de Fenton realizada de acordo com os experimentos descritos na Tabela 5.....	91
Tabela 7 - Área de QL decorrente de reações de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) com distintos substratos e suplementada com ácidos graxos e a presença de 10 g/L de bagaço de cana pré-tratado.....	92
Tabela 8 - Composição química do material lignocelulósico após tratamento oxidativo da reação de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) suplementado com Tween 80 ...	98
Tabela 9 - Composição química bagaço de cana de referência (RC) e híbrido 58 após tratamento oxidativo da reação de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) suplementado com Tween 80	106
Tabela 10 - Balanço de massas de ácidos hidroxicinâmicos dos distintos materiais lignocelulósicos antes e depois dos pré-tratamento com sulfito alcalino e tratamento baseado na reação de Fenton	109

ABREVIATURAS E SIGLAS

SPORL	: Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose
CMF	: Chelator Mediated Fenton
CTM	: Chemio – Thermo – Mechanical
OH	: Radical Hidroxila
MnP	: Manganês Peroxidasase
SA	: Sulfito Alcalino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	O etanol celulósico e as biorrefinarias como alternativa para a matriz energética atual	23
2.2	Composição da biomassa lignocelulósica.....	25
2.3	O papel da lignina na recalcitrância da biomassa lignocelulósica	27
2.4	Biodegradação de lignina por fungos saprófitos.....	33
2.5	Sistemas de degradação de lignina baseados na geração de radicais peroxila.....	37
2.5.1	Geração de radicais organoperoxila iniciados por MnP	37
2.5.2	Sistemas de degradação de lignina baseados em Fe ²⁺	40
2.5.3	Sistemas de degradação de lignina baseados em Lacase	41
2.6	O processo de deslignificação empregando oxigênio	43
2.7	Decomposição de materiais lignocelulósicos pelo sistema Fenton	46
2.7.1	Sistema Fenton.....	47
2.8	O processo sulfito alcalino como etapa de pré-tratamento	50
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	53
4	OBJETIVOS.....	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	Parte 1 - Sistemas oxidativos baseados na ação de Manganês peroxidase, Lacase e O ₂	55
5.1.1	Preparação de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino empregando o processo quimiotermomecânico (CTM)	55
5.1.2	Enzimas oxidativas empregadas no tratamento do bagaço de cana.....	56
5.1.3	Tratamento do bagaço pré-tratado com enzimas oxidativas	58
5.1.4	Tratamento do bagaço com oxigênio em meio alcalino	59
5.1.5	Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos	59
5.2	Parte 2 - Sistemas oxidativos baseados na reação de Fenton.....	61
5.2.1	Preparação de bagaço pré-tratado por processo quimiotermomecânico (CTM)	61

5.2.2	Tratamento dos substratos pela reação de Fenton e detecção da quimiluminescência (QL) resultante	62
5.2.3	Ampliação de escala da reação de Fenton e hidrólise enzimática dos substratos obtidos	63
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6.1	Parte 1 - Tratamento de bagaço de cana com sistemas oxidativos baseados na ação de Manganês peroxidase, Lacase e O ₂	65
6.2	Pré-tratamento de bagaço de cana com sulfito alcalino (processo quimiotermodinâmico).....	66
6.3	Preparação e purificação parcial de MnP produzida por Ceriporiopsis subvermispora	69
6.4	Tratamento do bagaço pré-tratado empregando o sistema oxidativo baseado em MnP.	71
6.4.1.	Tratamento do bagaço pré-tratado empregando o sistema oxidativo baseado em Lacase	73
6.4.2.	Tratamento do bagaço de cana com sulfito alcalino e com O ₂ em meio alcalino	75
6.5	Hidrólise enzimática dos substratos gerados na etapa de tratamento com O ₂	79
6.6	Correlação entre a extensão da remoção de lignina e a eficiência de hidrólise enzimática	82
7	CONCLUSÕES REFERENTES AOS SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA AÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE, LACASE E O₂	85
8	PARTE 2 - SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA REAÇÃO DE FENTON.....	86
8.2	Composição química e hidrólise enzimática do material lignocelulósico tratado nos sistemas CMF	96
8.3	Sistemas oxidativos baseados na reação de Fenton aplicados em bagaço de cana oriundo de plantas selecionadas por conter baixo teor original de lignina	103
9	CONCLUSÕES - SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA REAÇÃO DE FENTON.....	113
	REFERÊNCIAS.....	115

APENDICE A.....126

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as principais fontes mundiais de energia são derivadas de combustíveis fósseis, cuja utilização gerou 32 bilhões de ton do CO₂ no ano 2014 (IEA, 2015). Paralelamente, o homem tem buscado alternativas energéticas que sejam sustentáveis e que apresentem um rendimento que satisfaça aos requerimentos atuais de industrialização e minimizem a emissão de gases de efeito estufa. Neste contexto, a produção de etanol e outros combustíveis a partir de biomassa representam mais uma opção para a matriz energética mundial.

Diversos tipos de biomassa podem ser empregados para a produção de biocombustíveis líquidos. No Brasil, as usinas de açúcar e álcool produzem quantidade apreciável de bagaço de cana como sub-produto. Trata-se de matéria prima lignocelulósica que, após hidrólise da fração polissacarídica, pode gerar monossacarídeos úteis para a produção de etanol ou outros combustíveis. Se considerarmos que os custos de transporte deste material já são assumidos pela indústria de açúcar álcool, ele torna-se muito relevante devido ao grande potencial que possui como matéria prima para as biorrefinarias (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2009).

Grande parte do setor florestal e agrícola tem implementado, há décadas, programas de melhoramento genético por seleção e posterior cruzamento de indivíduos que apresentem características de interesse comercial. A geração de plantas selecionadas, particularmente com baixa recalcitrância, pode dar origem a uma nova linha de processos na área dos biocombustíveis, pois estes materiais podem demandar menor severidade de pré-tratamento e menor carga de enzimas durante a sacarificação (HIMMEL et al., 2007; LAURITO-FRIEND et al., 2015). Os sistemas biomiméticos podem ser úteis para dar origem a processos de pré-tratamento menos severos. Neste contexto, o objetivo da presente tese envolve o emprego de sistemas biomiméticos oxidativos que, quando

aplicados sobre um material lignocelulósico pré-tratado em condições brandas de reação, permitam promover uma deslignificação adicional e/ou uma modificação estrutural dos componentes do material lignocelulósico, visando torná-lo mais susceptível à hidrólise enzimática.

A descrição do trabalho foi feita na forma de uma revisão bibliográfica geral sobre o tema, seguida da apresentação da metodologia experimental empregada e dos resultados obtidos. Para objetividade da discussão dos dados, os itens foram separados em capítulos de acordo com o sistema oxidativo empregado. O primeiro deles aborda o uso de enzimas oxidativas e O_2 como agentes de transformação da biomassa (Parte 1), enquanto que o segundo capítulo aborda o emprego da reação de Fenton, buscando mimetizar o modo de ação empregado por fungos de decomposição parda (Parte 2).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O etanol celulósico e as biorrefinarias como alternativa para a matriz energética atual

No ano de 2015 a produção mundial de etanol alcançou 96.4 milhões de m³, sendo que os EUA e o Brasil foram os principais produtores, atingindo 58 % e 28 % da produção total, respectivamente (RFA, 2015). Entre os principais destinos deste produto estão seu uso como combustível (nacional ou exportação) e uso na fabricação de plástico.

Além do Brasil e dos EUA, vários outros países como Índia, China, Tailândia, Nova Zelândia e Canadá têm considerado o uso de biocombustíveis na matriz energética (TOHKA et al., 2010). A União Européia (EU) também tem se organizado no mesmo sentido e colocou em marcha uma estratégia na qual parte de seu consumo energético deve advir de biomassa e fontes renováveis (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; LAMERS et al., 2015). Além disso, alguns dos países europeus têm suas próprias diretrizes no tema, como é o caso da Suíça e da Finlândia, que planejam ter no ano de 2020 40% e 38% da energia consumida no país, respectivamente, como originária de biomassa (SIMS; SAYIGH, 2004; TOHKA et al., 2010). Até agora, as principais fontes de matéria prima para a fabricação do etanol são a sacarose de cana no Brasil e o amido de milho nos EUA (GOLDEMBERG; GARDUABASI, 2009, SHAPOURI; DUFFIELD; WANG, 2002). No entanto, dada a elevada demanda atual e futura pelos biocombustíveis, muitos pesquisadores e governos têm focado atenção na possibilidade de explorar fontes de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol ou outros biocombustíveis similares. Entre as fontes de biomassa mais estudadas atualmente estão os resíduos agrícolas e os produtos gerados pelo setor florestal (BUCKERIDGE et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica apresenta algumas vantagens para uso como um insumo para processos industriais. Entre as vantagens pode-se destacar a abundância na qual se

encontra no planeta, a composição química rica em polissacarídeos, a possibilidade de gerar subprodutos de interesse comercial e a plasticidade para gerar energia por várias vias, incluindo processos bioquímicos e termoquímicos (NANDA; DALAI; KOZINSKI, 2014). No entanto, principalmente as rotas bioquímicas de conversão são limitadas pela necessidade de uma etapa de pré-tratamento que visa tornar a matriz lignocelulósica mais permeável, expondo os polissacarídeos para a ação subsequente das enzimas hidrolíticas que farão a conversão das frações poliméricas em monômeros susceptíveis à fermentação. Esta etapa de pré-tratamento envolve um custo expressivo para o processo (NWAKAIRE; EZEHOA; UGWUISHIWU, 2013).

Atualmente, várias empresas internacionais tem materializado investimentos em plantas de produção de etanol oriundo de materiais lignocelulósicos (etanol de segunda geração - 2G). Uma destas plantas está instalada no nordeste do Brasil (estado do Alagoas) e tem uma capacidade de produção de 83 mil m³ de etanol/ano. Trata-se de uma empresa brasileira (GranBio Investimentos S.A) em associação com outra internacional (Beta Renewables, pertencente ao grupo Mossi e Guisolfi), que já possui a primeira planta de produção de etanol 2G, localizada em Crescentino, Itália (www.gruppomg.com). As plantas industriais irão empregar a tecnologia denominada PROESA©, na qual se realiza o processo de pré-tratamento por explosão ao vapor. Estas biorefinarias utilizarão, para seu abastecimento energético, a eletricidade gerada pela combustão da lignina oriunda do material lignocelulósico empregado como matéria prima no processo. As etapas de sacarificação e fermentação serão realizadas de forma simultânea e as enzimas a serem utilizadas serão providenciadas por meio de um convênio feito entre a Beta Renewables e a Novozymes (www.gruppomg.com).

2.2. Composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos. Todos os componentes variam em quantidade dependendo da espécie vegetal, das condições de plantio e crescimento da planta e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. De uma forma geral, a tabela 1 apresenta a composição média de plantas divididas em 3 grandes grupos (MCKENDRY, 2002). A celulose é o polímero mais abundante nos materiais lignocelulósicos. Trata-se de um polímero com estrutura linear, composta por unidades repetitivas de anidro glicose que estão unidas por ligações β -1,4-glucopiranosil, apresentando o oxigênio glicosídico sempre na posição equatorial. As cadeias de celulose se encontram unidas por pontes de hidrogênio que também podem se formar entre os monômeros de uma mesma cadeia. A linearidade da molécula e a existência das pontes de hidrogênio geram um alto grau de ordenamento na macromolécula o que resulta na formação de estruturas supramoleculares cristalinas. A celulose é insolúvel na maioria dos solventes, inclusive a água. Estes fatores em conjunto fazem com que a molécula seja bastante recalcitrante tanto para os micro-organismos, como para os sistemas enzimáticos e até mesmo para processos de hidrólise ácida (HIMMEL et al., 2007; MATTHEWS et al., 2006).

Tabela 1 – Composição da biomassa lignocelulósica segundo o tipo de planta

Grupo de plantas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Coníferas	35-40	20-25	27-30
Folhosas	45-50	25-30	20-25
Gramíneas	35-45	10-40	17-24

Fonte: Mckendry (2002)

As hemiceluloses são formadas por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos (SAHA, 2003). Trata-se de um polissacarídeo que, devido à forma de sua biossíntese e à presença de grupos pendentos, não forma estruturas compactas e cristalinas como a celulose. As principais hemiceluloses em folhosas são as arabinoglucuronoxilanas, enquanto que em coníferas predominam as galactoglucomanas e as glucuronoxilanas. Em gramíneas, a principal hemicelulose encontrada é a 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana (WILLFÖR et al., 2005a, 2005b).

A lignina é uma macromolécula aromática complexa cuja formação ocorre através da polimerização radicalar de álcoois fenil propenos como o *p*-cumarílico, o coniferílico e o sinapílico (GRABBER; RALPH; HATFIELD, 1998). Estes componentes se encontram em distintas quantidades de acordo com a espécie vegetal. Por exemplo, em madeira de coníferas predominam derivados de álcool coniferílico, em lignina de folhosas é possível encontrar tanto o álcool coniferílico como o sinapílico e em gramíneas se encontra também o álcool *p*-cumarílico.

Nas gramíneas, parte da lignina pode estar ligada covalentemente à hemicelulose através de ligações que contam com os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico ou cumárico) como ponte entre os polímeros. Usualmente se encontra uma ligação éster entre a carboxila do ácido ferúlico e o oxigênio de um álcool na posição 5 das arabinoses. O oxigênio da posição 4 dos ácidos hidroxicinâmicos forma uma ligação éter com a lignina, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema de acoplamento entre lignina e hemicelulose via ácidos hidróxicinâmicos

Fonte: Adaptado de Grabber, Ralph e Hatfield (1998)

Uma fração dos ácidos hidroxicinâmicos (principalmente ácido cumárico) pode estar esterificada diretamente no álcool do carbono δ da cadeia lateral da lignina (DEL RÍO et al., 2015).

Do ponto de vista biotecnológico, os polissacarídeos presentes no complexo lignocelulósico podem ser convertidos em monossacarídeos e empregados, por exemplo, na produção de etanol através da fermentação, ou outros compostos de interesse comercial. No entanto, dada a organização complexa de todos os componentes da parede celular vegetal, o acesso aos polissacarídeos é restrito do ponto de vista físico (GLASS et al., 2013; ZENG et al., 2014). Esta dificuldade de acesso das enzimas aos polissacarídeos da parede celular lignificada tem sido denominado como recalcitrância da parede celular aos processos de desconstrução (FERRAZ et al., 2014; MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

2.3. O papel da lignina na recalcitrância da biomassa lignocelulósica

A eficiência da etapa de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica depende, essencialmente, do acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos (LACAYO et al., 2013; PU et al., 2013; SATHITSUKSANOH et al., 2013). Para melhorar o acesso das

enzimas hidrolíticas à celulose tem sido demonstrado que o uso de pré-tratamentos químicos é uma via efetiva de sucesso (ELGHARBAWY et al., 2016; HIMMEL et al., 2007; ISHIZAWA et al., 2007; JI et al., 2015). Os pré-tratamentos químicos proporcionam a dissolução de um ou mais componentes da matriz lignocelulósica, o que acarreta na formação de poros pelos quais a enzima pode infiltrar na parede celular e alcançar o substrato celulósico que foi parcialmente "descoberto" dos componentes de embebedimento (HIMMEL et al., 2007).

Além do emprego do pré-tratamento, também é possível atingir níveis elevados de sacarificação quando os substratos apresentam, originalmente, um baixo teor de lignina. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos neste contexto e demonstraram que se o material lignocelulósico de partida é pobre em lignina, há grande eficiência na etapa de sacarificação. Por exemplo, um trabalho de Grabber et al. (1996), abordou a hidrólise enzimática com celulasas e hemicelulasas de tecido xilemático e não xilemático de *Mendicago sativa*. O tecido não xilemático, que correspondia ao material colhido da planta ainda imatura, continha 42% menos lignina do que o material xilemático convencional. Os resultados indicaram que no tecido não xilemático, o teor de açúcar total obtido após 48 h de hidrólise foi 3,4 vezes superior ao observado com o tecido xilemático. Os autores atribuíram este resultado essencialmente à diferença no teor de lignina dos dois materiais. Para obter matéria prima com menor teor de lignina é possível empregar duas vias. Uma delas é a via de melhoramento genético, na qual, através da avaliação de parâmetros fenotípicos, químicos e moleculares são selecionados indivíduos que apresentem características de interesse como, por exemplo, menor teor de lignina. A aplicação destes programas implica a realização de cruzamentos controlados de progenitores que possuíam a característica desejada. Além disso, é necessário empregar a propagação vegetativa para a massificação dos indivíduos selecionados (BARBOSA et al., 2012). A outra via, toma

como base o atual conhecimento tanto de genomas como de técnicas de engenharia genética que permitem silenciar ou sobre-expressar um ou um grupo de genes relacionados com alguma característica de interesse, como a biossíntese de lignina (ZENG et al., 2014).

Considerando a via do melhoramento genético das plantas de interesse deste trabalho (cana-de-açúcar), várias instituições já desenvolveram canas com teor reduzido de lignina. Por exemplo, a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA - www.ridesa.com.br) desenvolveu uma série de clones de cana de açúcar com teor reduzido de lignina, os quais têm sido empregados em estudos anteriores de nosso próprio grupo de pesquisa (LAURITO-FRIEND et al., 2015; MASARIN et al., 2011; MENDES et al., 2011). Outras instituições como o Centro de Tecnologia Canaveieira (CTC - www.ctcanavieira.com.br) e o Instituto Agrônômico (IAC - www.iac.br) também estão produzindo distintos genótipos com baixo teor de lignina para fins comerciais.

Do ponto de vista do desenvolvimento de plantas transgênicas é possível destacar alguns trabalhos como o de Chen e Dixon (2007) que modificaram, de maneira individual, seis genes relacionados com enzimas que participam na biossíntese de lignina em *Mendicago sativa*. Os resultados indicaram que, segundo o gene silenciado, o genótipo resultante pode ter até 50% menos lignina do que a planta original. No mesmo estudo, eles quantificaram o teor de açúcares obtido de uma hidrólise enzimática com e sem tratamento ácido prévio dos materiais geneticamente modificados, encontrando que amostras com menor teor de lignina, proporcionaram concentrações de açúcares livres até três vezes maiores do que aqueles observados com a planta controle. Essa diferença foi ainda maior em amostras pré-tratadas em meio ácido. Ou seja, os dados obtidos indicaram que havia uma correlação direta e inversamente proporcional entre teor de lignina das amostras e eficiência da hidrólise enzimática.

Outro trabalho realizado por Fu et al. (2011) demonstrou que ao silenciar o gene da ácido cafeico O-metiltransferase (COMT) em plantas de *Panicum virgatum* se obtém plantas com teor reduzido de lignina, além de diminuição na relação siringil/guaiacil. Esta alteração melhorou a qualidade do material como forragem. O emprego da planta modificada na produção de etanol a partir da fração celulósica proporcionou um aumento de 38% no rendimento de reação comparado à planta controle. Além disso, tanto a severidade de pré-tratamento como a quantidade de celulases empregadas na etapa de hidrólise enzimática foi menor do que o requerido pela planta controle.

A distribuição topoquímica de lignina e hemicelulose na parede celular é outro aspecto relevante, pois esses componentes encapsulam as microfibrilas de celulose impedindo as celulases de adsorver na celulose para dar início à hidrólise enzimática (KRISTENSEN et al., 2008; MENDES et al., 2015). Desta forma, os pré-tratamentos químicos dos lignocelulósicos são a via tradicional de aumentar a reatividade da celulose frente às celulases. O maior acesso das celulases após o pré-tratamento é decorrência da formação de fendas internas, lacunas e espaços na parede celular por remoção parcial de alguns componentes (normalmente hemicelulose e/ou lignina), o que proporciona aumento da área superficial da celulose acessível às enzimas. Ou seja, as alterações descritas anteriormente facilitam o contato entre a enzima e o substrato.

Um exemplo de pré-tratamento envolve o emprego de reações em meio ácido que removem hemicelulose e lignina (parcialmente), permitindo uma maior interação entre a celulose e as celulases e, conseqüente, permite um aumento na eficiência de hidrólise enzimática do material lignocelulósico (HIMMEL et al., 2007). Os pré-tratamentos alcalinos, por outro lado, também podem promover a remoção parcial de lignina e hemicelulose, além de romper ésteres que unem a lignina e a hemicelulose via ácidos

ferúlico e cumárico nas gramíneas (CHATURVEDI; VERMA, 2013; SILVERSTEIN et al., 2007).

A quantificação da porosidade da parede celular (tamanho e distribuição de poros no material) tem sido utilizada como uma ferramenta para pré-estabelecer a reatividade do substrato frente à hidrólise enzimática (JEOH; WILSON; WALKER, 2006). Por exemplo, Ishizawa et al. (2007) fizeram um pré-tratamento com ácido diluído em sabugo de milho, encontrando um aumento do volume dos poros acessíveis para as celulases. Porém, seus resultados também indicaram que a porosidade não deve ser a única variável relevante. Nesse contexto, é notável que a remoção de 80% de lignina contida em madeiras de coníferas tratadas por explosão a vapor, seguido de deslignificação com peróxido alcalino aumentou fortemente a digestibilidade do substrato. Além disso, obtendo-se um substrato com menos lignina, a carga enzimática necessária para gerar o mesmo efeito na conversão de celulose foi 6 vezes menor (RAMOS; BREUIL; SADDLER, 1992).

Corroborando as informações anteriores, Lee et al. (2009), avaliaram a remoção seletiva de lignina na parede celular pela ação de líquidos iônicos, demonstrando uma clara correlação entre os níveis de remoção de lignina da parede celular e a digestibilidade do material residual por celulases comerciais (Figura 2). Neste trabalho ficou claro que há um intervalo de concentrações de lignina (usualmente após a remoção de cerca de 20% inicial) em que uma pequena ação deslignificante adicional acarreta em aumento expressivo da digestibilidade enzimática do material pré-tratado.

Figura 2 – Relação entre a extensão da remoção de lignina em *Acer sp.* com a digestibilidade enzimática da celulose

Fonte: Lee et al. (2009)

Resultados similares foram publicados por Várnai, Siika-Aho e Viikari (2010) avaliando a hidrólise enzimática de madeira de *Picea abies* com teores variados de lignina. O substrato em questão foi pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação ou por deslignificação direta com clorito de sódio. Os autores mostraram que o principal fator que afetou a hidrólise foi a presença de lignina, sendo que as amostras deslignificadas proporcionaram o dobro de rendimento em açúcares gerados por hidrólise enzimática na metade do tempo de reação (dois dias), quando comparadas com os controles não deslignificados.

Os trabalhos apresentados anteriormente indicam que a presença de lignina no material afeta a eficiência da hidrólise enzimática e existe uma estreita relação entre quantidade de lignina removida e eficiência de sacarificação. O trabalho de Lee et al. (2009) é chave neste aspecto, pois avaliou um sistema relativamente seletivo para a remoção de lignina, sendo que o resultado observado pôde ser quase exclusivamente atribuído à remoção de lignina, embora também tenha havido diminuição de cristalinidade da celulose contida no material pré-tratado. Uma abordagem similar foi realizada em nosso

grupo de pesquisas empregando bagaço de cana (MENDES et al., 2011). Nestes trabalhos, o substrato avaliado foi bagaço de cana de açúcar e o agente deslignificante foi clorito de sódio. Também neste caso, foi observado que a eficiência de sacarificação enzimática foi proporcional à eficiência da remoção de lignina no pré-tratamento. Com base nestes antecedentes, a abordagem pretendida no presente trabalho avaliará sistemas biomiméticos de deslignificação que permitiriam proporcionar ganhos significativos de eficiência na sacarificação enzimática de substratos pré-tratados em condições sub-ótimas. Ou seja, a lógica proposta é realizar o pré-tratamento na forma mais amena possível e remover a fração de lignina necessária numa etapa posterior empregando os sistemas biomiméticos de deslignificação. Esses resultados serão comparados com um pré-tratamento severo. Os sistemas biomiméticos a serem avaliados são fundamentados nos itens a seguir.

2.4 Biodegradação de lignina por fungos saprófitos

As paredes celulares lignificadas são recalcitrantes à degradação biológica. No entanto, existem alguns fungos saprófitos que podem desestruturar esta parede celular empregando um complexo sistema de metabólitos extracelulares que produz modificações oxidativas e hidrolíticas (RYTIOJA et al., 2015). Os fungos de degradação branca estão entre estes fungos saprófitos e apresentam a capacidade de degradar os três principais componentes da biomassa.

A degradação de lignina causada pelos fungos de decomposição branca pode ser dividida em dois tipos. Uma das formas de degradação de lignina é denominada de seletiva, na qual a lignina é degradada juntamente com a hemicelulose, deixando a celulose praticamente inalterada. A segunda via envolve a degradação simultânea de todos os

componentes dos materiais lignocelulósicos (BLANCHETTE et al., 1985; RYTIOJA et al., 2015).

Entre os fungos que degradam lignina seletivamente está o basidiomiceto *Ceriporopsis subvermispora* que tem sido empregado no processo de biopolpação para a fabricação de polpa celulósica, e recentemente na deslignificação de palha de milho para a produção de bioetanol (SALVACHÚA et al., 2011). A via de degradação de lignina simultaneamente com a degradação de hemicelulose e celulose é mais comum entre os basidiomicetos e conta com espécies como o *Trametes versicolor* e o *Pleurotus ostreatus* (RYTIOJA et al., 2014). A degradação de lignina pelos fungos de decomposição branca ocorre por vias que incluem a ação de enzimas oxidativas. Entre estas enzimas estão as lignina-peroxidases (LiP), as manganês-peroxidases (MnP), e também um grupo de proteínas que apresentam características mistas de MnP e LiP que são denominadas como peroxidases versáteis (VP). Adicionalmente, estes fungos secretam diversas oxidases intracelulares, como glicose oxidase e metanol oxidase (KIRK; CULLEN, 1998) e outras extracelulares como a glioxal oxidase (KERSTEN; KIRK, 1987) e a aril - álcool oxidase (ANDER; MARZULLO, 1997) que podem produzir o peróxido de hidrogênio requerido pelas peroxidases. Outro grupo de oxidases degradadoras de lignina são as Lacases (MARTÍNEZ et al., 2009), as quais correspondem a cupro-proteínas e não dependem de peróxido para sua ação.

As LiP e VP são capazes de oxidar e clivar lignina abstraindo um elétron de estruturas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos. Isso foi demonstrado em estudos com compostos modelos de lignina (CAMELO; MARTINEZ; MARTINEZ, 1999) e também em experimentos de despolimerização de lignina sintética, no caso de LiP (BAO et al., 1994). MnPs e VPs podem oxidar Mn^{2+} até Mn^{3+} apresentando capacidade oxidativa suficiente só para abstrair elétrons de estruturas fenólicas da lignina. As figuras 3 e 4

mostram os ciclos catalíticos simplificados das enzimas LiPs e MnPs, respectivamente (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2012; RUIZ-DUEÑAS et al., 2001). Nos dois casos, a enzima é ativada através da oxidação por H_2O_2 , levando à formação do composto “ C_1 ” que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_1 até a enzima nativa se dá através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiP, a redução de C_1 a C_{II} e também de C_{II} a C_0 pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos, levando à formação de radicais cátion.

Figura 3 – Ciclo catalítico simplificado de Lignina-peroxidase (LiP). S representa um substrato aromático não fenólico

Fonte: Ferraz (2004)

No caso da MnP, a redução do C_1 pode ocorrer pela abstração de um elétron proveniente do íon Mn^{2+} (presente em todo o material lignocelulósico) o que resulta na formação do composto C_{II} e Mn^{3+} . Nesta etapa pode existir um doador de elétrons distinto de Mn^{2+} , tal como um composto fenólico (HOFRICHTER; LUNDELL; HATAKKA, 2001). Para a redução de C_{II} a C_0 é requerido Mn^{2+} e não outros substratos. Os íons de Mn^{3+} formados são bastante reativos e podem atuar como um mediador da MnP, já que normalmente eles são estabilizados por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico (KIRK; CULLEN, 1998). Por sua parte, o complexo Mn^{3+} - oxalato pode ser reduzido abstraindo um elétron de outra estrutura fenólica.

Figura 4 – Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (MnP). RH representa um substrato fenólico

Fonte: Adaptado de Hofrichter (2002)

A Lacase atua diretamente sobre estruturas fenólicas pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{+} , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo catalítico da Lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2

Fonte: Ferraz (2004)

2.5 Sistemas de degradação de lignina baseados na geração de radicais peroxila

2.5.1 Geração de radicais organoperoxila iniciados por MnP

Alguns fungos podem degradar a lignina contida na parede celular sem causar a erosão da mesma, o que significa que deve haver sistemas degradativos que se baseiam na ação de compostos de baixa massa molar, visto que as enzimas produzidas por estes fungos não conseguem infiltrar a parede da celular lignificada (BLANCHETTE et al., 1997; KIRK; CULLEN, 1998; MENDONÇA et al., 2004).

Para explicar estes fatos, alguns trabalhos têm proposto que lipídeos insaturados produzidos pelo fungo ou mesmo oriundos do próprio material lignocelulósico podem ser peroxidados e atuar como os iniciadores de baixa massa molar que causam a degradação da lignina à distância. Esta reação pode ser iniciada por Mn^{3+} proveniente de oxidação de Mn^{2+} por MnP (WATANABE et al., 2000), ou ainda por meio de espécies reativas de oxigênio (radical hidroxila, radical superóxi-ânion e radical peroxila) comumente produzidos nos ambientes oxidantes envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos (IER et al., 2002). Tanto Mn^{3+} como as espécies reativas de oxigênio, ao reagir com lipídeos insaturados, geram inicialmente o radical alila centrado no carbono que rapidamente reage com oxigênio para dar origem ao radical organoperoxila numa estrutura de dieno conjugado, com maior poder oxidativo, conforme ilustrado na Figura 6 (SOUTHORN; POWIS, 1988). O radical organoperoxila, por sua vez, é capaz de oxidar estruturas não fenólicas de lignina (KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999), ou mesmo oxidar um novo grupo CH_2 alílico propagando a reação de peroxidação.

Figura 6 – Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila

Fonte: Adaptado de Southorn e Powis (1988)

Kapich, Jensen e Hammel, (1999) demonstraram que o radical organoperoxila gerado no ácido linoleico pela ação do sistema $MnP/Mn^{2+}/H_2O_2$ pode degradar um composto modelo de lignina não fenólico pela abstração inicial de um elétron do $C\alpha$ do modelo de lignina, como ilustrado na Figura 7. A degradação leva a formação principalmente do composto (2). Porém, a clivagem da ligação β -O-4 do modelo (1) também gera o produto secundário (3). Outra possibilidade é a oxidação $C\alpha$ - $C\beta$ do modelo (1). Neste caso, radicais peroxila oxidam o modelo (1) pela transferência de um elétron do anel aromático, levando também a posterior degradação do composto modelo. Esse mecanismo leva a formação do produto (5) que ainda pode ser oxidado pelos radicais peroxila gerando o produto (4).

Figura 7 - Degradação de composto modelo de lignina por radicais organoperoxila. Duas vias de oxidação são possíveis: a) oxidação de C α seguida de clivagem β -O-4 e b) oxidação inicial do anel aromático seguida de clivagem (oxidação) C α -C β

Fonte: Kapich, Jensen e Hammel (1999)

Além da degradação de compostos modelo de lignina, o sistema MnP/ácido linoleico/Mn²⁺/H₂O₂ também tem se mostrado efetivo para degradar lignina em substratos lignocelulósicos como madeira e polpas kraft. Por exemplo, Cunha et al. (2010); Masarin et al. (2015); Vicentim e Ferraz, (2007), demonstraram que MnP produzida por *C. subvermispora* foi a principal enzima oxidativa responsável pela degradação de lignina durante a biodegradação de madeira de *Eucalyptus grandis*. No trabalho de Cunha et al. (2010) foi ainda demonstrado que a enzima recuperada dos cultivos foi capaz de degradar madeira moída *in vitro* em ensaios que continham, além do substrato lignocelulósico, somente MnP, ácido linoleico, íons Mn²⁺ e H₂O₂ gerado pelo sistema glicose/glicose oxidase. Vários estudos já exploraram o sistema MnP/ácido linoleico/Mn²⁺/H₂O₂ como agente degradador de lignina *in vitro*, utilizando polpas kraft como substrato (MASARIN et al., 2015; MOREIRA et al., 2001). A maioria destes estudos visou a oxidação parcial ou a remoção de lignina de polpas kraft como uma etapa auxiliar no processo de branqueamento de polpas. Em geral, se observa que o sistema também é eficiente neste

tipo de substrato, chegando a proporcionar remoções de lignina da ordem de 30-40% quando foi combinado com uma extração alcalina subsequente (XU et al., 2010).

2.5.2. Sistemas de degradação de lignina baseados em Fe^{2+}

Diversos íons metálicos têm sido relacionados com a degradação de lignina, entre eles Fe^{3+} . Este íon pode ser reduzido até Fe^{2+} por compostos de baixa massa molar, gerados pelo próprio fungo (ARANTES et al., 2009). O Fe^{2+} pode reagir com H_2O_2 presente nos sistemas biológicos, gerando radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) através da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$; $K = 63 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$). O radical $\bullet\text{OH}$ é altamente oxidante e pode despolimerizar polissacarídeos via abstração de um hidrogênio e pode também degradar a lignina, participando, por exemplo, em demetoxilações (MASCHEK et al., 2013).

A presença de compostos redutores de Fe^{3+} no meio reacional é relevante no processo degradativo de madeira porque eles podem participar na reação de Fenton e contribuir em reações de peroxidação de ácidos graxos, as quais estão envolvidas em reações de degradação de lignina não fenólica (KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999).

Distintas espécies oxidantes, incluindo íons metálicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) podem iniciar a peroxidação de ácidos graxos insaturados (SPITELLER, 2006). No caso dos íons Fe^{2+} , a peroxidação pode ocorrer de maneira indireta, já que Fe^{2+} é rapidamente oxidado pelo oxigênio molecular presente no meio reacional, formando um superoxianion ou um radical hidroperoxila, dependendo do pH do meio (em pH menor que 4,5 predomina o radical hidroperoxila). Assim as espécies reativas de oxigênio formadas por esta via podem atuar como oxidantes de ácidos graxos insaturados.

Horta et al. (2011) demonstraram que é possível degradar lignina num sistema reacional que continha tampão acetato de sódio (pH 4,5), Fe^{2+} , ácido linoléico emulsificado em Tween 60 e madeira moída. Dado que a peroxidação lipídica ocorre com

consumo de oxigênio molecular, o sistema reacional anteriormente descrito pôde ser monitorado num oxímetro. Quando foi adicionado Fe^{2+} ao meio, a quantidade de O_2 do meio diminuiu levemente, o qual pode ser devido à oxidação de Fe^{2+} pelo O_2 . Com a adição de ácido linoléico ao sistema, houve rápido consumo de oxigênio como apresenta a figura 8. Duas reações controles foram feitas para avaliar este sistema reacional. Em uma delas os íons Fe^{2+} foram substituídos pelos íons Fe^{3+} e na segunda não havia nenhum íon ferro no meio reacional. Em ambos casos, não houve consumo de oxigênio, o que indica que a reação de peroxidação de ácidos graxos pode ser conduzida somente na presença de íons Fe^{2+} .

Figura 8 - Consumo de oxigênio durante a peroxidação de ácido linoléico iniciada por íons A) Fe^{2+} e B) Fe^{3+} (controle).

Fonte: Horta et al. (2011)

2.5.3. Sistemas de degradação de lignina baseados em Lacase

As Lacases tem sido empregadas em estudos, principalmente, de branqueamento de polpas kraft (MAYER; STAPLES, 2002). Num sistema no qual há compostos de baixa

massa molar (produzidos pelo próprio fungo ou sintéticos) mediadores da ação das Lacases, é possível degradar estruturas não fenólicas da lignina (GALLI; GENTILI, 2004). Um dos primeiros mediadores sintéticos descobertos foi o ácido 2,2-azinobis-(3-ethylbenzenthiazoline-6-sulfonic) ou ABTS (BOURBONNAIS; PAICE, 1990). Este mediador sintético foi investigado para aplicação na indústria de celulose e papel, mas o alto custo de produção, a elevada toxicidade, e a cor azulada impede que ele possa ser amplamente empregado em processos industriais. Por este motivo, a busca de mediadores naturais oriundos de plantas tem sido objeto de investigação. Por exemplo, o branqueamento de polpa celulósica empregando Lacase e mediadores naturais foi desenvolvido por Camarero et al. (2007). Neste trabalho polpa não branqueada de *Eucalyptus globulus* (n° kappa 14; alvura 41%; viscosidade 1190mL/g) foi tratada com Lacase oriunda de *Pycnoporus cinnabarinus*, na presença de distintos mediadores, entre eles siringaldeído, acetosiringona, ácido p-cumárico e um mediador sintético, 1-hidroxibenzotriazol (HBT). A polpa foi branqueada com uma sequência que incluía ainda peróxido de hidrogênio (Figura 9). Os resultados indicaram que somente siringaldeído e acetosiringona promoveram a diminuição do número kappa e o aumento da alvura nas polpas (figura 9). No caso do mediador sintético (HBT) foram obtidos menor valor no n° kappa e maior alvura em relação aos mediadores naturais e controle.

O sistema Lacasse/mediador também pode iniciar a peroxidação de um ácido graxo insaturado na presença de Mn^{2+} . Neste sistema, a enzima oxida o mediador o qual pode oxidar Mn^{2+} até Mn^{3+} . O Mn^{3+} gerado pode então iniciar a reação de peroxidação (SREBOTNIK; BOISSON, 2005). Neste trabalho, o mediador empregado foi ácido hidroxibenzoico (HBA). Os resultados indicaram que houve consumo de O_2 durante a reação e o ácido linoléico foi degradado gerando vários aldeídos de cadeia com 5 a 7 carbonos.

Figura 9 - Alterações no nº kappa (A) e alvura (B) de polpa de *E. globulus* tratada com Lacase e mediadores naturais e artificial (HBT). (AS Siringaldehido; AS acetosiringona; PCA ácido p-cumárico; HBT 1- hidroxibenzotriazole).

Fonte: Camarero et al. (2007)

2.6. O processo de deslignificação empregando oxigênio

Um sistema que promove a oxidação de lignina através de condições de reações mais severas do que as vias de degradação biológica, comumente descritas no fungo de decomposição branca, envolve a ação direta do O_2 em meio alcalino e temperaturas relativamente elevadas (da ordem de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este processo é atualmente empregado em muitas indústrias de celulose e papel como uma etapa de pré-branqueamento das polpas celulósicas. Dependendo das condições de reação (temperatura, pressão de O_2 , tipo de madeira) a deslignificação de polpas kraft pode atingir entre 60 e 75%. A importância

deste processo é que ele torna possível diminuir o teor de lignina em polpas kraft exigindo menores cargas de reagentes químicos empregados na etapa posterior de branqueamento (GELLERSTED, 2009).

Durante o tratamento de materiais lignocelulósicos com O_2 em meio alcalino a principal reação de degradação da lignina envolve a oxidação dos grupos fenólicos, onde um íon fenolato cede um elétron ao oxigênio originando um radical fenoxila e superoxiânion (Figura 10A). O radical fenoxila formado é instável e pode se decompor causando a degradação da lignina em vários sub-produtos, conforme ilustrado na Figura 10B (GELLERSTED, 2009).

Figura 10 – A Formação de radicais fenoxila e superoxiânion por reação de estruturas fenólicas com O_2 em meio alcalino do OH fenólico, B) Decomposição de estruturas fenólicas em estruturas secundárias com oxigênio em meio alcalino.

Fonte: Gellersted (2009)

Em decorrência das reações indicadas na Figura 10, o principal composto removido durante o tratamento de um material lignocelulósico com oxigênio em meio alcalino é a lignina. No entanto, reações secundárias com carboidratos também podem ocorrer. As reações com carboidratos ainda não foram completamente esclarecidas, mas uma ionização

de um grupo álcool e transferência de elétrons tem sido proposta (Figura 11). Esta reação leva a uma degradação dos polissacarídeos, principalmente da celulose.

Figura 11 - Reações secundárias de radicais de oxigênio com carboidratos de carboidratos

Fonte: Gellersted (2009)

O intermediário formado na celulose pode decompor o polímero causando a diminuição de seu grau de polimerização conforme indicado na Figura 12.

Figura 12 - Principais reações de decomposição do polímero de celulose a través da quebra de ligação B-O-4 da cadeia de celulose

Fonte: Adaptado de Gellersted (2009)

Agarwal e Ralph (2008) determinaram diversos fatores que podem afetar o processo de deslignificação durante o tratamento com oxigênio em polpas kraft de madeira dura. Um deles é o n° kappa, ou teor de lignina inicial, onde maiores valores deste parâmetro apresentam menor resistência ao processo de deslignificação. O tempo e a temperatura de reação também são fatores que podem alterar a deslignificação. Em temperaturas elevadas é possível obter um maior grau de deslignificação num tempo determinado. Outro fator a considerar é a pressão de oxigênio empregada, sendo que

velocidades maiores de deslignificação podem ser obtidas quando é empregada uma maior pressão de oxigênio (JI; WHEELER; VAN HEININGEN, 2007)

Kallioinen et al. (2013) fizeram um estudo comparativo de diferentes pré-tratamentos, incluindo O₂ em meio alcalino sobre bagaço de cana, avaliando a eficiência dos pré-tratamentos para a remoção de lignina e outros componentes visando diminuir a recalcitrância do lignocelulósico frente à hidrólise enzimática subsequente. Os resultados indicaram que o tratamento com O₂ em meio alcalino otimizado no trabalho, permitiu remover parte expressiva da lignina, mantendo a fração de celulose e hemicelulose quase inalteradas. Esse fato acarretou uma melhora na digestibilidade do material frente a enzimas hidrolíticas, atingindo até 97% de conversão de glicose em bagaço de cana.

2.7. Decomposição de materiais lignocelulósicos pelo sistema Fenton

Alguns estudos têm demonstrado que as enzimas são componentes demasiado grandes para penetrar a parede celular nos primeiros estágios da degradação induzida por fungos. Por exemplo, Blanchette et al. (1997) mostraram que durante a degradação de *Pinus* sp por *C. subvermispora* as células vão se tornando gradualmente permeáveis à insulina (5.700 g.mol⁻¹) e a mioglobina (17.600 g.mol⁻¹). Contudo, a ovalbumina (44.300 g.mol⁻¹), que possui tamanho similar às enzimas LiP, MnP e muitas enzimas hidrolíticas de polissacarídeos, foi permeável somente em estágios relativamente avançados de degradação (8 semanas). Porém, estudos feitos por microscopia UV durante a degradação seletiva de lignina por *C. subvermispora* tem mostrado a remoção de lignina da parede celular em tempos curtos de degradação (30 dias), ainda quando os sistemas enzimáticos não teriam acesso aos componentes da parede celular por seu grande tamanho (MENDONÇA et al., 2004).

Para justificar estas observações, alguns autores vêm propondo teorias sobre a participação de compostos de baixa massa molar, que poderiam agir nos estágios iniciais de degradação, abrindo espaço para a penetração dos complexos enzimáticos (JELLISON et al., 1997). Muitos destes compostos de baixa massa molar foram identificados nos cultivos de fungos decompositores de madeira. O modo de ação deles consiste em atuar diretamente sobre a parede celular vegetal ou agir como mediadores das enzimas oxidativas. Algumas de suas vias de atuação são dependentes de álcool veratrílico, ácido oxálico e MnP, o sistema Lacase – mediador, e o sistema Fenton, o qual será abordado no item a seguir.

2.7.1. Sistema Fenton

Os íons ferro são essenciais para os fungos de decomposição branca, já que fazem parte do sítio ativo das peroxidases (MARTÍNEZ et al., 2005). Além disso, os íons ferro também podem ser empregados pelos fungos de decomposição parda e alguns fungos de decomposição branca para iniciar a reação de Fenton, gerando radicais hidroxila (JOHNSON; NAZHAT, 1987).

A reação principal de Fenton da origem ainda a reações secundárias, gerando distintas espécies reativas de oxigênio, conforme ilustrado nas equações 1 e 2, (FENTON, 1894).

Na equação (1) é formado o radical hidroperoxila que pode ou não estar protonado (superoxi-anion) (VALKO et al., 2007), sendo que no meio aquoso, as duas espécies (radical hidroperoxila e superoxi-anion) participam em reações secundárias, gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio. Outro intermediário, produzido pelas reações secundárias é o oxigênio singlete, o qual é formado a partir de reações de dismutação ou transferência eletrônica entre distintas espécies de radicais (HAGE; LLOBET; SAWYER, 1995; WALLING, 1998). Esta espécie adquire grande importância já que é associada à emissão de quimio-luminescência (LASOVSKY et al., 2007).

Outro grupo de compostos intermediários na reação de Fenton corresponde a diversas formas iônicas do Ferro (Eq 3). Nesse contexto, reações entre ferro e radical hidroxila também tem sido indicadas como responsáveis pela emissão de quimio-luminescência (Eq 4) oriunda da reação de Fenton (SHEN et al., 1992).

Num trabalho recente, um grupo de pesquisadores da Universidade de Kioto, Japão, usando espectrometria de massas, evidenciou a formação direta de espécies intermediárias da reação de Fenton (ENAMI; SAKAMOTO; COLUSSI, 2014), descritas nas equações 3 e 4.

No sistema Fenton existe uma importante variação na reação quando a mesma acontece em presença de quelantes, que podem atuar promovendo ou diminuindo a formação de espécies oxidantes. Esse grupo de reações são conhecidos como reação de Fenton mediada por quelantes ou CMF, por sua tradução ao inglês (Chelator-Mediated Fenton reaction) (GOODELL et al., 1997; XU; GOODELL, 2001). Nesse contexto,

compostos como os 1,2-dihidroxibenzenos (1,2-DHB), podem incrementar a produção de radicais na reação de Fenton (CONTRERAS et al., 2007), já que a capacidade redutora desses compostos pode afetar o potencial redox do metal, incidindo nas velocidades de reação entre o ferro e o peróxido (MAHARAJ; LIMSON; DAYA, 2003). Os dihidroxibenzenos podem ainda atuar como redutores de Fe^{3+} , disponibilizando Fe^{2+} de maneira quase constante para iniciar a reação de Fenton. Evidências experimentais indicam que os dihidroxi-dimetoxibenzenos são os principais compostos redutores de Fe^{3+} em fungos de decomposição parda (GOODELL et al., 2006). Para os fungos de decomposição branca, alguns trabalhos indicam como responsáveis desta ação a ácido dihidroxibenzóico, e derivados aromáticos hidroxi-metoxi (FERRAZ et al., 2001), compostos que também foram encontrados em madeira biotratada com *C. subvermispura* (AGUIAR et al., 2007). Outros compostos como derivados de catecóis foram detectados em cultivos com *Perenniporia medulla-panis* (ARANTES; MILAGRES, 2006). A redução enzimática de Fe^{3+} também tem sido atribuída à ação de celobiose deshidrogenase (CDH) em fungos de decomposição parda (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008).

A Figura 13 sumariza o ciclo redox para a reação CMF, sendo que o 1,2-DHB é reduzido para uma semiquinona, a qual tem a capacidade de reduzir outro equivalente de Fe^{3+} , gerando novamente a estrutura tipo quinona. Esse ciclo corresponde a o ciclo Redox da reação CMF.

processo relativamente simples e muito utilizado para a produção de polpas quimiotermomecânicas de alto rendimento, num sistema que envolve uma etapa única de impregnação com os reagentes inorgânicos, aquecimento com vapor e defibramento/refino em refinadores de disco (GELLERSTEDT, 2009). Neste caso, as condições de processo são menos severas no sentido de temperatura e tempos de cozimento que o processo só com sulfito, os rendimentos são elevados e a polpa é bastante resistente e útil para a fabricação de uma série de papéis absorventes.

Recentemente, autores como Mendes et al. (2011) e Zhu et al. (2009) tem usado esse processo como uma etapa de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para melhorar a subsequente sacarificação enzimática do material obtido. O uso do processo de polpação quimiotermomecânica de madeira de coníferas e de folhosas, baseado no uso de sulfito de sódio, foi denominado como SPORL (*Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose*) por um grupo de pesquisadores sediados em Madison, EUA (ZHU et al., 2009). No caso do pré-tratamento de amostras de madeira, foi possível alcançar 95% de conversão de celulose após a digestão enzimática do material pré-tratado quando a etapa de pré-tratamento foi conduzida em meio ácido que acarretou dissolução expressiva da lignina e da hemicelulose, além de pequena perda de celulose (HISANO; NANDAKUMAR; WANG, 2009). Em condições mais amenas de reação que empregaram meio sulfito alcalino, o pré-tratamento proporcionou uma remoção parcial de lignina e mínima de hemicelulose, porém a eficiência da hidrólise enzimática do material pré-tratado também foi menor. As bases químicas do processo sulfito alcalino indicam que o material lignocelulósico sofre ruptura de ligações α -éter na lignina. Também ocorre a adição de grupos sulfônicos o que pode proporcionar a dissolução de parte da lignina e ainda gerar uma lignina residual parcialmente sulfonada que se torna hidrofílica (BJÖRKLUND, M; NILVEBRANT, N. 2009). Isto acarreta maior capacidade de absorção de água pelas fibras

do material pré-tratado e seu consequente inchamento, o que pode aumentar significativamente a porosidade da parede celular (MENDES et al., 2011). O processo causa ainda a desacetilação da hemicelulose, além de dissolução das frações de baixa massa molar da hemicelulose. Particularmente em gramíneas, ocorre ainda a ruptura de ésteres de ácidos hidroxinâmicos unidos à hemicelulose (TILAY et al., 2008). Mendes et al. (2011) em um trabalho desenvolvido em nosso próprio grupo de pesquisas, avaliaram o processo sulfito alcalino no tratamento de bagaço de cana como etapa prévia à hidrólise enzimática. Os autores observaram que as fibras tratadas com sulfito alcalino continham menor teor de lignina e ainda se apresentavam mais inchadas e com maior capacidade de retenção de água. Como consequência, o material foi prontamente hidrolisado por uma mistura de celulasas comerciais, atingindo 85% de conversão da celulose após 96h de reação.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Diversos trabalhos têm demonstrado que a remoção parcial de lignina do substrato é útil para o processo de sacarificação enzimática. Esta remoção de lignina pode se dar pela seleção de uma planta com menor teor de lignina intrínseco, pela remoção da lignina por pré-tratamento, ou ainda a combinação das duas abordagens. Dentre os processos já descritos para esta finalidade, a deslignificação via pré-tratamento quimiotermomecânico empregando sulfito alcalino já se mostrou eficiente, tanto para bagaço de cana como para madeiras de folhosas e de coníferas. Este processo tem sido desenvolvido em nosso próprio grupo de pesquisas com resultados promissores. Neste contexto, nossa hipótese é que os sistemas biomiméticos podem ser empregados como processos auxiliares na etapa de remoção de lignina. No entanto, os antecedentes indicam que apesar dos sistemas biomiméticos demandarem condições amenas de reação (compatíveis com a etapa de sacarificação enzimática), eles são menos eficientes do que os pré-tratamentos químicos e quimiotermomecânicos convencionais. Ponderando estas questões, nossa proposta de trabalho consistiu em aplicar duas condições de pré-tratamento quimiotermomecânico com sulfito alcalino de materiais lignocelulósicos que nos permita gerar substratos parcialmente deslignificados. Nestes materiais foram aplicadas etapas subsequentes de deslignificação empregando os sistemas oxidativos biomiméticos. Devido à estreita relação entre remoção de lignina e eficiência na hidrólise enzimática, o que se espera é que o sistema biomimético oxidativo seja empregado numa situação em que uma pequena remoção de lignina, já permita melhorar o rendimento da hidrólise enzimática posterior de maneira considerável.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar a aplicação de sistemas biomiméticos na degradação de materiais lignocelulósicos como etapa prévia á hidrólise enzimática da fração polissacarídica.

Para cumprir o objetivo descrito, as seguintes etapas foram executadas:

- Realização de um pré-tratamento quimiotermomecânico baseado na aplicação de sulfito alcalino com duas cargas de reagentes, e subsequente desestruturação em refinador de discos, a fim de gerar dois tipos de substratos: a) com ótimo nível de deslignificação, e b) com o nível de deslignificação sub-ótimo, que permita evidenciar os eventuais benefícios da aplicação de sistemas biomiméticos na etapa de deslignificação.
- Preparação da enzima MnP em cultivos de *C. subvermispora* e empregá-la numa etapa de deslignificação *in vitro* dos materiais estudados
- Aplicação de sistemas biomiméticos baseados em: Oxigênio em meio alcalino, reação de Fenton e enzimas com potencial oxidativo como MnP e Lacase
- Aplicação de ácidos graxos no sistema biomimético baseado na reação de Fenton
- Avaliação da deslignificação dos materiais pré-tratados pela ação de sistemas biomiméticos.
- Realização a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados.
- Avaliação as correlações entre os efeitos produzidos pelos tratamentos oxidativos e a eficiência de hidrólise enzimática.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Parte 1 - Sistemas oxidativos baseados na ação de Manganês peroxidase, Lacase e O_2

5.1.1 Preparação de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino empregando o processo quimiotermomecânico (CTM)

Aproximadamente 600g de bagaço de cana (base seca) proveniente de uma usina de açúcar e álcool foram impregnados com licor contendo sulfito alcalino na proporção de 1/10 (p/v). O material lignocelulósico foi adicionado no interior de um reator de aço inox de 8 L ao qual foi aplicado vácuo por 30 min. Após este período, o licor de impregnação (6 L) foi transferido para o interior do reator por sucção proporcionada pelo vácuo inicialmente aplicado. Os sólidos e o licor foram mantidos sob vácuo por mais 15 min. O licor continha cargas diferenciadas de Na_2SO_3 e NaOH para dar origem a pré-tratamentos em uma condição branda (5 g de Na_2SO_3 e 2,5 g de NaOH por 100 g de bagaço) e em uma condição severa (10 g de Na_2SO_3 e 5 g de NaOH por 100 g de bagaço). Após a impregnação, a biomassa foi digerida a 120°C por 2 h, lavada com água e centrifugada até uma consistência de 30% (p/p). O material sólido obtido foi suspenso em 25L de água (aproximadamente 2% consistência) e refinado num refinador de discos REGMED MD-300 com um espaço entre discos de 0,1 mm (REGMED Brazil) com um consumo de energia fixado em 250 Wh. Uma amostra com cerca de 150 mL da suspensão do material refinado foi retirada para a determinação de *Canadian Standard Freeness* (CSF) seguindo metodologia previamente descrita (TAPPI 227-om 04). Os sólidos retidos na determinação de CSF foram secos 105 °C e pesados. A massa deste material foi somada à massa seca total do bagaço pré-tratado no momento do cálculo do rendimento de reação. O restante dos sólidos obtidos no pré-tratamento foi seco ao ar, pesado e uma amostra analisada

quanto ao teor de umidade. O rendimento de sólidos obtidos nos pré-tratamentos foi calculado em função das massas iniciais e finais expressas em base seca.

A composição química do material lignocelulósico antes e após o pré-tratamento foi determinada após hidrólise ácida conforme descrito por Ferraz et al. (2000).

5.1.2 Enzimas oxidativas empregadas no tratamento do bagaço de cana

A Lacase empregada nos pré-tratamentos foi cedida por uma empresa que produz a enzima de *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus oryzae* (Novozymes).

A manganês peroxidase, foi preparada a partir de cultivos do basidiomiceto de decomposição branca *Ceriporopsis subvermispora* (Pil.), cepa SS-3. Para a preparação de inóculo, o fungo foi repicado a partir de placas de Petri para Erlenmeyers de 2 L contendo 200 mL de meio líquido composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose e 0,7% de extrato de levedura. Após 12 dias de incubação estática, a 27°C, o micélio crescido neste meio foi filtrado, lavado com água autoclavada e macerado com 100 mL de água. Uma alíquota de 20 mL desta suspensão foi filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado para a determinação de quantidade de micélio presente no inóculo.

Para o cultivo do basidiomiceto sobre cavacos de madeira, 50 g (em base seca) de cavacos de *Eucalyptus grandis* foram submersos em água e mantidos em Erlenmeyers de 2L por um período de 16 horas. O excesso de água foi drenado e os cavacos autoclavados a 121°C por 15 minutos. Em seguida os cavacos foram inoculados com 3000 mg de micélio/kg de cavaco (base seca). Os cultivos foram suplementados com 0,5 % de milhocina e 0,5% de glicose para induzir a máxima produção de MnP pelo fungo (CUNHA et al., 2010). Os frascos foram agitados manualmente e posteriormente mantidos sem agitação a 27°C por 15 dias. Um total de 10 frascos foram inoculados

simultaneamente a fim de gerar um volume adequado de extrato enzimático que permitisse realizar os experimentos de tratamento do bagaço pré-tratado.

A MnP secretada pelo fungo em cada cultivo foi extraída com 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, suplementado com 0,01% de Tween 60 sob 120 rpm de agitação a 10 ± 1 °C (agitador New Brunswick C25KC) por 5 horas. Os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação a 3400 x G a 10°C por 15 min (Centrifuga refrigerada Jouan CR4i). O sobrenadante foi filtrado a vácuo através de uma membrana de nitrato de celulose (0,45 µm de tamanho de poro). Posteriormente uma pequena parte do extrato foi utilizado para determinação de atividade de MnP e índice de absorbância relativa a 280 nm. O restante do extrato enzimático foi tratado com 2 g de carvão ativo/100 mL de extrato sob agitação a 120 rpm (agitador New Brunswick C25KC) por 30 min a 25°C e centrifugado (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008). Novamente foi determinada a atividade enzimática de MnP e índice de absorbância a 280nm.

O extrato tratado com carvão ativo foi ajustado para pH 4,8 com ácido acético 0,1 M e purificado através de uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose CL 6B (*GE Healthcare*) medindo 1,5 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento. Prévio ao uso, a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. O fluxo de adição do extrato na coluna foi de 0,5 – 0,75 mL min⁻¹. A recuperação de MnP adsorvida na coluna foi feita por eluição com NaCl 0,5 M num fluxo de 0,1-0,2 mL min⁻¹. Frações de 1 mL de solução eluída foram testadas para a atividade de MnP. As frações que apresentaram atividade de MnP foram juntadas e denominadas coletivamente de extrato purificado que teve o índice de absorbância relativa a 280 nm e a atividade de MnP determinados.

A atividade de MnP foi medida pela oxidação de vermelho fenol. As reações foram conduzidas em tubos de 30 mL contendo 1,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM

(pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de vermelho fenol 0,1%, 0,5 mL de extrato enzimático, 0,25 mL de albumina 1% e 0,25 mL de H_2O_2 1,76 mM. Para o branco substituiu-se o extrato enzimático por tampão de extração enzimática. Em intervalos de um min, 1 mL da mistura reacional descrita anteriormente foi misturado com 30 μL de NaOH 6,5 M para interromper a reação e imediatamente foi medida a absorbância a 610 nm ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (KUWAHARA et al., 1984; LUNDELL et al., 1990).

O índice de absorbância relativa a 280 nm foi determinado pela leitura da absorbância de uma diluição apropriada do extrato enzimático em 280 nm. O índice de absorção relativa correspondeu à absorbância medida multiplicada pelo fator de diluição do extrato.

5.1.3 Tratamento do bagaço pré-tratado com enzimas oxidativas

As reações empregando os sistemas oxidativos enzimáticos foram realizadas em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Para cada sistema avaliado foi usada consistência de 2% (relação sólido-líquido de 1 g de amostra do material lignocelulósico (base seca) para 50 mL de volume final de reação. Os sistemas avaliados foram:

a) Sistema baseado em MnP: 30 mL de tampão Succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 10 mL de Lactato de sódio 50 mM, 1,18 mL MnSO_4 5mM, 3,5 mL de Tween 80 1% (p/v), 1 mL de extrato purificado de MnP correspondendo a 35 UI/g de amostra (base seca), 1,4 mL de glicose 50 mM, 0,7 mL de glicose oxidase correspondendo a 14 UI/g de amostra (base seca), 2,22 mL de H_2O

b) Sistema baseado em Lacase comercial/ácido hidróxibenzóico / Mn^{2+} / Tween80: 35,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5; 5 mL da diluição de enzima comercial em

água para gerar uma carga de 40 UI/g de substrato; 5 ml de ácido hidróxibenzoico 10 mM ; 1 ml de MnSO_4 5mM; e 3,5 ml Tween 80 (1% p/v) (CUNHA et al., 2010).

5.1.4 Tratamento do bagaço com oxigênio em meio alcalino

Dez gramas de bagaço (pré-tratado com sulfito alcalino ou não) foram submetidos ao vácuo por 30 minutos num reator Parr de 2 L (mod 4848 Reactor Controller). Posteriormente, o material foi impregnado com licor para dar uma consistência de 1/10 (p/v), onde foi mantido o vácuo por mais 15 min. O licor continha 4 g de NaOH por 100 g de bagaço seco suplementado ou não com Tween 80 (cargas variáveis conforme indicado na sessão de resultados e discussão). Após a impregnação, o reator foi aquecido a 90°C e pressurizado até 6 bar com O_2 . A temperatura e a pressão de O_2 foram mantidas constantes durante todo o tempo de reação que foi de 45 minutos. Após a digestão, o material sólido residual foi coletado com o auxílio de lavagem com 200 mL de NaOH 0,1% (p/v). Posteriormente o material foi filtrado e os sólidos residuais foram lavados com água destilada até pH neutro. Os sólidos foram secos ao ar e uma amostra foi analisada quanto ao teor de umidade. As massas secas iniciais e finais foram empregadas para o cálculo do rendimento de sólidos decorrentes do tratamento com O_2 . Este material foi caracterizado quanto a composição química por hidrólise ácida, segundo metodologia descrita por FERRAZ (2000).

5.1.5 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos foi conduzida com 10 FPU de celulasas/g de substrato (Celubrix 1,5L) e 15 UI de beta-glicosidase/g de substrato (Novozym 188) numa consistência de sólidos de 2% (p/v) em tampão acetato de sódio 50

mM, pH 4,8, sob agitação de 120 rpm a 45°C por 72 horas, com amostragens periódicas para o estudo da cinética de hidrólise dos polissacarídeos.

Nos experimentos que empregaram MnP como sistema oxidativo foi realizado um processo de duas etapas. A primeira etapa envolveu o tratamento no sistema oxidativo por 72 h de reação. Os sólidos foram recuperados por centrifugação, lavados com água e usados como substrato para a reação de hidrólise enzimática. Neste caso, a hidrólise enzimática foi conduzida em micro-escala, empregando 20 mg de substrato e um volume final de 1 mL de reação. A amostragem para o estudo cinético foi feita por resfriamento do frasco de reação em banho de gelo e centrifugação a 3400 x G por 15 min a 10° C. Vinte microlitros do sobrenadante foram apropriadamente diluídos em água para posterior determinação de açúcares monoméricos por HPLC (MENDES et al., 2011). O restante do meio reacional foi retornado à temperatura de reação para o prosseguimento do estudo cinético de hidrólise dos polissacarídeos até um tempo total de reação de 72h.

Nos experimentos que empregaram Lacase como sistema oxidativo foi realizado um processo de oxidação e hidrólise em única etapa. A hidrólise enzimática foi conduzida com 1 g de substrato e um volume final de 50 mL de reação. A amostragem para o estudo cinético foi feita pela interrupção da reação em tempos definidos por fervura do meio reacional por 5 min. Os sólidos foram então separados por centrifugação a 3400 x G por 15 min. Vinte microlitros do sobrenadante foram apropriadamente diluídos com água para posterior determinação de açúcares monoméricos por HPLC (MENDES et al., 2011).

Nos experimentos que empregaram O₂ como sistema oxidativo, os sólidos secos ao ar foram hidrolisados seguindo o mesmo procedimento descrito para os sólidos pré-digeridos com MnP.

5.2 Parte 2 - Sistemas oxidativos baseados na reação de Fenton

5.2.1 Preparação de bagaço pré-tratado por processo quimiatermomecânico (CTM)

Nesta etapa do trabalho, além dos bagaços de cana de origem industrial pré-tratados no processo CTM descrito anteriormente, dois outros substratos foram preparados. Um dos novos substratos tem origem em híbridos de cana-de-açúcar que foram selecionados dentro de um grupo de plantas com baixo teor de lignina, desenvolvidas experimentalmente por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa associados à RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) (MASARIN et al., 2011). O outro substrato foi preparado a partir de um cultivar de cana de açúcar de referência. Exemplares de cana madura das duas plantas foram picados (em uma máquina “picadeira”) em fragmentos de 5 a 10 mm de comprimento. Em seguida, o material foi lavado por suspensão agitada em água para remoção da sacarose. Para evitar a perda de partículas finas (<0,2 mm de comprimento), o material foi continuamente lavado no interior de uma coluna de PVC (1 m de comprimento e 150 mm de diâmetro), equipada com uma tela de aço de 200 mesh na sua base. As partículas não retidas pela tela foram bombeadas de volta para dentro da coluna, as quais foram eficientemente retidas pela própria camada formada pelas fibras. O material foi lavado com água corrente até não se detectar açúcar na água de lavagem pela metodologia de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O material resultante foi armazenado em freezer a -18 °C, até o momento de sua utilização.

O pré-tratamento dos dois novos substratos foi realizado com o processo CTM empregando somente a carga mais baixa de reagentes (5% Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH) conforme já descrito no capítulo anterior.

A determinação da composição química do material lignocelulósico antes e após o tratamento foi determinada por hidrólise ácida conforme descrito por Ferraz (2000).

5.2.2 Tratamento dos substratos pela reação de Fenton e detecção da quimiluminescência (QL) resultante

As reações foram conduzidas com duas concentrações de peróxido de hidrogênio (2 mM e 50 mM) (CONTRERAS et al., 2011a; XIE et al., 2010), presença ou ausência de ácidos graxos (Tween 80 ou ácido linoléico - ambos em 0,35% (p/p) quando presentes) e presença ou ausência de bagaço de cana pré-tratado (1% (p/v) de bagaço pré-tratado quando presente). Em todas as reações avaliadas, as concentrações finais de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ e 1,2-DHB, foram de 0.15 mM.

Todas as soluções utilizadas nestes experimentos foram preparadas usando água fervida (para eliminação de CO_2), desoxigenada com Argônio e com o pH ajustado em 3,4 com HNO_3 . As reações foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} ou Fe^{3+} usando um injetor automático, e o volume final de reação foi sempre de 3,0 mL. Toda a reação foi realizada no interior do Luminômetro Turner Biosystem 20/20ⁿ com fotomultiplicador sensível entre 350 e 650 nm, no qual foi feita a detecção de QL. O equipamento foi usado em sala escura à temperatura ambiente (CONTRERAS et al., 2011a).

A avaliação dos níveis de QL foi feita em duas etapas experimentais. A primeira etapa foi avaliada em reações onde a QL decorrente da reação de Fenton foi medida na presença ou ausência de ácidos graxos insaturados e de bagaço de cana. Estas reações foram conduzidas segundo um planejamento experimental 2^4 completo (BOX, 2008). Na segunda etapa foi avaliada a QL de reações de Fenton mediadas por quelantes (CMF do inglês chelator mediated Fenton). O quelante empregado foi o 1,2-DHB. Nestas reações foi

empregada somente a concentração elevada de H_2O_2 (50 mM), na presença ou ausência de ácidos graxos insaturados.

Um gráfico relacionando a QL decorrente de todas as reações em função do tempo de reação foi montado e a área abaixo da curva obtida foi integrada usando o software Origin, versão 8. Este conjunto de experimentos foi realizado em colaboração com o grupo do Dr. David Contreras, durante um estágio de pesquisa no Centro de Biotecnologia da Universidad de Concepción, Chile.

5.2.3 Ampliação de escala da reação de Fenton e hidrólise enzimática dos substratos obtidos

Para avaliar os efeitos dos sistemas oxidativos em estudo, alguns experimentos foram repetidos com aumento de escala sob as mesmas condições de reação detalhadas no item 5.2.2. Também foram avaliadas novas condições mais severas de reação dos sistemas oxidativos, visando obter um ganho ainda maior na eficiência do tratamento do bagaço de cana. Neste último caso, a concentração de Fe^{3+} foi aumentada para 1mM e o tempo de reação para 30 horas. Além destas modificações, uma etapa de extração alcalina do material submetido previamente à reação de Fenton foi adicionada. A extração alcalina do material tratado foi feita com NaOH 0,1% (p/v) a 60 °C por 1 h na proporção de 1 g de sólidos para 10 mL de solução alcalina, correspondendo a uma carga de álcali de 1 g de NaOH/100g de bagaço.

As reações CMF conduzidas em escala ampliada foram realizadas na ausência de luz, consistência de 1% de sólidos, agitação de 120 rpm a temperatura ambiente, seguindo os seguintes procedimentos: 1) Impregnação de bagaço de cana pré-tratado com (0,15 mM ou 1mM) de solução de íons Fe^{3+} durante 16 h; 2) Filtragem e lavagem do material com água destilada pré-ajustada a pH 3.4 (com HNO_3) para eliminar o excesso de Fe^{3+} ; 3)

Aplicação das soluções de reagentes restantes para o tratamento CMF: 1,2-DHB 0,15 mM e Tween 80 0,35% p/v (quando pertinente). A reação foi iniciada com a adição de H_2O_2 50mM e o sistema mantido sob agitação de 120 rpm por 4 ou 30 h. 4) Filtragem do material tratado e lavagem com água destilada; 5) Extração alcalina dos sólidos residuais com NaOH 0,1% p/v a 60° C, 120 rpm de agitação por 1 h; 6) Lavagem dos sólidos finais com água destilada até pH neutro; 7) Secagem dos sólidos ao ar até cerca de 10% de umidade.

O material sólido gerado foi processado como segue:

- a)** Pesagem para determinação da massa final seca ao ar. Determinação de umidade em uma alíquota do material para cálculo da massa seca final e consequente cálculo do rendimento de sólidos.
- b)** Determinação da composição química: Os sólidos obtidos foram submetidos à hidrólise ácida para a determinação do teor de componentes segundo descrito por Ferraz (2000).
- c)** Avaliação da susceptibilidade do material pré-tratado, à hidrólise enzimática conforme descrito no item 5.1.5 (hidrólise enzimática com enzimas comerciais empregando 20 mg de substrato).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Parte 1 - Tratamento de bagaço de cana com sistemas oxidativos baseados na ação de Manganês peroxidase, Lacase e O₂

A hipótese de trabalho desenvolvida neste capítulo considera que sistemas enzimáticos oxidativos podem ser empregados para a remoção de lignina em materiais lignocelulósicos (CUNHA et al., 2010; GÓMEZ-TORIBIO et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2005; MASARIN et al., 2015; SALVACHÚA et al., 2011). No entanto, a eficiência dos sistemas enzimáticos oxidativos é baixa se as reações são realizadas com materiais lignocelulósicos *in natura*, devido à baixa porosidade da parede celular destes materiais (MASARIN et al., 2015). Dentro deste contexto, o bagaço de cana foi inicialmente pré-tratado com um sistema quimiotermomecânico com o objetivo de gerar substratos mais acessíveis às enzimas. Foram avaliadas duas condições de pré-tratamento que deveriam gerar substratos parcialmente deslignificados (LAURITO-FRIEND et al., 2015), conforme descrito no item 6.1.1. Os materiais gerados foram posteriormente tratados com enzimas oxidativas, conforme descrito nos itens 6.1.3 e 6.1.4. A demanda por Manganês peroxidase (MnP) exigiu uma etapa prévia de produção e purificação parcial da enzima, visto não se tratar de um produto comercialmente disponível (descrita no item 6.1.2). Finalmente foi empregado um tratamento do bagaço de cana com um sistema oxidativo mais severo, baseado na ação do O₂ em meio alcalino, descrito no item 6.1.5.

6.2 Pré-tratamento de bagaço de cana com sulfito alcalino (processo quimiotermomecânico)

O bagaço de cana foi submetido a um tratamento quimiotermomecânico (CTM) de duas etapas, seguindo um processo já descrito anteriormente (LAURITO-FRIEND et al., 2015; MENDES et al., 2011). A primeira etapa envolveu o tratamento do bagaço num meio contendo sulfito alcalino e a segunda o desfibramento/refino em um refinador de discos com o objetivo de desfibrar completamente e homogeneizar o material para as etapas subsequentes de aplicação dos sistemas oxidativos e hidrólise enzimática. Os substratos obtidos pela aplicação dos pré-tratamentos CTM foram caracterizados quanto ao rendimento de sólidos residuais e à composição química (Tabela 1). O pré-tratamento CTM foi ajustado para dar origem a dois substratos com características distintas. Um deles foi obtido em condições otimizadas (carga de 10% de Sulfito de sódio e 5% de Hidróxido de sódio) (MENDES et al., 2011) e serviu como substrato modelo para os experimentos de hidrólise enzimática. O outro foi preparado com a metade da carga dos reagentes, o que deu origem a um material mais recalcitrante e sujeito ao melhoramento proveniente das reações efetuadas com os sistemas oxidativos em estudo. A expectativa com o emprego dos dois substratos foi verificar se o material preparado em condições sub-otimizadas poderia ter a recalcitrância diminuída pelo emprego de sistemas oxidativos enzimáticos e biomiméticos ao ponto de atingir uma performance de hidrólise enzimática similar à do material pré-tratado em condições ótimas que requerem elevada carga de reagentes químicos na etapa de pré-tratamento.

O bagaço de cana não tratado (*in natura*) apresentou uma composição química de 24% de lignina, 26% de hemicelulose e 42% de glucana (Tabela 1), a qual está de acordo com resultados reportados anteriormente para bagaços-de-cana (MASARIN et al., 2011; MENDES et al., 2011). O rendimento de sólidos após o pré-tratamento foi decrescente em

função do aumento da severidade do pré-tratamento, visto que maiores cargas de sulfito alcalino aumentam a degradação ou dissolução de alguns dos componentes do material lignocelulósico. A dissolução de componentes da parede celular implica em um aumento de sua porosidade, principalmente em rendimentos de processo da ordem de 70-90% onde não há o colapso interno da parede celular. Além da dissolução parcial de alguns componentes, o tratamento com sulfito alcalino produz um inchamento da fibra e a desestruturação do complexo celular, gerando células individualizadas de fibras, vasos e parênquima (MENDES et al., 2011, 2013). O inchamento das fibras pode ser demonstrado pela maior capacidade de absorção de água observado através dos dados de *Canadian Standar Freeness* (CSF) (Tabela 2). Os valores de CSF são inversamente proporcionais à capacidade do material de reter água, sendo que quanto maior foi a severidade do pré-tratamento, maior foi a capacidade do material pré-tratado de reter água e, por consequência, menor foi o CSF medido no material pré-tratado.

Com base no balanço de massas dos componentes (Tabela 2), podemos observar que o pré-tratamento mais brando causou a remoção de 26% da lignina e 36% da hemicelulose originalmente presentes no bagaço. O aumento da carga de sulfito alcalino usado no pré-tratamento mais severo intensificou a remoção de lignina do material, que atingiu 54% da massa original, enquanto que a remoção de hemicelulose foi de 41%. O balanço de massas para glucana indicou que a quantidade deste componente não foi significativamente afetada pelo pré-tratamento em questão. Os dados obtidos neste pré-tratamento estão de acordo com o trabalho anteriormente desenvolvido em nosso próprio grupo de pesquisas, conforme descrito por (MENDES et al., 2011).

Tabela 2 - Características do pré-tratamento com sulfito alcalino, rendimento de sólidos e composição do bagaço de cana submetido ao pré-tratamento

Amostras de bagaço de cana	Na ₂ SO ₃ (g/100 g de bagaço)	NaOH (g/100 g de bagaço)	CSF (mL) da amostra desfibrada	Rendimento de sólidos (g/100 g de bagaço)	Composição química (g/100 g de bagaço pré-tratado)			Balanço de massas dos componentes (g/100 g de bagaço original)		
					Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Não tratado	0	0	nd	100	24,0 ± 0,1	26,0 ± 1,0	42,0 ± 2,0	24,0 ± 0,1	26,0 ± 1,0	42,0 ± 2,0
Trat. brando	5	2,5	330	83,2	21,2 ± 0,4	20,1 ± 0,8	47,5 ± 1,9	17,7 ± 0,3	16,7 ± 0,6	39,5 ± 1,6
Trat. severo	10	5	120	74,9	14,7 ± 0,5	20,3 ± 0,1	54,7 ± 0,6	11,0 ± 0,4	15,2 ± 0,1	41,0 ± 0,4

Fonte: Arquivo pessoal

(nd) não determinado, pois o material não se apresenta desfibrado

6.3 Preparação e purificação parcial de MnP produzida por *Ceriporiopsis subvermispora*

A atividade de MnP recuperada nos extratos dos cultivos de *C. subvermispora* sobre cavacos de *E. grandis* foi de 745 ± 58 UI/kg de madeira. Este extrato continha elevada quantidade de compostos aromáticos que absorvem na região UV, os quais podem agir como antioxidantes, interferindo nas reações de oxidação que estão sendo avaliadas (KAPICH; GALKIN; HATAKKA, 2007). Por esta razão, optou-se por realizar distintas etapas de purificação que permitisse diminuir a presença de substâncias aromáticas e ao mesmo tempo gerasse um extrato mais concentrado na enzima de interesse (MnP). O procedimento de purificação empregado utilizou uma adsorção seletiva dos compostos aromáticos em carvão ativo e uma etapa posterior de adsorção da MnP em coluna de troca iônica seguida de dessorção com solução salina, conforme metodologia previamente desenvolvida por Carvalho, Ferraz e Milagres (2008). As atividades enzimáticas e o índice de absorção relativa na região UV (280 nm) dos diferentes extratos gerados durante a purificação da enzima são sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade de MnP e absorbância relativa em 280 nm de extratos enzimáticos oriundos do cultivo de *C. subvermispora* sobre madeira de *E. grandis*

Tipo de extrato	Volume (mL)	Atividade (UI/mL)	Atividade total (UI)	Rendimento de recuperação (%)	Razão de concentração	Abs relativa (280 nm)
Bruto	50	0,19	9,5	100	1	14,5
Tratado com carvão ativo	50	0,23	11,5	121	1,2	2,6
Purificado por troca iônica	4	1,75	7	74	9,2	4,7

Fonte: Arquivo pessoal

A atividade de MnP contida em 50 mL do extrato original foi de 9,5 UI e a absorbância relativa do extrato em 280 nm foi de 14,50. A característica original do extrato apresentou um alto teor de compostos aromáticos e uma baixa concentração de MnP. Após o tratamento com carvão ativo, a absorção relativa em 280 nm diminuiu consideravelmente (para 2,6), o que sugere que os compostos aromáticos foram eficientemente adsorvidos pelo carvão ativo e removidos do extrato enzimático. Por outro lado, a atividade total de MnP recuperada após esta primeira purificação foi de 11,5 UI, o que indicaria um aumento na quantidade de enzima disponível. Este aumento (21%) está de acordo com dados previamente reportados e sugere que a remoção de antioxidantes do extrato aumenta a atividade relativa da enzima frente ao substrato de determinação enzimática que é o vermelho de fenol (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008).

A atividade total da enzima (contida em 4 mL após a purificação com a coluna de troca iônica) foi de 7 UI, correspondendo a uma razão de concentração de 9,2 vezes em relação ao extrato original. O índice de absorbância relativa em 280 nm alcançou um valor levemente maior do que o extrato enzimático purificado com carvão ativo (4,7). Este fato pode ter relação com a concentração efetiva do extrato que teve o volume total reduzido de 50 mL para 4 mL. A maior concentração de proteínas presentes no menor volume do extrato recuperado também pode ter levado a aumentar a absorbância relativa em 280 nm, já que aminoácidos aromáticos como tirosina ou triptofano apresentam seu máximo nível de absorção nesse comprimento de onda.

O extrato enzimático purificado foi considerado adequado para os ensaios posteriores de tratamento do bagaço pré-tratado com MnP, pelo qual a atividade de 7 UI de MnP obtidas de 50 mL de extrato foram suficientes para tratar cerca de 200 mg de material lignocelulósico.

6.4 Tratamento do bagaço pré-tratado empregando o sistema oxidativo baseado em MnP

A enzima MnP requer a presença de H_2O_2 gerado *in situ* no meio reacional. Estudos prévios realizados em nosso laboratório (dados não apresentados) indicaram que o H_2O_2 pode inativar parte das enzimas hidrolíticas usadas nas reações de hidrólise de material pré-tratado, além de eventualmente, decompor parte dos açúcares formados durante a hidrólise. Devido ao efeito danoso do H_2O_2 durante a hidrólise de materiais pré-tratados, optou-se por empregar o tratamento do bagaço de cana com MnP em uma etapa prévia à hidrólise enzimática com celulasas comerciais.

Após 72 h de reação dos bagaços pré-tratados com o sistema oxidativo baseado em MnP, os sólidos tratados foram separados e o sobrenadante do meio reacional foi analisado por espectrofotometria UV (Figura 14).

Figura 14 - Absorção no UV dos sobrenadantes da reação de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: A) 5% Na_2SO_3 , 2,5% NaOH e; B) 10% Na_2SO_3 , 5% NaOH, com sistemas oxidativos baseados na ação de MnP. (+MnP) corresponde à mistura reacional contendo MnP / Mn^{2+}

Fonte: Arquivo pessoal

Os espectros observados nos controles apresentaram uma banda típica de absorção de compostos aromáticos, com máximos de absorção na região dos 280 nm e um ombro na

região de 315 nm, atribuído à presença de ácidos hidroxicinâmicos, particularmente ácido ferúlico e cumárico. Quando o sistema reacional continha a enzima MnP, houve maior absorção em 280 nm, indicando algum nível de dissolução de fragmentos de lignina que se acumularam no sobrenadante da reação. Os espectros do sistema reacional contendo MnP também não apresentaram mais o ombro em 315 nm, sugerindo que houve oxidação das duplas ligações presentes na cadeia lateral dos ácidos hidroxicinâmicos.

O material insolúvel gerado após o tratamento com MnP foi hidrolisado com celulasas comerciais. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15. Os dados indicam que a etapa prévia de tratamento com MnP do bagaço pré-tratado na condição mais severa (10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH) proporcionou uma velocidade inicial de hidrólise de glucana levemente superior ao observado no controle (9,6% h^{-1} e 6% h^{-1} , respectivamente). Já a conversão de glucana após 72h de hidrólise atingiu valores similares nos dois casos, cerca de 75-78% de conversão. A conversão de glucana nos bagaços pré-tratados com menor carga de sulfito alcalino (5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH) não foi significativamente afetada pelo tratamento oxidativo baseado na ação da MnP. No caso da hidrólise das xilanas, também não se observou diferença de eficiência entre as amostras estudadas (Figura 15).

Figura 15 - Hidrólise enzimática de amostras de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: (10/5) 10% Na_2SO_3 , 5% NaOH e; (5/2,5) 5% Na_2SO_3 , 2,5% NaOH. (+MnP) corresponde à mistura reacional contendo MnP / Mn^{2+} / Tween 80 / Glicose – Glicose

6.4.1. Tratamento do bagaço pré-tratado empregando o sistema oxidativo baseado em Lacase

O tratamento com Lacase também foi aplicado às amostras de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Como no sistema baseado na ação de Lacases não há demanda por H_2O_2 no meio reacional, as reações foram conduzidas simultaneamente com a hidrólise enzimática. A Figura 16 apresenta os resultados de conversão de glucana e xilana para os dois bagaços pré-tratados em estudo.

Figura 16 - Hidrólise enzimática de amostras de bagaço de cana pré-tratado em duas condições: (10/5) 10% Na_2SO_3 , 5% NaOH e; (5/2,5) 5% Na_2SO_3 , 2,5% NaOH. (+Lacase) corresponde à mistura reacional contendo Lacase comercial / Tween 80 / ácido hidróxibenzoico / MnSO_4 / tampão acetato de sódio, além das enzimas celulolíticas comerciais; (-Lacase) corresponde aos controle sem a adição de Lacase no meio reacional.

Fonte: Arquivo pessoal

Os meios reacionais que continham o sistema oxidativo baseado na ação de Lacases proporcionaram maiores velocidades iniciais de hidrólise tanto de glucana como de xilana (Figura 15). Além disso, a conversão final (após 72 h de reação) de glucana e xilana nos respectivos monômeros foi maior quando Lacase esteve presente no meio reacional. Na conversão de xilana, os incrementos de conversão atingiram valores 5% maiores tanto nos bagaços pré-tratados na condição mais branda como na condição mais severa.

Recentemente Rytioja et al. (2015) mostraram que Lacases comerciais podem aumentar a eficiência de hidrólise de glucanas presentes em substratos celulósicos. Os autores empregaram enzimas hidrolíticas de um basidiomiceto (*Dichomitus squales*) para hidrolisar celulose microcristalina (Avicel) e outros dois substratos, "sugar beet pulp" (SBP) e "wheat bran" (WB), ambos substratos possuem elevado teor de polissacarídeos e um teor de lignina de 1-2% e 10%, respectivamente. As hidrólises enzimáticas conduzidas com uma mistura de CBH I e Cel6A complementadas com Lacase comercial mostraram um aumento de 40% na conversão glucanas quando o substrato foi SBP. Nos demais substratos não houve diferença significativa com a adição de Lacases. Os autores sugerem que a Lacase pode produzir modificações estruturais na lignina que vai sendo solubilizada durante a reação. Tanto a remoção de lignina (resultando numa melhor acessibilidade de enzimas ao substrato) como a eventual polimerização dos fenóis solubilizados (resultando em eliminação de fenóis inibidores de celulasas), poderiam atuar no sentido de aumentar a hidrólise de glucana. Essa hipótese encontra sustento em outros estudos realizados com sistemas Lacase – mediador que indicaram que modificações na lignina produzidas pela Lacase poderiam induzir à polimerização dos fenóis presentes no meio reacional, diminuindo a inibição de celulasas (ASGHER et al., 2014; DU et al., 2013).

Os dados obtidos com a aplicação dos sistemas oxidativos enzimáticos indicam que, nas condições estudadas, a alteração causada pelas enzimas nos substratos não foi suficiente para alterar, de forma expressiva, a recalcitrância dos mesmos. A avaliação dos dois substratos pré-tratados em questão (condição branda e condição severa) indicou que os sistemas enzimáticos aplicados não são capazes de proporcionar melhoras na eficiência de hidrólise que permitam o emprego de pré-tratamentos em condições significativamente mais brandas de reação. Nos dois sistemas enzimáticos testados, o objetivo inicial era fomentar reações de oxidação da lignina a ponto de torná-la solúvel no meio de reação e

com isso gerar um substrato deslignificado menos recalcitrante à etapa subsequente de hidrólise enzimática.

Uma alternativa de sistema oxidativo similar ao enzimático envolve o emprego do gás O_2 como oxidante, aplicando condições de reação mais severas do que aquelas usualmente empregadas nos sistemas enzimáticos. Um processo de deslignificação baseado na ação de O_2 é amplamente empregado na indústria de polpa celulósica branqueada (GELLERSTEDT, 2009). Com base neste processo industrial, foram realizados experimentos adicionais, nos quais se empregou um sistema oxidativo baseado na ação do O_2 e meio alcalino.

6.4.2. Tratamento do bagaço de cana com sulfito alcalino e com O_2 em meio alcalino

Alguns dos tratamentos com O_2 em meio alcalino incluíram a presença Tween 80 para promover possíveis reações de peroxidação de lípidos e geração de radicais organoperoxila, capazes de decompor lignina (HORTA et al., 2011; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; MASARIN et al., 2015). Os resultados para o rendimento de sólidos recuperados após as etapas de tratamento com O_2 e a composição química dos substratos gerados são apresentados na Tabela 4. O rendimento de sólidos após a reação com O_2 sem pré-tratamento do bagaço com sulfito alcalino (pré-tratamento A) foi de 92,6% e a remoção de lignina foi de somente 17,9% (menor entre todos os experimentos realizados neste grupo). Quando a mesma reação com O_2 foi aplicada sobre o material pré-tratado com sulfito alcalino (pré-tratamento brando com 5% de Na_2SO_3 e 2.5% de NaOH), a deslignificação total atingida foi de 62,9% (Tratamento C). Parte desta deslignificação foi decorrente do pré-tratamento inicial com sulfito alcalino (tratamento B) que foi de 26,2%.

A análise conjunta destes resultados indica que o bagaço *in natura* apresentou alto grau de resistência ao tratamento com O₂ nas condições ensaiadas.

Tabela 4 - Detalhes dos tratamentos, rendimentos de sólidos e composição química de bagaço industrial tratado com O₂ em meio alcalino

Amostras de	Na ₂ SO ₃	NaOH	Rendimento	Pressão	Alcali Ativo	Tween 80	Ac Linoleico	Rendimento	Composição de bagaço			Composição de bagaço		
bagaço de cana	(g/100 g de	(g/100 g de	(g/100 g de	O ₂ (Bar)	(g/100 g de	(g/g bagaço)	(g/g bagaço)	(g/100 g de	(g/100 g em base pulpa)			(g/100 g de bagaço original)		
	bagaço)	bagaço)	bagaço)	Cte.	Bagaço)			bagaço)	Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Bagaço industrial														
Não tratado	0	0	100	-	-	-	-	-	24.0 ± 0.1	26.0 ± 1.0	42.0 ± 2.0	24.0 ± 0.1	26.0 ± 1.0	42.0 ± 2.0
Tratamento A	0	0	100	6	4	0	0	92,6	21.2 ± 1.2	22.4 ± 0.2	42.9 ± 0.1	19.7 ± 1.1	20.7 ± 0.2	39.7 ± 0.1
Tratamento B	5	2,5	83,2	0	0	0	0	100	21.2 ± 0.4	20.1 ± 0.8	47.5 ± 1.9	17.7 ± 0.3	16.7 ± 0.6	39.5 ± 1.6
Tratamento C	5	2,5	83,2	6	4	0	0	77,4	13.9 ± 0.4	21.4 ± 0.2	53.3 ± 0.8	8.9 ± 0.3	13.8 ± 0.1	34.3 ± 0.5
Tratamento D	5	2,5	83,2	6	4	0,7	0	82,5	14.1 ± 0.1	19.8 ± 1.5	52.8 ± 0.7	9.7 ± 0.1	13.6 ± 1.0	36.2 ± 0.5
Tratamento E	5	2,5	83,2	6	4	0,35	0	88,3	13.4 ± 0.2	21.5 ± 0.1	54.6 ± 0.5	9.8 ± 0.1	15.8 ± 0.1	40.1 ± 0.3
Tratamento F	5	2,5	83,2	6	4	0,035	0	81,9	14.7 ± 0.1	21.6 ± 0.7	54.0 ± 1.6	9.9 ± 0.1	14.6 ± 0.5	36.4 ± 1.1
Tratamento G	5	2,5	83,2	6	4	0	0,7	86,1	14.0 ± 0.5	20.2 ± 0.5	51.6 ± 1.2	9.9 ± 0.3	14.3 ± 0.4	36.5 ± 0.8
Tratamento H	5	2,5	83,2	6	4	0	0,35	82,4	13.4 ± 0.4	20.9 ± 0.2	53.6 ± 0.3	9.1 ± 0.03	14.1 ± 0.1	36.3 ± 0.2
Tratamento I	5	2,5	83,2	6	4	0	0,035	86,4	15.3 ± 0.4	20.9 ± 0.2	52.7 ± 0.7	10.9 ± 0.3	15.5 ± 0.2	36.4 ± 1.1
Tratamento J	5	2,5	83,2	0	4	0,035	0	86,6	13.9 ± 0.1	21.6 ± 0.3	55.1 ± 0.8	10.0 ± 0.1	15.6 ± 0.2	39.7 ± 0.6

Fonte: Arquivo pessoal

Porém, após uma deslignificação parcial com sulfito alcalino, o bagaço se mostrou mais susceptível à deslignificação com O_2 e o efeito dos dois meios reacionais foi sinérgico, visto que a soma dos efeitos individuais de deslignificação (26,2% do sulfito alcalino + 17,9% do O_2 = 44,1%) foi menor do que o obtido com os dois tratamentos aplicados em série (62,9%).

O tratamento com sulfito alcalino combinado com a deslignificação com O_2 (tratamento C) também proporcionou uma remoção expressiva de hemicelulose, que atingiu 46,9%. A maior parte da remoção de hemicelulose ocorreu na etapa com sulfito alcalino, que foi de 35,8%.

A adição de Tween 80 ao sistema oxidativo não ocasionou um aumento na remoção de lignina, mesmo numa ampla faixa de concentrações avaliadas (Tabela 4, tratamentos D, E e F). Os ensaios foram realizados com concentrações de ácidos graxos entre 0,035 e 0,7 g/g de bagaço, pois o objetivo do tratamento seria gerar radicais organoperoxila que apresentam capacidade de degradar estruturas não fenólicas da lignina (HORTA et al., 2011; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999). A formação destes radicais e a reação deles com a lignina do material lignocelulósico pode ser dependente da concentração de ácido graxo, visto que a reação de peroxidação pode se dar por reação dos radicais inicialmente formados, com o próprio ácido graxo em excesso, situação em que o ácido graxo atuaria como anti-oxidante (SOUTHORN; POWIS, 1988) e não como indutor da degradação de lignina.

Dentro do conjunto de dados descritos na Tabela 4, uma das condições de reação (aquela que empregou 0,35 g de Tween 80/g de bagaço - tratamento E) proporcionou um comportamento diferenciado para a celulose residual no material tratado. Neste caso, o balanço de massas indicou uma menor degradação de celulose, pois a celulose residual foi

igual a 40%, contra 34-36% observado nos outros casos onde se aplicou O_2 na etapa de pré-tratamento.

Com base nos dados da Tabela 4, pode-se concluir que o principal efeito da ação dos tratamentos com O_2 foi a deslignificação do bagaço. A deslignificação em questão pode ser atribuída, tanto à oxidação da lignina e consequente aumento de sua solubilidade em meio alcalino, como à diminuição da massa molar, visto que as duas vias de transformação da lignina devem aumentar sua solubilidade no licor de reação (KALLIOINEN et al., 2013).

A remoção de lignina em materiais lignocelulósicos afeta positivamente uma etapa subsequente de hidrólise enzimática (LEE et al., 2009; MENDES et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2013; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). Desta forma, cada um dos sólidos gerados nas etapas de pré-tratamento foi avaliado frente à hidrólise enzimática com celulasas comerciais conforme descrito a seguir.

6.5 Hidrólise enzimática dos substratos gerados na etapa de tratamento com O_2

Após o tratamento com O_2 , cujos resultados estão mostrados na Tabela 4 (item 8.4.2), os sólidos residuais foram submetidos à hidrólise enzimática dos polissacarídeos (Figura 17). A Figura 17A mostra os níveis de conversão de glucana e xilana obtidos após 72 h de hidrólise enzimática, enquanto que a Figura 17B mostra as velocidades iniciais de hidrólise, determinadas após 4h de reação. As cinéticas completas de conversão dos polissacarídeos estão mostradas no Apêndice A, Figura 1. Para facilitar a discussão, os resultados serão comentados em dois grupos: a) sem presença de ácidos graxos e; b) com a presença dos ácidos graxos.

Figura 17 - A) Conversão dos polissacarídeos após 72 hrs de reação e B) velocidades iniciais de reação determinadas após 4 h de hidrólise de bagaço de cana tratado com sulfito alcalino e O_2 na presenças de distintas concentrações de Tween 80 ou ácido linoleico. Tratamentos: somente O_2 , (B) Sulfito alcalino; (C) Sulfito alcalino seguido de O_2 ; (D,E,F) Sulfito alcalino + O_2 + concentrações crescentes de Tween80; (G,H,I) Sulfito alcalino + O_2 + concentrações crescentes de ácido linoleico; (J) Sulfito Alcalino + Tween 80 sem O_2 .

17A

17B

Fonte: Arquivo pessoal

Para o primeiro grupo de dados (sem a presença dos ácidos graxos), observa-se que os materiais tratados só com O₂ (Fig 17A, tratamento A) e só sulfito alcalino (Fig 17A, tratamento B) apresentaram conversões de glucana que atingiram 29% e 48% após 72 h de hidrólise, respetivamente. Quando o material pré-tratado inicialmente com sulfito alcalino, e subsequentemente com O₂ (Fig 17A, tratamento C), foi submetido à hidrólise enzimática, a conversão de glucana atingiu 72%.

O efeito dos tratamentos oxidativos individuais sobre a conversão de glucana podem ser estimado subtraindo, desde o valor de conversão dos materiais tratados, o valor de conversão do material *in natura* (sem tratamento oxidativo) que foi de 15%, conforme reportado por Mendes et al. (2011). Considerando esta abordagem, podemos mostrar que o benefício do tratamento com O₂ diretamente sobre o material *in natura* corresponderia a 14% (29% após o tratamento menos 15% no material *in natura*). Já para o material tratado com sulfito alcalino, o efeito corresponderia a 33% (48%-15%). Para o tratamento consecutivo (sulfito alcalino seguido de O₂) o efeito seria de 57% (72%-15%). Esta abordagem indica que a soma das conversões dos materiais tratados individualmente corresponde a 47% (33% + 14%), enquanto que o efeito produzido pela combinação consecutiva dos tratamentos acarretou em um efeito sinérgico na hidrólise enzimática do material lignocelulósico, pois atingiu 57%.

No segundo grupo de dados, correspondentes aos tratamentos com a presença de ácido graxos, é possível observar que todos os tratamentos apresentaram valores de conversão de polissacarídeos similares àqueles observados sem a presença dos ácidos graxos, indicando não ter havido um ganho expressivo na conversão dos polissacarídeos decorrente da adição de Tween 80 ou ácido linoleico na etapa de tratamento com O₂.

No presente trabalho, os ácidos graxos foram empregados na etapa de tratamento com O₂, buscando promover a formação de radicais organoperoxila com o objetivo de

aumentar o potencial oxidativo do sistema. Após essa etapa, o material lignocelulósico foi lavado com solução alcalina e água até pH neutro. No entanto, é possível que baixas quantidades de Tween 80 ou Ácido Linoleico tenham permanecido adsorvidas às fibras do material tratado. Isso é relevante, pois a presença destes surfactantes durante a hidrólise enzimática pode ter produzido os pequenos aumentos de eficiência detectados nos sistemas que empregaram O_2 e ácidos graxos, visto que diversos trabalhos mostram um efeito benéfico dos surfactantes relacionados com a diminuição da adsorção improdutiva das enzimas hidrolíticas com a lignina presente nos substratos (ALKASRAWI et al., 2003; ALVIRA et al., 2010; MESQUITA; FERRAZ; AGUIAR, 2015).

6.6 Correlação entre a extensão da remoção de lignina e a eficiência de hidrólise enzimática

Existem diversos trabalhos na literatura demonstrando que o material lignocelulósico pré-tratado por processos que promovem a remoção de lignina produzem um aumento expressivo na digestibilidade da fração polissacarídica (Lee et al., 2009; Varnai et al., 2010; Siqueira et al., 2011; 2013). Até o momento, nosso trabalho incluiu um pré-tratamento envolvendo uma digestão branda com sulfito alcalino (5% Na_2SO_3 , 2,5% NaOH), seguido ou não de pós tratamento com sistemas oxidativos. O material de referência neste estudo foi o bagaço pré-tratado em condições otimizadas (10% Na_2SO_3 , 5% NaOH), cuja remoção de lignina é expressiva e da ordem de 50-60 %. Com base na compilação dos resultados obtidos foi possível relacionar a eficiência de conversão enzimática (conversão de celulose após 72 h de reação) com os respectivos níveis de remoção de lignina obtidos em cada tratamento conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Conversão de celulose após 72 h de hidrólise com enzimas comerciais. Os tratamentos baseados em MnP e Lacase foram aplicados sobre material previamente pré-tratado com sulfito alcalino. **(1)** Bagaço de cana *in natura* (sem pré-tratamento) (Mendes et al., 2011); **(2)**. Bagaço tratado somente com O₂; **(3)**. Bagaço tratado com sulfito alcalino na condição branda (5% Na₂SO₃, 2,5% NaOH); **(4)** Sulfito alcalino na condição branda + MnP; **(5)** Sulfito alcalino na condição branda + Lacase comercial; **(6)** Sulfito alcalino na condição severa + MnP; **(7)**. Sulfito alcalino na condição severa (condição pré-otimizada usada como referência); **(8)**. Sulfito alcalino condição severa + Lacase comercial; **(9)** Sulfito Alcalino condição branda + O₂ + Tween 80; **(10)**. Sulfito alcalino condição branda + O₂.

Fonte: Arquivo pessoal

Considerando o alto grau de recalcitrância do material lignocelulósico, os tratamentos 1 e 2 apresentam baixa porcentagem de conversão da celulose já que neles não foi aplicado o pré-tratamento com sulfito alcalino. Quando o material foi pré-tratado com a condição branda de sulfito alcalino, a remoção de lignina foi maior, o que resultou em uma conversão enzimática de 48% (ponto 3 na Figura 18). Este mesmo material tratado com os sistemas oxidativos enzimáticos não sofreu deslignificação expressiva, nem melhoria significativa na eficiência de hidrólise. Os tratamentos com O₂ (com ou sem Tween 80) produziram uma remoção ainda maior da lignina no material pré-tratado com sulfito alcalino na condição branda, proporcionando uma eficiência de conversão enzimática de

celulose da ordem de 73-75% (pontos 9 e 10 na Figura 18), similar à obtida no tratamento com o dobro da carga de sulfito alcalino (ponto 7 na Figura 18).

A suplementação de Tween 80 no tratamento com O₂ produziu um leve aumento na conversão enzimática; no entanto, não é possível indicar que este pequeno aumento seja devido à formação de alguma espécie radicalar que possa modificar estruturalmente a lignina, ou ao efeito positivo e direto do Tween 80 sobre a hidrólise enzimática segundo o que foi discutido anteriormente.

Quando o bagaço de cana foi submetido a uma condição severa com sulfito alcalino mais aplicação de Lacase comercial (ponto 8 na Figura 18) a remoção de lignina atingiu 52%, e a maior conversão enzimática foi obtida (93.2 ± 1.5 %). É interessante destacar que uma das maiores deslignificações foi obtida com a condição indicada pelo ponto 10 na Figura 18, e não houve uma maior eficiência de hidrólise enzimática correspondente. De fato, os dados da Figura 18 sugerem que existe um limite superior de eficiência de hidrólise para remoções de lignina a partir de cerca de 50%. Outra explicação possível seria que o tratamento oxidativo pode alterar também as características da celulose residual e assim afetar a eficiência de hidrólise, ou remover parte dos polissacarídeos estruturais do material.

7 CONCLUSÕES REFERENTES AOS SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA AÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE, LACASE E O₂

A aplicação de tratamentos oxidativos sobre bagaço de cana pré-tratado sob condições brandas de reação (5% de Na₂SO₃ e 2,5% de NaOH) foi avaliada a partir do emprego de MnP, Lacase e O₂ como agentes oxidantes. Somente o tratamento com O₂ levou a uma remoção elevada de lignina desde o material lignocelulósico, o que se traduziu num aumento na porcentagem de conversão da fração polissacarídica. A adição de Tween 80 na reação realizada na presença de O₂ não acarretou em aumento expressivo na deslignificação do bagaço pré-tratado, nem na hidrólise de glucana. A combinação do tratamento com sulfito alcalino em condições brandas de reação com um processo subsequente de deslignificação com O₂ em meio alcalino proporcionou a preparação de um substrato cuja susceptibilidade à hidrólise enzimática foi elevada e do mesmo nível que aquela obtida com o emprego de um pré-tratamento mais severo (10% Na₂SO₃ e 5% de NaOH). De forma similar a dados prévios da literatura, foi demonstrado que a aplicação de alguns tratamentos capazes de diminuir o teor de lignina no material lignocelulósico pode acarretar em um ganho expressivo na conversão enzimática dos polissacarídeos.

8 PARTE 2 - SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA REAÇÃO DE FENTON

Um segundo sistema oxidativo estudado na presente tese envolveu o uso das reações de Fenton. Nestas reações, o objetivo foi, essencialmente, empregar o radical hidroxila gerado na reação de Fenton como iniciador de degradação do material lignocelulósico, em sistemas mediados ou não por ácidos graxos insaturados. Devido à elevada capacidade oxidativa do radical hidroxila, este sistema foi explorado de forma mais ampla, sendo que a ação direta do radical poderia degradar e/ou alterar a estrutura da lignina e dos polissacarídeos, bem como, associado aos ácidos graxos insaturados, poderia fomentar a formação de radicais organoperoxila que são mais específicos para degradar a lignina.

Os sistemas reacionais baseados na reação de Fenton foram avaliados inicialmente a partir de uma triagem de variáveis que afetavam a eficiência da reação. Este estudo inicial que foi monitorado a partir da emissão de quimiluminiscência (QL) no meio reacional (item 5.2.2). Numa segunda etapa, algumas condições selecionadas de reação foram avaliadas em maior escala, permitindo caracterizar os materiais tratados contemplando a caracterização química completa e da digestibilidade enzimática do material pré-tratado (item 5.2.3). Numa terceira etapa, o trabalho foi expandido para avaliar os sistemas de Fenton aplicados sobre bagaços de cana oriundos de plantas de origem diferenciada. Uma das plantas foi um híbrido experimental de cana que apresentava baixo teor original de lignina e a outra foi uma planta com elevado teor de lignina, porém processada de forma similar ao híbrido experimental em estudo (item 5.2.3).

8.1 Quimioluminescência decorrente das reações de Fenton

As reações de Fenton e Fenton mediada por agentes quelantes (CMF da abreviação em inglês - *Chelator Mediated Fenton*) podem produzir quimioluminescência (QL) (Rodriguez et al., 2001). O fenômeno de QL pode ser explorado no estudo das reações de degradação de materiais lignocelulósicos iniciada pelos reagentes de Fenton, pois a intensidade de QL detectada nestas reações tem sido correlacionada com a geração de radicais no meio reacional (CONTRERAS et al., 2011a). A QL observada nestas reações pode ser atribuída à formação de oxigênio singlete (PATAI; RAPPOPORT, 1988) ou outras espécies quimioluminescentes geradas no meio racional como espécies de Fe^{4+} . Contreras et al. (2011a) demonstraram que existe uma relação entre a intensidade de QL gerada na reação de Fenton com a produção de radicais. Os autores associaram a QL à formação de compostos de Fe^{4+} , os quais podem ser gerados na reação de radicais OH com Fe^{3+} . A presença de dihidroxibenzenos no meio reacional (sistemas CMF) também sugere a possibilidade dos hidroxibenzenos atuarem como doadores de elétrons, podendo reduzir O_2 até radical superóxi-ânion, o qual pode desproporcionar dando origem a H_2O_2 e oxigênio singlete (AGNEZ-LIMA et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2001).

Com base no exposto anteriormente, o presente estudo empregou a QL como um indicador da extensão de reação ocorrida durante a degradação de bagaço de cana iniciada pelos sistemas oxidativos baseados na reação de Fenton. Inicialmente foi avaliado o efeito de algumas variáveis de interesse no processo que envolveu o tratamento de bagaço de cana pelas reações de Fenton direta ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, sem a presença de um quelante mediador). As variáveis em questão foram avaliadas de acordo com uma série de experimentos que seguiram um planejamento fatorial 2^4 completo, sendo elas: a presença ou ausência de, Tween 80, ácido linoleico e bagaço de cana pré-tratado no meio reacional

(bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, 5% Na_2SO_3 e 2.5% NaOH), bem como o emprego de duas concentrações distintas de H_2O_2 . O íon Fe^{2+} esteve presente em todas as reações numa concentração final pré-fixada de 0,15 mM. A QL gerada foi graficada em função do tempo de reação, sendo que a intensidade total de QL emitida em cada reação foi calculada pela integração da área obtida nos gráficos de QL x tempo de reação.

A QL produzida na maioria das reações avaliadas apresentou um gráfico onde um máximo de intensidade apareceu imediatamente após a adição de H_2O_2 ao meio reacional, o qual representa a formação de espécies luminescentes associadas à formação de radical hidroxila. Após a detecção do máximo de QL, a intensidade do sinal diminuiu seguindo uma cinética de decaimento de primeira ordem segundo descrito previamente por Contreras et al. (2011a). Os dados referentes às integrais dos gráficos de QL estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Área total de QL calculadas a partir dos gráficos de QL em função do tempo de (gráficos gerados para sistemas Fenton aplicados no tratamento de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino). Os sinais - e + para a variável H_2O_2 representam concentrações de 2mM e 50 mM, respectivamente. Para Tween 80, e ácido linoléico, os sinais - e + representam 0,00 e 0,35 g do ácido graxo/100 g bagaço seco, respectivamente. Para o bagaço pré-tratado os sinais - e + representam 0 ou 10g/L de bagaço pré-tratado, respectivamente

Exp.	H_2O_2	Tween 80	Ác. Linoleico	Bagaço	Área de QL
1	-	-	-	-	3.017 ± 429
2	+	-	-	-	2.467 ± 304
3	-	+	-	-	2.693 ± 205
4	+	+	-	-	2.942 ± 339
5	-	-	+	-	2.122 ± 128
6	+	-	+	-	2.792 ± 103
7	-	+	+	-	2.967 ± 216
8	+	+	+	-	3.219 ± 137
9	-	-	-	+	3.063 ± 395
10	+	-	-	+	11.649 ± 588
11	-	+	-	+	4.510 ± 374
12	+	+	-	+	15.138 ± 637
13	-	-	+	+	3.436 ± 315
14	+	-	+	+	11.630 ± 439
15	-	+	+	+	5.207 ± 254
16	+	+	+	+	14.298 ± 336

Fonte: Arquivo pessoal

Os dados da Tabela 5 indicam que dois grupos distintos de resultados para a intensidade de QL podem ser identificados. O primeiro apresenta valores de área de QL similares uns aos outros (2000 a 3000) e correspondem aos experimentos onde o bagaço pré-tratado não estava presente no meio reacional. O segundo grupo de dados corresponde aos experimentos realizados na presença de bagaço pré-tratado, nos quais a área de QL variou entre 3000 e 15000. Nestes experimentos, as maiores áreas de QL estiveram associadas às reações realizadas na presença da maior carga de H_2O_2 . É interessante

destacar ainda que a presença de ácidos graxos no meio de reação produziu um aumento na área de QL apenas na presença de bagaço pré-tratado e na maior carga de H_2O_2 .

A QL detectada nas reações de Fenton tem sido associada a um decaimento de primeira ordem (CONTRERAS et al., 2011b). No entanto, podemos observar que nos experimentos em que houve a adição de compostos como Tween 80 ou a presença de bagaço de cana, o decaimento da QL seguiu um padrão diferenciado. Um exemplo, é apresentado na figura 19.

Figura 19 - Decaimento de QL gerada pela reação de Fenton em presença de Tween 80 e bagaço de cana

Fonte: Arquivo pessoal

A análise estatística dos dados da Tabela 5 permitiu calcular os efeitos de cada variável na QL produzida nas reações, e as principais interações de efeitos conforme mostrado na Tabela 6. De forma similar ao observado pela inspeção qualitativa dos dados, a variável de reação que apresentou o maior efeito sobre a área de QL foi a presença de bagaço pré-tratado no meio reacional (efeito positivo com valor de 5000-6000). A segunda variável de maior importância foi a concentração de H_2O_2 , cujo valor do efeito foi da ordem de 4000-5000 e, por ser positivo, indica que a maior concentração de H_2O_2 induz uma maior QL no meio reacional, provavelmente decorrente da maior formação radicais OH. A presença de Tween 80 também mostrou efeito positivo e significativo na área de

QL decorrente da reação, porém a magnitude do efeito foi cerca de 4 a 5 vezes menor do que o observado para o bagaço pré-tratado e para o H_2O_2 . Considerando as interações entre as variáveis, nota-se que a presença de bagaço pré-tratado combinada com H_2O_2 apresentou efeito significativo e positivo na área de QL (da ordem de 4000-5000), bem como a interação entre Tween 80 e bagaço pré-tratado, cujo valor do efeito foi cerca de 4 vezes menor do que os descritos anteriormente (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeitos das variáveis de reação sobre a quimiluminescência decorrente da reação de Fenton realizada de acordo com os experimentos descritos na Tabela 5

Variável e combinações de segunda ordem	Valor do efeito
H_2O_2	4607
Tween 80	1317
Ácido linoleico	57
Bagaço pré-tratado	5872
H_2O_2 x Tween 80	382
H_2O_2 x Bagaço	4518
Tween 80 x Ácido linoleico	111
Tween 80 x Bagaço	1027

Fonte: Arquivo pessoal

8.1.1. Quimiluminescência decorrente das reações de Fenton mediada por quelantes (CMF)

A emissão de QL em reações CMF induzidas pela presença de Fe^{3+} e 1,2-DHB no lugar de Fe^{2+} , foi avaliada em condições de elevada QL anteriormente observadas nas reações de Fenton tradicionais, conforme descrito no item anterior (Tabelas 5 e 6). Para isso, foi avaliada a QL decorrente das reações realizadas em meios que continham Fe^{3+} e

1,2-DHB (ambos em 0,15 mM) e 50 mM de H₂O₂ na presença de Tween 80 ou ácido linoléico (0,35 g /100 g bagaço seco) e 10 g/L de bagaço pré-tratado.

Os resultados de área de QL observadas em cada reação são apresentados na Tabela 7. Observa-se que valores da área de QL (Tabela 7) foram consideravelmente maiores nas reações CMF do que nas reações de Fenton tradicionais (Tabela 5). Por exemplo, a reação de Fenton tradicional com 50 mM de H₂O₂ (experimento 2, Tabela 5) proporcionou uma área de QL de 2.467 comparado com 766.944 observado em reação semelhante CMF mediada por 1,2-DHB (Tabela 7). Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura que demonstram que a presença de 1,2-DHB (o qual pode reduzir Fe³⁺ para Fe²⁺) proporciona uma maior quantidade de Fe²⁺ disponível para reagir com H₂O₂ e iniciar continuamente a reação de Fenton (CONTRERAS et al., 2011b; RODRÍGUEZ et al., 2001).

Tabela 7 - Área de QL decorrente de reações de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) com distintos substratos e suplementada com ácidos graxos e a presença de 10 g/L de bagaço de cana pré-tratado

Meio reacional	Área de QL
CMF	766.944
CMF / Linoleico	779.069
CMF / Linoleico / Bagaço	115.372
CMF / Linoleico / Avicel	551.200
CMF / Tween 80	801.570
CMF / Tween 80 / Bagaço	128.161
CMF / Tween 80 / Avicel	599.115

Fonte: Arquivo pessoal

A presença de ácidos graxos nas reações mediadas por 1,2-DHB manteve os níveis elevados de QL observados na reação de CMF sem a presença de ácidos graxos ou derivados (Tabela 7). Quando os ácidos graxos foram adicionados aos meios reacionais,

poderia haver uma atividade antioxidante visto que eles podem reagir rapidamente com radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton. Por outro lado, nas reações CMF que continham bagaço pré-tratado ocorreu uma diminuição considerável da QL, o que sugere uma interação, seja dos reagentes de Fenton ou dos radicais OH, com algum constituinte do material lignocelulósico. Algumas reações de referência foram conduzidas na presença de Avicel (celulose microcristalina), substituindo o bagaço pré-tratado. Os dados desta reação corroboram a hipótese de uma forte interação dos radicais com a lignina do material lignocelulósico, pois a QL na presença de Avicel diminuiu cerca de 5 vezes menos do que o observado na reação que continha bagaço pré-tratado (Tabela 7).

O padrão da intensidade do sinal de QL em função do tempo de reação pode ser um indicativo importante da quantidade ou dos tipos de espécies quimiluminescentes geradas no meio reacional (CONTRERAS et al., 2011b). A Figura 20 (A, B e D) ilustra a QL clássica observada nas reações CMF, onde após o valor máximo de QL ser atingido há uma cinética de decaimento que segue uma equação de primeira ordem clássica (CONTRERAS et al., 2011b). No entanto, nas reações CMF realizadas na presença de bagaço pré-tratado foi observado um decaimento diferenciado (Figura 20 C) daquele observado nos outros meios reacionais. Esse padrão de decaimento diferenciado sugere que está ocorrendo a oxidação do bagaço e isso pode gerar um segundo aumento de espécies quimiluminescentes. Os intermediários formados nesta reação poderiam ser diferentes e apresentar uma intensidade de emissão de QL menor do que o pico principal de emissão de QL, visto que a área total diminuiu cerca de 7 vezes em relação à reação CMF sem bagaço (Tabela 7). Esta observação pode ser uma evidência de que a reação de peroxidação lipídica pode estar gerando novas espécies luminescentes e subsequentemente novos radicais na estrutura da lignina, como o radical organoperoxila no carbono alfa, já sugerido

por Kapich, Jensen e Hammel (1999) para a peroxidação lipídica iniciada por MnP e outros sistemas oxidativos.

Os dados obtidos pela reação CMF na presença de Tween 80 seguiu o mesmo comportamento que aquele observado com ácido linoléico (Figura 21), corroborando a possível interação dos radicais formados com a lignina do bagaço pré-tratado.

Figura 20 - Perfil de QL em função do tempo de reação para reações CMF ausência (A) ou presença de ácido linoléico (B), ácido linoléico + bagaço pré-tratado (C) e ácido linoléico + Avicel (D).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 21 - Perfil de QL em função do tempo de reação para reações CMF na ausência (A) ou presença de Tween 80 (B), Tween 80 + bagaço pré-tratado (C) e Tween 80 + Avicel (D).

Fonte: Arquivo pessoal

Os radicais inicialmente formados no sistema CMF + ácidos graxos, ao reagir com a lignina presente no bagaço pré-tratado, podem produzir alterações estruturais úteis para a desestruturação da parede celular (JUNG et al., 2015; SAKDARONNARONG; JONGLERTJUNYA, 2012) como se supõe ocorrer nos sistemas *in vivo* dos fungos de decomposição parda (GOODELL et al., 1997; NILSON, T., 2009). Se consideramos que este mecanismo empregando radicais outorga um alto potencial degradativo aos fungos de decomposição parda, permitindo que eles acessem os polissacarídeos mesmo na presença de lignina (ARANTES et al., 2011; SALVACHÚA et al., 2011), a diminuição na QL

observada nos dados descritos anteriormente poderia indicar uma forte interação entre radicais OH, oriundos da reação de CMF (somada à peroxidação lipídica) e a lignina, o que pode produzir um nível elevado de modificações estruturais no polímero. Este fenômeno tem sido amplamente descrito na literatura (FILLEY et al., 2002; KOENIG et al., 2010; PU; HALLAC; RAGAUSKAS, 2013; YELLE et al., 2011) e tem uma grande importância no processo de biodegradação de lignocelulósicos, além de apresentar potencial para a aplicação na desestruturação da biomassa a ser submetida a processos de hidrólise enzimática.

As reações em discussão também poderiam acarretar alterações estruturais na fração polissacarídica da biomassa, uma vez que também tem sido descrito que interações entre celulose e radicais pode produzir uma diminuição no grau de polimerização (DP) e um aumento na proporção de celulose cristalina, provavelmente por haver uma degradação mais intensa das regiões amorfas do polímero (HOWELL et al., 2009; KIRK; CULLEN, 1998). Num trabalho recente, Sakdaronnarong e Jonglertjunya (2012) realizaram uma degradação oxidativa de bagaço de cana e palha de arroz empregando as reações CMF, porém sem a suplementação com ácidos graxos. Os resultados de análise de raios-X mostraram que o material lignocelulósico tratado com o sistema oxidativo CMF apresentou um menor índice de cristalinidade, diferindo dos materiais tratados em reações de Fenton empregando somente Fe^{2+} e H_2O_2 . Este resultado, segundo os autores, sugere que o mecanismo degradativo envolveu predominantemente a ruptura de pontes de hidrogênio inter e intra-cadeias na celulose.

8.2 Composição química e hidrólise enzimática do material lignocelulósico tratado nos sistemas CMF

Para avaliar se o tratamento CMF poderia afetar a composição química e a digestibilidade dos polissacarídeos do bagaço de cana frente a celulasas comerciais, as

reações descritas anteriormente foram ampliadas em escala a fim de gerar biomassa suficiente para a caracterização química e para os estudos de digestibilidade enzimática. O tratamento foi inicialmente conduzido em condições denominadas "suaves" na Tabela 8 que envolveram 4 h de reação de bagaço de cana pré-tratado com o sistema CMF. Os dados de rendimento de sólidos residuais e composição química do material nas condições "suaves" de reação mostraram que não houve alterações expressivas no bagaço de cana (Tabela 8).

A baixa eficiência de degradação do bagaço de cana nas condições "suaves" de reação foi observada em condições experimentais que previamente mostraram valores elevados de QL em solução. Considerando que a QL deve ser decorrente da formação de radicais, a expectativa era obter maior alteração na biomassa tratada. É possível supor que os radicais gerados no sistema reacional devem ter promovido alterações estruturais na lignina (desmetilação, oxidação da cadeia lateral, despolimerização e até mesmo repolimerização), sem, no entanto, ter levado à formação de fragmentos solúveis (de baixa massa molar), conforme observado em reações mais severas reportadas na literatura (KOENIG et al., 2010; SALVACHÚA et al., 2011).

Para avaliar se houve a formação de intermediários oxidados no bagaço tratado, alguns dos resíduos tratados foram submetidos a uma extração (lavagem) alcalina subsequente (NaOH 0,1% p/v; 1 hrs; 60° C), similar à empregada em processos de branqueamento de polpa celulósica (GELLERSTEDT, 2009). Este tratamento alcalino poderia solubilizar os fragmentos oxidados, ainda insolúveis no pH ácido da reação CMF. Os resultados indicaram que o rendimento de sólidos residuais se manteve na faixa de 95% e o teor de lignina no material lignocelulósico ainda manteve-se praticamente inalterado sob as condições de reação avaliadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Composição química do material lignocelulósico após tratamento oxidativo da reação de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) suplementado com Tween 80

Amostras	Condição CMF (mM)		Tween 80 (g/100g seco bagaço)	Time (hrs)	OH ativo (g/100g seco bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço)	Composição bagaço (g/100 g de polpa)			Composição bagaço (g/100 g de bagaço original)		
	1,2-DBH	Fe 3+					Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Bagaço usina	-	-	-	-	-	100	24.0 ± 0.1	26.0 ± 1.0	42.0 ± 2.0	24.0 ± 0.1	26.0 ± 1.0	42.0 ± 2.0
Sulfito Alcalino (SA)	-	-	-	-	-	83,2	21.2 ± 0.4	20.1 ± 0.8	47.5 ± 1.9	17.7 ± 0.3	16.7 ± 0.6	39.5 ± 1.6
Suave	0,15	0,15	0,35	4	0	95,2	20.0 ± 0.9	19.7 ± 1.1	45.2 ± 2.1	15.8 ± 0.7	15.6 ± 0.8	33.7 ± 1.7
	0,15	0,15	0,35	4	1	94,2	19.6 ± 0.8	19.5 ± 1.2	43.7 ± 3.0	15.4 ± 0.7	15.3 ± 0.9	34.2 ± 2.3
	0,15	0,15	0	4	1	93,4	19.2 ± 1.0	21.1 ± 1.4	46.6 ± 1.1	14.9 ± 0.8	16.4 ± 1.1	36.2 ± 1.1
	0,15	0	0,35	4	1	93,3	19.9 ± 0.8	20.2 ± 1.0	44.8 ± 2.2	15.4 ± 0.6	15.7 ± 0.8	34.7 ± 1.7
	0,15	1	0	4	0	96,8	26.1 ± 0.2	19.9 ± 1.1	47.9 ± 1.6	21.0 ± 0.2	14.9 ± 2.0	38.6 ± 1.3
	0,15	1	0,35	4	0	95,9	24.6 ± 2.0	18.2 ± 0.5	43.8 ± 1.7	19.6 ± 1.6	14.5 ± 0.4	35.0 ± 1.4
Tratamento 1 Severo	0,15	1	0,35	30	1	75,6	21.3 ± 0.4	16.8 ± 0.1	51.0 ± 1.6	13.4 ± 0.2	10.3 ± 0.5	31.3 ± 1.6
Tratamento 2 Severo	0,15	1	0	30	1	79,4	24.7 ± 1.8	17.5 ± 0.5	52.7 ± 1.3	16.3 ± 1.2	11.5 ± 0.3	34.8 ± 0.9
Tratamento 3 Severo	0,15	0	0,35	30	1	92,0	22.2 ± 0.1	20.8 ± 0.1	50.2 ± 0.4	16.8 ± 0.4	15.9 ± 0.1	38.3 ± 0.3
Tratamento 4 Severo	0,15	1	0,35	30	0	88,4	25.3 ± 0.1	16.3 ± 0.7	45.6 ± 0.8	18.6 ± 0.1	12.0 ± 0.5	33.0 ± 1.0
Tratamento 5 Severo	0,15	1	0	30	0	88,5	23.4 ± 2.2	18.0 ± 0.7	47.9 ± 2.2	17.3 ± 1.6	13.3 ± 0.5	36.4 ± 1.6

Fonte: Arquivo pessoal

Mesmo com a baixa eficiência de solubilização de fragmentos de lignina desde o material tratado no sistema CMF sob condições "suaves", o sólido residual foi submetido à hidrólise enzimática para conhecer se as possíveis modificações estruturais nos componentes do material lignocelulósico poderiam resultar em melhorias na eficiência de hidrólise enzimática. Os dados obtidos estão mostrados na Figura 22, e indicam que não houve diferença entre as hidrólises realizadas nas amostras controle e as amostras tratadas no sistema CMF. Contrário a estes dados, há trabalhos publicados que indicam um aumento de eficiência de hidrólise enzimática quando se aplica a reação de CMF sobre materiais lignocelulósicos (SAKDARONNARONG; JONGLERTJUNYA, 2012). No entanto, vale menção de que o trabalho apresentado pelos autores anteriormente citados empregou uma concentração de H_2O_2 nas reações que foi 5 vezes maior do que aquelas usadas em nossos estudos até o momento. Em outro trabalho recentemente publicado por Jung et al. (2015), todos os componentes do material lignocelulósico foram degradados em aproximadamente 50% após o tratamento com a reação CMF, empregando uma carga de H_2O_2 de 0.85g/g de material lignocelulósico. A elevada carga de H_2O_2 (3,4 vezes maior do que a empregada em nossos estudos) teria sido a responsável pela degradação observada.

Como os dados iniciais de nossos experimentos mostraram que a concentração de H_2O_2 influencia de maneira direta a quantidade de radicais produzidos na reação de Fenton, pode-se assumir que as reações desenvolvidas até o momento foram sub-otimizadas para a finalidade de degradação do bagaço pré-tratado.

Figura 22 - Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) na Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino submetido a uma etapa posterior de tratamento oxidativo no sistema CMF. T1: sistema CMF (0.15mM Fe^{3+} e catecol; 50mM H_2O_2 ; 0.35 % p/p Tween 80; 4 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe^{3+} ; T4: controle sem lavagem alcalino.

Fonte: Arquivo pessoal

Este primeiro grupo de dados empregando a reação CMF no tratamento de bagaço pré-tratado por sulfito alcalino, sugere que as alterações ocorridas no material lignocelulósico nesta condição de reação CMF branda (e biomimética), foram insuficientes para promover uma mudança expressiva na composição química final do material, bem

como na sua digestibilidade frente a enzimas hidrolíticas. Desta forma, algumas modificações nas condições de reação foram testadas visando obter uma maior severidade na reação CMF empregada. Neste contexto, as novas condições de reação foram: 1mM Fe^{3+} ; 30 hrs de reação seguida de extração alcalina (Tabela 8). Cabe destacar que antes de iniciar a reação com H_2O_2 , o material lignocelulósico foi impregnado com solução de íons Fe^{3+} durante 16h, posteriormente foi realizada a remoção do excesso de íons Fe^{3+} através de filtragem do material, descartando a solução com excesso de Fe^{3+} . Este procedimento foi adotado visando manter somente o íon Fe^{3+} adsorvido ao material lignocelulósico, para maximizar a produção de radicais hidroxila sobre a própria superfície da parede celular e não em solução, o que poderia acarretar em um aumento na eficiência do sistema oxidativo proposto. Esta abordagem foi preferida, ao invés da àquela reportada por trabalhos recentes, onde foi empregada uma alta carga de H_2O_2 (HE et al., 2015; JUNG et al., 2015; KATO et al., 2014).

Os resultados obtidos nas condições experimentais mencionadas anteriormente estão descritos na Tabela 8, sob a indicação de condições "severas" de reação. Neste caso, as reações que foram conduzidas na presença de íons Fe^{3+} e Tween 80 geraram um rendimento de sólidos residuais de 76% (tratamento severo 1 - Tabela 8). Nas mesmas condições, porém na ausência de Tween 80, também houve ação expressiva do sistema CMF, gerando um rendimento de sólidos residuais de 79% (tratamento severo 2 - Tabela 8). As reações realizadas sem a presença de Fe^{3+} ou sem a extração alcalina subsequente proporcionaram rendimentos de sólidos residuais elevados (88-92%), evidenciando a ação do sistema CMF. As reações CMF na condição de reação com todos os reagentes (tratamento severo 1 - Tabela 8), causaram uma degradação inespecífica dos componentes do bagaço pré-tratado, visto que houve uma diminuição na massa residual de lignina,

xilana e glucana, representando remoções de 24%, 38% e 21%, respectivamente (Tabela 8).

A hidrólise enzimática dos sólidos residuais das reações CMF mais severas, está mostrada na Figura 23. Os dados indicam que o tratamento CMF severo seguido de extração alcalina, além de ter proporcionado a deslignificação do bagaço e a remoção parcial de polissacarídeos, também beneficiou o processo de hidrólise enzimática, visto que o bagaço pré-tratado original proporcionou uma conversão máxima de celulose e xilana de 48,4 % e 45,2 %, respectivamente, enquanto que este material submetido ao tratamento CMF severo, suplementado com Tween 80 e seguido de extração alcalina proporcionou conversões máximas de celulose e xilana de 65,2 % e 60,2 %, respectivamente

Figura 23 - Conversão enzimática de açúcares estruturais de bagaço de cana de usina pré – tratado com sulfito alcalino e subsequente aplicação de sistema oxidativo CMF T1: sistema CMF (1mM Fe^{3+} , 0.15mM catecol; 50mM H_2O_2 ; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe^{3+} ; T4: controle sem lavagem alcalino.

(continua)

(Conclusão_Fig. 23)

Fonte: Arquivo pessoal

8.3 Sistemas oxidativos baseados na reação de Fenton aplicados em bagaço de cana oriundo de plantas selecionadas por conter baixo teor original de lignina

Como os resultados de remoção de componentes (principalmente lignina) foi expressivo nas condições de reação CMF mais severas, dois outros substratos foram avaliados empregando o mesmo sistema oxidativo. Estes dois substratos também correspondem a bagaço de cana de açúcar, porém tiveram origem em uma coleção de plantas experimentais previamente selecionadas por apresentarem um teor de lignina original mais baixo (MASARIN et al., 2011). A expectativa com estes materiais tem sido de que ao partir de um menor teor original de lignina, seja possível aplicar reações de pré-tratamento em condições mais amenas, e obter maior eficiência de hidrólise enzimática numa mesma condição de pré-tratamento (LAURITO-FRIEND et al., 2015).

Para o estudo em questão foram selecionadas duas amostras de cana. Uma delas corresponde a um híbrido experimental que apresenta baixo teor de lignina (híbrido 58, com teor de lignina de 16,8%). A outra amostra foi proveniente de um cultivar de

referência cujo teor de lignina original é de 24,0%. O emprego de uma planta de referência foi necessário, pois o processamento industrial da cana também pode afetar as características do material lignocelulósico em estudo. É sabido, por exemplo, que a extração de sacarose industrial é feita por uma série de etapas de moagens, sendo algumas delas empregando água quente como meio de extração final da sacarose (MASARIN et al., 2011).

As duas amostras de cana em estudo foram inicialmente preparadas por picagem em picadeira de facas e posterior extração da sacarose por agitação do material em água fria. Ou seja, as amostras não foram originárias de um processo de moenda industrial como o que ocorreu na amostra de bagaço de cana estudada anteriormente. A cana picada e extraída com água fria apresenta uma estrutura do complexo celular menos colapsada e mais porosa do que o bagaço de cana de origem industrial, conforme demonstrado recentemente em uma tese de doutorado do nosso grupo de pesquisa desenvolvida por Santos (2015).

O emprego do sistema de reação CMF severo seguido de extração alcalina mostrou uma resposta expressivamente diferenciada entre as canas de referência (RC) e o híbrido 58, conforme mostrado na Tabela 9. Nos dois casos, a reação CMF conduzida na ausência de Tween 80, seguida de extração alcalina foi a que proporcionou os maiores níveis de solubilização do bagaço de cana, resultando em rendimento de sólidos residuais de 75% e 83% para o RC e o H58, respectivamente. Nestes casos, as remoções de lignina e hemicelulose foram, respectivamente, 58% e 32% para o RC e 15% e 37% para o H58 (Tabela 9). Nota-se que no caso da cana RC, a extensão de remoção de lignina foi atipicamente elevada (58%), pois tanto no caso do bagaço de origem industrial, como no H58, as remoções de lignina causadas pelo sistema CMF foram inferiores a 25%, com ou sem a presença de Tween 80 no meio reacional.

A extensão da remoção de lignina causada pelo sistema CMF foi confirmada por repetição de todo um ciclo de tratamento da amostra novamente, seguida de determinação do rendimento de reação e da composição química. Também vale menção, que os dados de balanço de massa de componentes na amostra RC tratada pelo sistema CMF foi coerente, visto que os teores de celulose, hemicelulose e lignina somaram 95.7% (Tabela 9). A busca por uma característica diferenciada na cana RC em estudo indicou que o teor ácidos hidroxicinâmicos presentes nesta amostra era diferenciado (MASARIN et al., 2011). Os dados descritos neste trabalho mostraram que esta foi a cana com o maior teor de ácidos ferúlico e cumárico entre 13 amostras de cana caracterizadas, incluindo o bagaço de cana de origem industrial e o híbrido 58, avaliados na presente tese.

Tabela 9 - Composição química bagaço de cana de referência (RC) e híbrido 58 após tratamento oxidativo da reação de Fenton mediada por agentes quelantes (CMF) suplementado com Tween 80

Amostras	Condição CMF (mM)		Tween 80 (g/100 g seco bagaço)	Time (hrs)	OH ativo (g/100 g seco bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço)	Composição bagaço (g/100 g de polpa)			Composição bagaço (g/100 g de bagaço original)		
	1,2-DBH	Fe 3+					Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Cultivar de referência	-	-	-	-	-	100	24.5 ± 0.5	25.2 ± 0.4	38.2 ± 0.2	24.5 ± 0.5	25.2 ± 0.4	38.2 ± 0.2
Sulfito Alcalino (AS)	-	-	-	-	-	85,2	21.4 ± 0.1	23.9 ± 0.1	45.0 ± 0.1	18.2 ± 0.1	20.3 ± 0.1	38.3 ± 0.1
Tratamento 1	0,15	1	0,35	30	1	79,4	23.3 ± 0.5	19.1 ± 0.0	51.6 ± 0.7	15.8 ± 0.4	12.9 ± 0.0	34.9 ± 0.5
Tratamento 2	0,15	1	0	30	1	74,9	11.9 ± 0.5	21.0 ± 0.6	62.8 ± 0.1	7.6 ± 0.3	13.7 ± 0.2	40.1 ± 0.1
Tratamento 3	0,15	0	0,35	30	1	94,6	14.0 ± 0.7	24.5 ± 1.1	54.1 ± 1.1	10.9 ± 0.6	19.1 ± 0.8	42.2 ± 0.8
Tratamento 4	0,15	1	0,35	30	0	84,9	26.0 ± 0.2	19.6 ± 1.2	46.4 ± 2.9	18.8 ± 0.1	14.2 ± 0.9	34.2 ± 1.9
Híbrido 58	-	-	-	-	-	100	18.6 ± 0.1	26.3 ± 0.1	40.9 ± 0.3	18.6 ± 0.1	26.3 ± 0.1	40.9 ± 0.3
Sulfito Alkalino (AS)	-	-	-	-	-	87,8	18.4 ± 0.2	24.5 ± 0.4	47.9 ± 0.7	16.2 ± 0.2	21.5 ± 0.4	42.0 ± 0.6
Tratamento 1	0,15	1	0,35	30	1	84,3	18.0 ± 0.8	19.7 ± 0.1	51.2 ± 0.3	13.3 ± 0.6	14.6 ± 0.1	37.9 ± 0.2
Tratamento 2	0,15	1	0	30	1	83,4	18.8 ± 1.0	18.5 ± 1.1	47.6 ± 3.4	13.8 ± 0.7	13.5 ± 0.8	36.3 ± 1.0
Tratamento 3	0,15	0	0,35	30	1	96,1	19.5 ± 1.5	19.6 ± 0.7	41.4 ± 1.6	16.4 ± 1.3	16.6 ± 0.6	34.9 ± 1.4
Tratamento 4	0,15	1	0,35	30	0	88,8	21.1 ± 1.3	19.5 ± 1.8	47.0 ± 4.0	16.4 ± 1.0	15.2 ± 1.4	36.6 ± 3.1

Fonte: Arquivo pessoal

Os ácidos hidroxicinâmicos podem estar ligados ao material lignocelulósico através de ligações éster na carboxila do C γ , ou éster e éter, sendo que a ligação éter é formada entre o Oxigênio da posição 4 do anel aromático com uma cadeia carbônica alquílica lateral (DEL RÍO et al., 2015; MASARIN et al., 2011).

Um trabalho interessante descrito por Elaoud et al. (2012) mostrou que radicais $\cdot\text{OH}$ gerados em um sistema do tipo Eletro – Fenton foi capaz de degradar 100% de ácido cumárico presente nos resíduos líquidos gerados pela indústria de azeite de oliva. Os autores mostraram que a velocidade de degradação do ácido cumárico segue a uma cinética de pseudo – primeira ordem e que, após 50 min de reação, a degradação de 1mM de ácido cumárico foi completa. Mais recentemente, Nguyen, Zhang e Doherty (2015), estudaram a degradação de compostos fenólicos responsáveis pela formação de materiais escuros em produtos alimentícios. Esses autores avaliaram a degradação dos ácidos cafeico, ferúlico e cumárico empregando o sistema Fenton em solução contendo 200mM de cada ácido. Os resultados mostraram a degradação de 90% do ácido cafeico e 70% de ácido ferúlico e cumárico. Quando os 3 compostos foram misturados, a degradação total atingiu 70%.

Os antecedentes citados nos parágrafos anteriores sugerem que o sistema CMF avaliado nesta tese pode ter sido eficiente para degradar os ácidos hidroxicinâmicos presentes no bagaço de cana, especialmente na amostra com o maior teor destes compostos. Para avaliar esta hipótese, os teores de ácidos ferúlico e cumárico foram determinados em todas as amostras avaliadas (Tabela 10). Os dados obtidos mostram que o bagaço de referência é, de fato, o material que possui maior teor original de ácidos hidroxicinâmicos (9.2 ± 1.0). Após a aplicação do pré-tratamento brando com sulfito alcalino (5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH) o teor de ácido ferúlico e cumárico diminuiu em todos os materiais pré-tratados. No entanto, o tratamento CMF subsequente proporcionou uma diminuição significativa no teor desses compostos. No caso do bagaço

de referência, a remoção de ácidos hidróxicinâmicos totais foi de cerca de 90% (diminuindo de 9,2 para 1,1 g/100 g de bagaço original) (Tabela 10).

Tabela 10 - Balanço de massas de ácidos hidroxicinâmicos dos distintos materiais lignocelulósicos antes e depois dos pré-tratamento com sulfito alcalino e tratamento baseado na reação de Fenton

Amostras	Condição CMF (mM)		Tween 80 (g/100 g seco bagaço)	Tempo (hrs)	OH ativo (g/100 g seco bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço)	(g/100 g de bagaço)					
	1,2-DBH	Fe 3+					Tratamento alcalino brando			Tratamento alcalino severo		
							Ferulico	Cumarico	soma	Ferulico	Cumarico	soma
Bagaço usina	-	-	-	-	-	100	0,5 ± 0,0	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	6,1 ± 0,8	7,5 ± 0,8
Sulfito alcalino (SA)	-	-	-	-	-	83,2	0,1 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,2	4,9 ± 0,1	6,0 ± 0,2
Tratamento 1	0,15	1	0,35	30	0	88,4	0,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2	4,7	5,9
Tratamento 2	0,15	1	0	30	1	79,4	0,1 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,1	4,5	5,6
Tratamento 3	0,15	0	0,35	30	1	92,0	0,1 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,2	4,8	6,0
Tratamento 4	0,15	1	0,35	30	1	75,6	0,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2	4,7	5,9
Cultivar de referência	-	-	-	-	-	100	0,6 ± 0,0	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	7,5 ± 1,0	9,2 ± 1,0
Sulfito alcalino (SA)	-	-	-	-	-	85,2	0,2 ± 0,0	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,5 ± 0,4	7,0 ± 0,5
Tratamento 1	0,15	1	0,35	30	1	79,4	0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,1	3,9 ± 0,3	4,9 ± 0,4
Tratamento 2	0,15	1	0	30	1	74,9	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Tratamento 3	0,15	0	0,35	30	1	94,6	0,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	5,1 ± 0,5	6,5 ± 0,8
Tratamento 4	0,15	1	0,35	30	0	84,9	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0	4,5 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Clone 58	-	-	-	-	-	100	0,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	4,4 ± 1,2	5,2 ± 1,2
Sulfito alcalino (SA)	-	-	-	-	-	87,8	0,2 ± 0,0	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	6,2 ± 0,1	7,7 ± 0,2
Tratamento 1	0,15	1	0,35	30	1	84,3	0,2 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,8	3,6	4,4
Tratamento 2	0,15	1	0	30	1	83,4	0,2 ± 0,0	1,8	2,0	1,1 ± 0,1	4,6 ± 0,2	5,7 ± 0,3
Tratamento 3	0,15	0	0,35	30	1	96,1	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	6,6 ± 0,2
Tratamento 4	0,15	1	0,35	30	0	88,8	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	4,6 ± 0,3	5,6 ± 0,4

Fonte: Arquivo pessoal

O bagaço das amostras RC e H58 tratados no sistema CMF também foram submetidos à hidrólise enzimática sob as mesmas condições empregadas para o bagaço de usina. As Figuras 24 e 25 mostram a cinética de conversão de celulose e hemicelulose, respectivamente, obtidas em cada caso. Observa-se que o após a aplicação do tratamento CMF, a hidrólise enzimática dos açúcares no bagaço de referência, atingiu valores superiores a 85% tanto para celulose como para hemicelulose. Já para o híbrido 58, o ganho na conversão dos açúcares não foi considerável em relação aos controles.

É importante destacar que a hidrólise enzimática do híbrido 58, originalmente com baixo teor de lignina, submetido a pré-tratamento com sulfito alcalino (5% Na_2SO_3 , 2,5% NaOH), não superou a 50% de conversão, enquanto que para bagaço de referência e de usina, a conversão, nessa situação ultrapassou 50 %. Resultados similares foram obtidos para o híbrido 58 por Laurito-Friend (2013).

Figura 24 - Conversão enzimática de celulose e hemicelulose de bagaço de referência (RC) pré- tratado com sulfito alcalino e subsequentemente com o sistema oxidativo CMF. T1: sistema CMF (1mM Fe^{3+} , 0.15mM catecol; 50mM H_2O_2 ; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe^{3+} ; T4: controle sem lavagem alcalino.

(continua)

(Conclusão_Fig. 24)
 Fonte: Arquivo pessoal

Figura 25 - Conversão de celulose e xilana de clone 58, pré-tratado com sulfito alcalino (SA) e subsequentemente com sistema oxidativo CMF. T1: sistema CMF (1mM Fe^{3+} , 0.15mM catecol; 50mM H_2O_2 ; 0.35 % p/p Tween 80; 30 hrs reação; extração alcalina 0.1% NaOH); T2: controle sem Tween 80; T3: Controle sem Fe^{3+} ; T4: controle sem lavagem alcalino.

(continua)

(Conclusão_Fig. 25)

Fonte: Arquivo pessoal

Em todos os materiais submetidos ao tratamento CMF, foi adicionado uma etapa adicional de lavagem alcalina do material, com o objetivo de remover a lignina que poderia ter sido oxidada durante essa etapa. O tratamento CMF e CMF + extração alcalina proporcionaram um efeito positivo na eficiência de conversão dos polissacarídeos, principalmente na cana de referência que atingiu um valor de $87\% \pm 1.1$ e $88.4\% \pm 0.4$ para as conversões de celulose e xilana, respectivamente. Este efeito poderia ser atribuído à remoção não só de lignina, mas também de ácidos hidróxicinâmicos e hemicelulose, o que deve ter diminuído a recalcitrância do material de partida.

9 CONCLUSÕES - SISTEMAS OXIDATIVOS BASEADOS NA REAÇÃO DE FENTON

O tratamento CMF aplicado no bagaço de usina e no clone 58 produziu o mesmo nível de remoção de lignina que o tratamento com sulfito alcalino, 26% e 23% para bagaço de usina; e 13% e 12% para o clone 58, respectivamente. No entanto, o efeito do tratamento CMF no bagaço de referência foi considerável, atingindo uma remoção de 69%, sendo que a lignina removida pelo tratamento com sulfito alcalino atingiu 25,7%. Distintos resultados têm sido reportados até agora na literatura, por exemplo, (JUNG et al., 2015), aplicando a reação de Fenton sobre palha de arroz, atingiram uma remoção de lignina acima de 40%, o qual foi diferente ao valor de remoção de lignina obtido por Kato et al. (2014), que mostraram remoções desde 30% de lignina em *switchgrass* e palha de trigo até 15% em sabugo de milho.

É importante destacar que todos os trabalhos reportados na literatura até agora, tanto para a reação de Fenton tradicional como para a reação mediada por agentes quelantes (CMF), aplicam o íon Ferro solubilizado no sistema de reação. Este fato faz com que uma quantidade considerável de radicais seja produzida longe da parede celular, dificultando a interação com os componentes estruturais do material lignocelulósico, devido à baixa meia vida (nanossegundos) ou alta instabilidade dos radicais. Para evitar esta perda de potencial oxidativo, em nossos experimentos foi realizada uma etapa prévia de impregnação de íons Ferro na parede celular e posterior remoção do excesso deste metal desde o sistema de reação. Este fato pode conduzir a produção de íons diretamente sobre a parede celular o que aumenta a probabilidade de interação entre estes compostos (radical – parede celular), maximizando o potencial oxidativo da reação.

Como pode-se observar nas Tabelas 8 e 9, a lavagem alcalina aplicada após reação de CMF produziu um aumento na remoção de lignina em todos os materiais lignocelulósicos

usados neste trabalho. O interessante deste resultado é que corrobora nossa proposta inicial, de que as modificações oxidativas produzidas pelo sistema CMF na estrutura da lignina (HAMMEL et al., 2002) podem aumentar sua solubilidade num meio alcalino.

A diminuição na recalcitrância nos materiais lignocelulósicos pode se dever, principalmente à remoção de lignina, ou ácidos hidroxicinâmicos e hemicelulose resultantes dos tratamentos aplicados, o que acarretou, em nossos experimentos, em um aumento na conversão de celulose pela via enzimática.

É possível concluir que nas condições experimentais ensaiadas no presente trabalho, houve formação de radicais e espécies quimiluminescentes durante a reação CMF. A aplicação deste sistema oxidativo em distintas amostras de bagaço de cana (bagaço de usina, clone 58 e bagaço de referência), produziu alteração nos componentes estruturais da parede celular, diminuindo principalmente a lignina e a hemicelulose. Em todos os materiais lignocelulósicos empregados neste trabalho, a aplicação da reação CMF severa mais a extração alcalina produziu um ganho na hidrólise enzimática subsequente dos polissacarídeos estruturais, principalmente no bagaço de referência no qual, houve maior remoção de lignina e ácidos hidroxicinâmicos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, U. P.; RALPH, S. A. Determination of ethylenic residues in wood and TMP of spruce by FT-Raman spectroscopy. **Holzforschung**, v. 62, n. 6, p 667-675, 2008.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Key trends in CO2 emissions from fuel combustion**. 2015. p. 7-8. Disponível em: Acesso em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CO2EmissionsTrends.pdf>
- AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 1, p. 15–28, Jul. 2012.
- AGUIAR, A. et al. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623–628, jun. 2007.
- ALKASRAWI, M. et al. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 71–78, Jul. 2003.
- 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. 4851–61, Jul. 2010.
- ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 115–131, Mar. 1997.
- ARANTES, V. et al. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by a biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: implications for brown-rot decay. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 478–483, Jun. 2009.
- ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 541–55, Abr. 2011.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Degradation of cellulosic and hemicellulosic substrates using a chelator-mediated Fenton reaction. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 413–419, Mar. 2006.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, Mar. 2014.
- BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. 501–21, May 2008.
- BAO, W. et al. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by

fungal manganese peroxidase. **FEBS Letter**, v. 354, p. 297–300, 1994.

BARBOSA, M. H. P. et al. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: the brazilian experience in network research with RIDESA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. spe, p. 87–98, Dez. 2012.

BLANCHETTE, R. A. et al. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. **Wood Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 35–46, 1985.

BLANCHETTE, R. A. et al. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 203–213, Mar. 1997.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS letters**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 2 Jul. 1990.

BOX G., H. J. Y H. W. **BOX G., HUNTER J. y HUNTER W. Estadística para investigadores** Segunda Edición . 2008 .

BJÖRKLUND, J.; NILVEBRANT N-O. In: **Wood chemistry and wood biotechnology**. Ed(s). Ek M, Gellerstedt G and Henriksson G, Stockholm : KTH,. 2007. Book 1, p 317-356.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a “midway” strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 2, p. 119–126, Mar. 2012.

CAMARERO, S. et al. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1264–1271, Apr. 2007.

CARAMELO, L.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. A search for ligninolytic peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving alpha -Keto-gamma -Thiomethylbutyric Acid and lignin model Ddmers. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 916–922, Mar. 1999.

CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 193–198, Ago. 2008.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 415–431, 5 Sept. 2013.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 759–61, Jul. 2007.

CONTRERAS, D. et al. Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation. **Journal of biological**

inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, v. 12, n. 7, p. 1055–61, Sept. 2007.

CONTRERAS, D. et al. New insights in the dihydroxybenzenes-driven Fenton reaction: electrochemical study of interaction between dihydroxybenzenes and Fe(III). **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 64, n. 10, p. 2103–8, Jan. 2011a.

CONTRERAS, D. et al. Chemiluminescence of the Fenton reaction and a dihydroxybenzene-driven Fenton reaction. **Inorganica Chimica Acta**, v. 374, n. 1, p. 643–646, Ago. 2011b.

CUNHA, G. G. S. et al. Linoleic acid peroxidation and lignin degradation by enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood or in submerged liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 262–267, Mar. 2010.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, Oct. 2015.

DU, X. et al. Understanding pulp delignification by laccase-mediator systems through isolation and characterization of lignin-carbohydrate complexes. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 3073–80, Sept. 2013.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, Mar. 1956.

ELAOU, S. C. et al. Coumaric acid degradation by electro-Fenton process. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 667, p. 19–23, Feb. 2012.

ELGHARBAWY, A. A. et al. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 252–267, May 2016.

ENAMI, S.; SAKAMOTO, Y.; COLUSSI, A. J. Fenton chemistry at aqueous interfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 2, p. 623–8, 14 Jan. 2014.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, p. 899, Jan. 1894.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E. et al. Lignin-degrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16903–16, May 2012.

FERRAZ, A. 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, Sept. 2000.

FERRAZ, A. et al. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified “palo

podrido” wood samples. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 4, p. 203–208, Jan. 2001.

FERRAZ, ANDRÉ, COSTA H.F, THALES, SIQUEIRA GERMANO, M. M. F. A. Mapping of Cell Wall Components in Lignified Biomass as a Tool to Understand Recalcitrance. In: da Silva, S; Chandel, A (eds). **Biofuels in Brazil: Fundamental Aspects, Recent Developments and Future**. Springer International Publishing Switzerland. 2014. Cap 9, p 173-197.,

FILLEY, T. R. et al. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Chemistry**. v. 33, p. 111–124, 2002.

FU, C. et al. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3803–8, Mar. 2011.

GALLI, C.; GENTILI, P. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 973–977, Nov. 2004.

GELLERSTED, G. Chemistry of Bleaching of Chemical Pulp. In: Ek, M.; Gellerstedt, G.; and Henriksson Ed(s). **Pulping Chemistry and Technology**. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 10785 Berlin. 2009. v 2, cap 9, p 202-236.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 477–98, Jn. 2013.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. Are biofuels a feasible option? **Energy Policy**, v. 37, n. 1, p. 10–14, Jan. 2009.

GÓMEZ-TORIBIO, V. et al. Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 12, p. 3944–53, Jun. 2009.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology** 1, v. 53, p. 133–162, 1997.

GOODELL, B. et al. Iron-reducing capacity of low-molecular-weight compounds produced in wood by fungi. **Holzforschung**, v. 60, n. 6, p. 630–636, Jan. 2006.

GRABBER, J. H. et al. Chemical composition and cegradability of Xylem and Nonxylem walls isolated from Alfalfa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** p. 81–82, 1996.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2609–2614, Jul. 1998.

HAGE, J. P.; LLOBET, A.; SAWYER, D. T. Aromatic hydroxylation by fenton reagents

{Reactive intermediate[Lx+FeIII $\text{OOH}(\text{BH}^+)$], not free hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$)}. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1383–1388, Oct. 1995.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. VAN; FAAIJ, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, Apr. 2005.

HAMMEL, K. E. et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, p. 445–453, 2002.

HE, Y.-C. et al. Enhancement of enzymatic saccharification of corn stover with sequential Fenton pretreatment and dilute NaOH extraction. **Bioresource technology**, v. 193, p. 324–330, Oct. 2015.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5813, p. 804–7, Feb. 2007.

HISANO, H.; NANDAKUMAR, R.; WANG, Z.-Y. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 3, p. 306–313, May 2009.

HOFRICHTER, M. Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and microbial technology**, v. 30, p. 454–466, 2002.

HOFRICHTER, M.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4588–4593, 2001.

HORTA, M. A. et al. Linoleic acid peroxidation initiated by Fe^{3+} -reducing compounds recovered from *Eucalyptus grandis* biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 164–171, Jan. 2011.

HOWELL, C. et al. Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 414–419, Jun. 2009.

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, n. 7, p. 2575–81, Apr. 2007.

RODRIGUEZ J. et al. Dihydroxybenzenes: driven Fenton reactions. **Water Science Technology**, Sept. 2001.

JELLISON, J. et al. The Role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, n. 2, p. 165–179, 1997.

JEOH, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology progress**, v. 22, p. 270–7, Jan. 2006.

- JI, Y.; WHEELER, M. C.; VAN HEININGEN, A. Oxygen delignification kinetics: CSTR and batch reactor comparison. **AIChE Journal**, v. 53, n. 10, p. 2681–2687, Oct. 2007.
- JI, Z. et al. Visualization of *Miscanthus × giganteus* cell wall deconstruction subjected to dilute acid pretreatment for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 103, Jan. 2015.
- JOHNSON, G. R. A.; NAZHAT, N. B. Kinetics and mechanism of the reaction of the bis(1,10-phenanthroline)copper(I) ion with hydrogen peroxide in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 7, p. 1990–1994, Apr. 1987.
- JUNG, Y. H. et al. Mimicking the Fenton reaction-induced wood decay by fungi for pretreatment of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 467–472, Mar. 2015a.
- JUNG, Y. H. et al. Mimicking the Fenton reaction-induced wood decay by fungi for pretreatment of lignocellulose. **Bioresource technology**, v. 179, p. 467–72, Mar. 2015b.
- KALLIOINEN, A. et al. A novel alkaline oxidation pretreatment for spruce, birch and sugar cane bagasse. **Bioresource technology**, v. 140, p. 414–20, Jul. 2013.
- KAPICH, A. N.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Effect of phenolic acids on manganese peroxidase-dependent peroxidation of linoleic acid and degradation of a non-phenolic lignin model compound. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4, p. 350–358, Jan. 2007.
- KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letter**, v. 461, p. 115–119, 1999.
- KATO, D. M. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. **Bioresource technology**, v. 162, p. 273–8, Jun. 2014.
- KERSTEN, P. J.; KIRK, T. K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 5, p. 2195–201, May 1987.
- KIRK, T. K.; CULLEN, D. A. N. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Raymond A.; Akhtar, M. (eds). **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. John Wiley & Sons, Inc. Canada, 1998. Cap 9, p 273-300.
- KOENIG, A. B. et al. NMR Structural characterization of quercus alba (white oak) degraded by the brown rot fungus, *laetiporus sulphureus*. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 30, n. 1, p. 61–85, Fev. 2010.
- 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, Jan. 2008.
- KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS**

Letters, v. 169, n. 2, p. 247–250, Apr. 1984.

LACAYO, C. I. et al. Lignin depletion enhances the digestibility of cellulose in cultured xylem cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68266, Jan. 2013.

LAMERS, P. et al. Global solid biomass trade for energy by 2020: an assessment of potential import streams and supply costs to North-West Europe under different sustainability constraints. **GCB Bioenergy**, v. 7, n. 4, p. 618–634, Jul. 2015.

LASOVSKY, J. et al. Oxidation and chemiluminescence of catechol by hydrogen peroxide in the presence of Co(II) ions and CTAB micelles. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, v. 22, n. 5, p. 501–506

LAURITO-FRIEND, D. F. **Pré-tratamento sulfito alcalino e hidrólise enzimática de bagaços de cana- de-açúcar com diferentes composições químicas**. 2013 Dissertacao (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2013.

LAURITO-FRIEND, D. F. et al. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, Apr. 2015.

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. 1368–1376, 2009.

LUNDELL, T. et al. Formation and Action of Lignin-Modifying Enzymes in Cultures of *Phlebia radiata* Supplemented with Veratric Acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2623–9, Sept. 1990.

MAHARAJ, D. S.; LIMSON, J. L.; DAYA, S. 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation. **Life sciences**, v. 72, n. 12, p. 1367–75, 7 Feb. 2003.

MANSFIELD, S.; MOONEY, C.; SADDLER, J. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 5, p. 804–816, Oct. 1999.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195–204, Sept. 2005.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 348–57, Jun. 2009.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, Jan. 2011.

MASARIN, F. et al. Manganese peroxidase and biomimetic systems applied to in vitro lignin degradation in *Eucalyptus grandis* milled wood and kraft pulps. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Jun. 2015.

MASCHEK, D. et al. A new approach for the study of the chemical composition of bordered pit membranes: 4Pi and confocal laser scanning microscopy. **American journal of botany**, v. 100, n. 9, p. 1751–6, Sept. 2013.

MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Ibeta. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 1, p. 138–52, Jan. 2006.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–65, Jul. 2002.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37–46, May 2002.

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. 890–5, Jan. 2013.

MENDES, F. M. et al. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 60–67, Jul. 2015.

MENDONÇA, R. et al. Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 584–589, 6 Jun. 2004.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and biosystems engineering**, Dez. 2015.

MOREIRA, M. T. et al. Oxidation of lignin in eucalyptus kraft pulp by manganese peroxidase from *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **Bioresource technology**, v. 78, n. 1, p. 71–9, May 2001.

NANDA, S.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion. **Energy Science & Engineering**, v. 2, n. 3, p. 138–148, Ago. 2014.

NILSSON T. Biological wood degradation. In: Ek, M; Gellerstedt, G.; Henriksson, G. (eds). *Pulp Chemistry and wood Technology*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 10785 Berlin, 2009 v.1 Cap 10. p.219-244.

NGUYEN, D. M. T.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W. O. S. Degradation of hydroxycinnamic acid mixtures in aqueous sucrose solutions by the Fenton process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1582–92, Feb. 2015.

NWAKAIRE, J. N.; EZEOKA, S. L.; UGWUISHIWU, B. O. **Production of cellulosic**

ethanol from wood sawdust **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, Sept. 2013.

PATAI, S.; RAPPOPORT, Z. (EDS.). **The Quinonoid Compounds**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., 1988. v. 1

PIGNATELLO, J. J. Role of quinone intermediates as electron shuttles in fenton and photoassisted fenton oxidations of aromatic compounds. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 8, p. 2399–2406, 1997.

PU, Y. et al. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 15, 28 Jan. 2013.

PU, Y.; HALLAC, B.; RAGAUSKAS, A. J. Plant biomass characterization : application of solution- and solid-state nmr spectroscopy. In: Wyman, C. (ed). **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. cap 18. p 369-390, 2013.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 37–48, Mar. 1992.

RENEWABLE FUEL ASSOCIATION. Industry statistics, 2015. disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1456770302650-ba1c280f-bad8>

RODRÍGUEZ, J. et al. Dihydroxybenzenes: driven Fenton reactions. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 44, n. 5, p. 251–6, Jan. 2001.

RUIZ-DUEÑAS, F. J. et al. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. **Biochemical Society transactions**, v. 29, n. Pt 2, p. 116–22, May 2001.

RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 78, n. 4, p. 614–49, Dez. 2014.

RYTIOJA, J. et al. Saccharification of Lignocelluloses by carbohydrate active enzymes of the white rot fungus *dichomitus squalens*. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145166, Jan. 2015.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–91, maio 2003.

SAKDARONNARONG, C.; JONGLERTJUNYA, W. Rice straw and sugarcane bagasse degradation mimicking lignocellulose decay in nature: an alternative approach to biorefinery. **ScienceAsia**, v. 38, n. 4, p. 364, 2012a.

SALVACHÚA, D. et al. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 16, p. 7500–6, Ago. 2011.

SATHITSUKSANO, N. et al. Overcoming biomass recalcitrance by combining genetically modified switchgrass and cellulose solvent-based lignocellulose pretreatment. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73523, Jan. 2013.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J. A.; WANG, M. Q. The energy balance of corn ethanol: an update. **Agricultural Economics Reports**, 2002.

SHEN, X. et al. Formation of the excited ferryl species following Fenton reaction. **Free radical biology & medicine**, v. 13, n. 5, p. 585–92, Nov. 1992.

SILVERSTEIN, R. A. et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3000–3011, Nov. 2007.

SIMS, R.; SAYIGH, A. **Bioenergy options for a cleaner environment**. New York: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044351-5

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, FEB. 2013.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clinic proceedings**, v. 63, n. 4, p. 381–9, Apr. 1988.

SPITELLER, G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. **Free radical biology & medicine**, v. 41, n. 3, p. 362–87, Ago. 2006.

SREBOTNIK, E.; BOISSON, J.-N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 785–789, Apr. 2005.

TILAY, A. et al. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7644–8, Sept. 2008.

TOHKA, A. et al. Finland's long-term climate and energy strategy– emission projections. 2010. Dispinível
em:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/TaskForce/tfiam/35/tfiam35_Tohka_NationalFinland.pdf

TSAI, C. S. Dynamic biochemistry: enzyme kinetics. 2002. In: Tsai, S.C. (ed). **An Introduction to Computational Biochemistry**. Wiley-Liss, Inc. New Jersey. cap 7, p 123-144.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, Jan. 2007.

- VÁRNAI, A. et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 153, Jan. 2014.
- VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, 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, Mar. 2010.
- VICENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 645–652, Mar. 2007.
- WALLING, C. Intermediates in the reactions of fenton type reagents. **Accounts of Chemical Research**, v. 31, n. 4, p. 155–157, Apr. 1998.
- WATANABE, T. et al. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 13, p. 4222–31, Jul. 2000.
- WILLFÖR, S. et al. Polysaccharides in some industrially important softwood species. **Wood Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 245–257, Mar. 2005a.
- WILLFÖR, S. et al. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. **Wood Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 601–617, Oct. 2005b.
- XIE, Y. et al. Degradation of wood veneers by Fenton's reagents: Effects of wood constituents and low molecular weight phenolic compounds on hydrogen peroxide decomposition and wood tensile strength loss. **Holzforschung**, v. 64, p. 375–383, 2010.
- XU, G.; GOODELL, B. Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 43–57, Apr. 2001.
- XU, H. et al. Recombinant manganese peroxidase (rMnP) from *Pichia pastoris* . Part 2 : Application in TCF and ECF bleaching. **Holzforschung**, v. 64, p. 145–151, 2010.
- YELLE, D. J. et al. Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in wood decayed by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1091–100, Apr. 2011.
- ZENG, J. et al. Effects of lignin modification on wheat straw cell wall deconstruction by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 161, Jan. 2014.
- 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, Apr. 2009.

APENDICE A

(Referente ao item 8.5) Cinéticas de hidrólise enzimáticas de Glucana e Xilana de materiais lignocelulósicos pré-tratados com sulfito alcalino e oxigênio em meio alcalino, com presença ou não, de ácidos graxos saturados.

Tabela A.1. Descrição dos tratamentos

Amostras de bagaço de cana	Na ₂ SO ₃ (g/100 g de bagaço)	NaOH (g/100 g de bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço)	Presão O ₂ (Bar) Cte.	Alcali Ativo (g/100 g de Bagaço)	Tween 80 (g/g bagaço)	Ac Linoleico (g/g bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço)
Bagaço industrial								
Não tratado	0	0	100	-	-	-	-	-
Tratamento A	0	0	100	6	4	0	0	92,6
Tratamento B	5	2,5	83,2	0	0	0	0	100
Tratamento C	5	2,5	83,2	6	4	0	0	77,4
Tratamento D	5	2,5	83,2	6	4	0,7	0	82,5
Tratamento E	5	2,5	83,2	6	4	0,35	0	88,3
Tratamento F	5	2,5	83,2	6	4	0,035	0	81,9
Tratamento G	5	2,5	83,2	6	4	0	0,7	86,1
Tratamento H	5	2,5	83,2	6	4	0	0,35	82,4
Tratamento I	5	2,5	83,2	6	4	0	0,035	86,4
Tratamento J	5	2,5	83,2	0	4	0,035	0	86,6
Clone 58								
natura	0	0	100	-	-	-	-	-
Tratamento K	0	0	100	6	4	0,035	0	88,0
Tratamento L	5	2,5	83,2	6	4	0,035	0	87,2
Tratamento M	5	2,5	87,8	0	0	0	0	100

Figura A.2. Conversão de Glucana

Figura A.3 Conversão de Xilana