



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

MARIA AUGUSTA DE CARVALHO SILVELLO

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E CO₂ SUPERCRÍTICO NA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES**

CAMPINAS

2018

MARIA AUGUSTA DE CARVALHO SILVELLO

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E CO₂ SUPERCRÍTICO NA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: **Prof. Dra. ROSANA GOLDBECK**

Coorientador: **Prof. Dr. JULIAN MARTÍNEZ**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA
AUGUSTA DE CARVALHO SILVELLO E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ROSANA GOLDBECK.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano – CRB 8/5816

Silvello, Maria Augusta de Carvalho, 1992-

Si39i Influência da aplicação de ultrassom e CO₂ supercrítico na atividade enzimática de celulasas / Maria Augusta de Carvalho Silvello. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Rosana Goldbeck.

Coorientador: Julian Martínez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Celulasas. 2. Dióxido de Carbono supercrítico. 3. Hidrólise enzimática. 4. Ultrassom. I. Goldbeck, Rosana. II. Martínez, Julian. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of ultrasound and supercritical CO₂ treatment on cellulases activities

Palavras-chave em inglês:

Cellulases

Enzymatic hydrolysis

Supercritical CO₂

Ultrasound

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Rosana Goldbeck [Orientador]

Helen Treichel

Ruann Janser Soares de Castro

Data de defesa: 26-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosana Goldbeck (FEA/UNICAMP) – Orientadora

Profa. Dra. Helen Treichel (UFFS/RS) – Membro Titular

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro – (FEA/UNICAMP) – Membro Titular

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e por sempre conduzir meus passos.

À UNICAMP, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e aos funcionários, pela oportunidade de aprendizado e de desenvolvimento profissional.

À Prof. Dra. Rosana Goldbeck pelo apoio, pelo incondicional incentivo, pela disponibilidade em ensinar e paciência ao ouvir, pelo prazer que tenho em trabalhar ao teu lado e aprender contigo. Por seres mais que orientadora, muito obrigada pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Julian Martínez pela confiança e orientação ao longo de todo trabalho.

À Banca examinadora – Helen, Ruann, Marcus e Eliana - pelas contribuições, disposição e prontidão em serem mestres. Muito obrigada pelas considerações.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos: A Família LEMeB. A todos esses pesquisadores que tornam meus dias mais alegres e produtivos: OBRIGADA pela oportunidade de aprender todos os dias com cada um de vocês (Andreas, Dani, Bia, Pati, Pri, Carla, Alberto). Em especial agradeço aos grandes amigos que ganhei fazendo pesquisa: Yara, Pamela, Suéllen, Felipe, Zé, Gleí, Wesley, Luciano. Para vocês eu poderia tentar escrever um agradecimento especial, mas ainda seria menos do que vocês merecem ouvir. Simplifico aqui com o meu mais sincero: obrigada por serem presentes na minha vida.

Ao Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (em especial, Phillipe, Arthur, Juliane) pela paciência e disposição em ensinar. Muito obrigada pelo apoio.

Às pessoas que durante essa caminhada foram essenciais para a realização do trabalho. Obrigado Cristiane, Juliana (LGE), Marcus, Luciano por tudo que me ensinaram e por terem feito com tanto carinho. Gleí, muito obrigada pelo conhecimento transmitido e construído.

Agradeço às minhas famílias e aos meus eternos amigos do RS. Muito obrigada mãe Loíse pela união que temos, pelo amor que compartilhamos e pela relação que construímos. És minha base. Obrigada João, por seres o melhor irmão do mundo, por tentar me mostrar o mundo com outros olhos e por acreditares em mim. Obrigada pai Sandro, por sempre me incentivar a seguir esse caminho. Agradeço todos os dias pela família que me mantém – Eva, Sérgio, Vivaldino, Vanusa, Leila, René, Stevan, Lenara, Ricardo e meus afilhados Lorenzo,

Artur e Tomás, mas agradeço principalmente à mulher que nos uniu – Vó Alice - que insistiu em fazer morada no céu antes de ver mais esse sonho meu alcançado, saibas que tua força, luz, orações e, principalmente, teu amor me fizeram chegar até aqui.

À minha família, eterna república de Campinas – Tami, Gabi, Tisci, Karol - agradeço pela convivência que tivemos, que tanto me ensinou, e pelo apoio nos momentos difíceis. E às minhas princesas Sara e Nayara, obrigada por sempre estarem presentes em todas as horas, por ouvirem meus sonhos e desabafos, e pela irmandade que construímos. Muito obrigada, gurias!

À Família Viracopos por terem sido os primeiros a me acolher e nunca desistirem de mim.

Aos meus fiéis escudeiros Jorge e Felipe, pela compreensão, pela amizade, pelo apoio e admiração mútuos entre nós. Agradeço por ter encontrado vocês no meio do caminho, pois ele se tornou muito mais leve e agradável com a presença de vocês. Aos colegas da FEA, que além dos sorrisos pelos corredores compartilharam comigo carinho, amizade e conhecimento.

À Família de Rio Grande - Carol, Rafa e Igor: por serem os melhores amigos que eu poderia ter escolhido, pela amizade que não muda, pelo apoio que trocamos para que todos concluíssem mais essa etapa com méritos. Às minhas eternas professoras Jaqueline e Larine, por serem minhas mestras e exemplos, sem vocês eu não teria chegado até aqui

A todos vocês meus amigos, citados ou não, tenho uma imensa satisfação em ter vocês em minha vida.

RESUMO

As celulasas são importantes enzimas empregadas na produção de bioetanol de segunda geração (2G), atuando na biomassa lignocelulósica e promovendo sua hidrólise. O incremento da atividade catalítica das celulasas tem particular interesse para a indústria do bioetanol, de modo que o aumento da eficiência de hidrólise contribui para a redução dos custos associados à via enzimática. A aplicação de ultrassom bem como a utilização de fluidos supercríticos como meio reacional enzimático tem sido métodos empregados para incrementar a atividades enzimáticas através das mudanças conformacionais aportadas. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da aplicação dos processos de ultrassom e tratamento com CO₂ supercrítico na atividade enzimática de celulasas comerciais Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 (Novozymes®). Nesse estudo a influência do tratamento com ultrassom foi avaliada nas celulasas comerciais utilizando a técnica de planejamento experimental para determinar os efeitos do tempo de aplicação (10 a 330 s), intensidade da sonda ultrassônica (160 a 350 W) e temperatura do meio (25 a 50°C). Após o planejamento experimental as condições foram validadas e a estabilidade das atividades enzimáticas foi avaliada. O efeito do CO₂ supercrítico (SC-CO₂) também foi avaliado para ambas as celulasas comerciais por meio de planejamento experimental nas condições de tempo de 60 a 180 min, pressão de 100 a 300 bar e temperatura de 40 a 60°C. As mesmas condições do planejamento experimental aplicadas para as enzimas comerciais foram empregadas para o estudo da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (2% m.v⁻¹) com atividade enzimática inicial ajustada para 10 FPU.g_{celulose}⁻¹ para ambas as enzimas frente aos dois tratamentos (ultrassom e SC-CO₂). Os resultados de atividades enzimáticas foram analisados utilizando o *software* Protimiza Experimental Design. Para os tratamentos sob sonicação, as condições mais adequadas de aplicação na enzima Celluclast 1,5L foram: tempo de 170 s, intensidade da sonda de 240 W e temperatura de 30°C. A hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foi incrementada com a aplicação de ultrassom para ambas as enzimas. Quando aplicadas as condições validadas para a hidrólise com a enzima Celluclast 1,5L (200W, 25°C, 330s), concentrações 89% superiores ao controle de açúcares redutores foram alcançadas. Já para o tratamento com SC-CO₂, a Celluclast na temperatura do meio reacional de 40°C, pressão de 300 bar e tempo de aplicação de 180 min resultou em aumento de 14,31% para atividade enzimática de celulasas totais (FPase). No entanto, quando empregado o coquetel Cellic CTec2, um pequeno incremento (3,60%) na atividade enzimática de CMCCase foi observado na condição de 60 min, 300 bar e 40°C. Em geral, a temperatura de 60°C teve efeito negativo tanto no tratamento supercrítico nas enzimas livres quanto na hidrólise enzimática. O tratamento com SC-CO₂ incrementou a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em 73,6% e 32,5% na concentração de açúcares redutores para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2, respectivamente. O tratamento com ultrassom e CO₂ supercrítico, em condições otimizadas, levou ao aumento da atividade catalítica de celulasas e do grau de hidrólise de substrato lignocelulósico, demonstrando assim potencial aplicação para o aprimoramento de coquetéis enzimáticos.

Palavras-chave: celulasas, CO₂ supercrítico, hidrólise enzimática, ultrassom.

ABSTRACT

Cellulases are important enzymes employed in second-generation bioethanol (2G) production, by acting on lignocellulosic biomass and promoting its hydrolysis. The improvement of cellulases enzymatic activities is interesting to the bioethanol industry, such that increasing the hydrolysis efficiency contributes to the reduction of cost associated with the enzymatic step. The application of ultrasonic energy technology as well as the use of supercritical fluids as an enzymatic reaction medium have received great attention to increase the catalytic activity of enzymes through conformational changes. The aim of this study was to evaluate the effect of ultrasound and supercritical CO₂ (SC-CO₂) treatment on the cellulase enzymatic activity from commercial cellulases Celluclast 1,5L and Cellic CTec2 (Novozymes®). In this work, the influence of ultrasonic treatment was investigated through an experimental design aiming to identify the optimal application time (10s to 330s), the ultrasonic probe intensity (160W to 350W) and temperature (25° to 50°C) of the process. After the ultrasound application were determined the enzymatic activities (endoglucanase, total cellulase and β-glucosidase) and the stability of the enzymes were evaluated after 48h. The supercritical CO₂ effect was evaluated to both commercial cellulases through an experimental design (CCD). The range of temperature evaluated was 40°C to 60°C, pressure 100 to 300 bar, and time 60 to 180 min. The same conditions applied to the commercial enzymes were used to the sugarcane bagasse (2% w.v⁻¹) hydrolysis at a 10 FPU.g_{cellulose}⁻¹ loading for both treatments (ultrasound and SC-CO₂). The results were analyzed using the software Protimiza Experimental Design. For the experiments under ultrasonic application, validated condition for Celluclast enzyme were time of 170s, intensity of 240 W and temperature of 30°C. The sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis was increased under sonication for both enzymes. When the validated conditions were applied on the enzymatic hydrolysis with Celluclast 1,5L (200W, 25°C, 330s), 89% higher concentrations than the control of reducing sugars were achieved. For the SC-CO₂ treatment, Celluclast 1,5L under conditions of 40°C temperature, 300 bar of pressure and time of 180 min resulted in 14,32% increased total cellulase enzymatic activity (FPase). For the enzymatic cocktail Cellic CTec2 a slight improve (3,60%) was detected to CMCase activity at 40°C, 300 bar and 60 min. In general, the temperature of 60°C has a negative effect on both enzymatic activity and release of reducing sugars. The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with SC-CO₂ treatment was increased 73,63% and 32,49% in reducing sugars concentrations for Celluclast 1,5L and Cellic CTec2, respectively. The treatments with ultrasound and supercritical fluid, under optimal conditions, led to favorable results of increase of Cellulase Catalytic activity and increased the sugarcane bagasse hydrolysis, showing great potential to application on improvement of enzymatic cocktails to be applied on bioethanol production.

Keywords: cellulases, enzymatic hydrolysis, supercritical CO₂, ultrasound.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1-1. Representação da cadeia linear da celulose.	24
Figura 1-2. Principais etapas do processo de produção do etanol lignocelulósico.....	26
Figura 1-3. Estrutura molecular da celulose e sítios de ação das enzimas do complexo celulase	33
Figura 1-4. Diagrama de Fases.	42

CAPÍTULO 2

Figura 2-1. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade enzimática de endoglucanases (CMCase) da enzima Celluclast 1,5L em função da Intensidade e Temperatura de aplicação do ultrassom.....	62
Figura 2-2. Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática de β -glicosidase de Celluclast 1,5L em função de (a) Tempo e intensidade (b) Tempo e temperatura (c) Intensidade e Temperatura de aplicação do ultrassom.....	68
Figura 2-3. Testes de estabilidade dos ensaios de Celluclast 1,5L submetidos a tratamento com ultrassom.....	69
Figura 2-4. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de açúcares redutores liberados pela enzima Celluclast 1,5L em função de (a) Tempo e temperatura (b) Intensidade e Temperatura (c) Tempo e intensidade de aplicação do ultrassom	78

CAPÍTULO 3

Figura 3-1. Esquema da unidade de reações químicas em meio supercrítico	88
Figura 3-2. Curva de contorno do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função do tempo e da temperatura para tratamento do SC-CO ₂ para Celluclast 1,5L.	95
Figura 3-3. Curva de contorno do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função do tempo e da temperatura para tratamento do SC-CO ₂ para Celluclast 1,5L.	95
Figura 3-4. Superfícies de resposta do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função de (a) Tempo e temperatura (b) Tempo e pressão (c) Pressão e Temperatura de tratamento do SC-CO ₂ para Cellic CTec2.....	98

Figura 3-5. Curvas de contorno para as respostas de FPase em função de (a) Temperatura e Pressão, (b) Tempo e Temperatura e (c) Pressão e Tempo para os tratamentos de SC-CO ₂ para Cellic CTec2.....	100
Figura 3-6. Concentração de açúcares redutores em função da (a) temperatura e pressão e (b) pressão e tempo para Celluclast 1,5L sob tratamento com SC-CO ₂	103
Figura 3-7. Concentração de açúcares redutores em função da (a) temperatura e tempo e (b) pressão e temperatura para Cellic CTec2 sob tratamento com SC-CO ₂	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2-1. Matriz do planejamento experimental DCCR para otimização das atividades enzimáticas das celulases comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) separadamente.	55
Tabela 2-2. Resultados das atividades relativas (%) dos planejamentos experimentais quando empregado tratamento com ultrassom nas enzimas comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec 2).....	60
Tabela 2-3. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de endoglucanase (CMCase) para ambos os planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2). ...	61
Tabela 2-4. Análise de variância da endoglucanase (CMCase) com enzima Celluclast 1,5L do DCCR.	61
Tabela 2-5. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de celulases totais (FPase) para ambos planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).....	64
Tabela 2-6. Análise de variância de celulases totais (FPase) para DCCR com enzima Celluclast 1,5L.....	64
Tabela 2-7. Análise de variância de celulases totais (FPase) para DCCR com enzima Cellic CTec2.	65
Tabela 2-8. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de β -glicosidase para ambos os planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).	66
Tabela 2-9. Análise de variância de β -glicosidase para o DCCR empregando a enzima Celluclast 1,5L.....	66
Tabela 2-10. Análise de variância de β -glicosidase para o DCCR empregando a enzima Cellic CTec2.	67
Tabela 2-11. Condições de validação para as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2.	70
Tabela 2-12. Resultados para atividades enzimáticas relativas nas condições de validação dos modelos experimentais para a enzima Celluclast 1,5L.....	71
Tabela 2-13. Resultados para atividades enzimáticas relativas nas condições de validação dos modelos experimentais para a enzima Cellic CTec2.....	72
Tabela 2-14. Composição centesimal do bagaço de cana-de-açúcar.....	74
Tabela 2-15. Resultados experimentais para ambos planejamentos experimentais empregando as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 e bagaço de cana-de-açúcar	75

Tabela 2-16. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para as respostas de açúcares redutores para ambos planejamentos experimentais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).....	76
Tabela 2-17. Condições de validação para hidrólise enzimática de bagaço com Celluclast 1,5L	77

CAPÍTULO 3

Tabela 3-1. Resultados dos planejamentos experimentais para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 com tratamento com SC-CO ₂	93
Tabela 3-2. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para respostas do planejamento experimental de Celluclast 1,5L com SC-CO ₂	94
Tabela 3-3. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para respostas do planejamento experimental de Cellic CTec2 com SC-CO ₂	97
Tabela 3-4. Resultados experimentais para ambos planejamentos DCC com as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 e bagaço de cana-de-açúcar.....	101
Tabela 3-5. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para a concentração de açúcares redutores de ambos planejamentos experimentais (Celluclast e Cellic CTec2) quando empregado SC-CO ₂	102

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1 - Apresentação do Trabalho e Revisão Bibliográfica	15
1.1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.2	OBJETIVOS	19
1.2.1	Objetivo Geral	19
1.2.2	Objetivos Específicos	19
1.3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.3.1	Produção de Bioetanol.....	20
1.3.2	Biomassa Lignocelulósica	22
1.3.2.1	Bioconversão da Biomassa Lignocelulósica a Bioetanol	25
1.3.2.2	Pré-Tratamento	27
1.3.2.3	Hidrólise Enzimática.....	28
1.3.2.4	Fermentação.....	30
1.3.3	Celulases.....	31
1.3.3.1	Estrutura e Biologia Molecular das Celulases	33
1.3.3.2	Micro-organismos Produtores de Celulases	35
1.3.3.3	Produção e Aplicação	36
1.3.4	Estratégias para o Aumento da Atividade Enzimática	36
1.3.4.1	Ultrassom.....	38
1.3.4.2	Fluidos Supercríticos	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
2.	CAPÍTULO 2 - Influência da Aplicação de Ultrassom na Atividade Enzimática de Celulases Comerciais e na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar	51
2.1	INTRODUÇÃO.....	53
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
2.2.1	Aplicação de Ultrassom em Enzimas Comerciais e Avaliação da Estabilidade das Enzimas	54
2.2.2	Influência do Tratamento na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar sob Tratamento com Ultrassom.....	55
2.2.3	Determinações Analíticas	56
2.2.3.1	Determinação da Atividade Enzimática da Endoglucanase (CMCase).....	56
2.2.3.2	Determinação da Atividade de Celulases Totais (FPase)	57
2.2.3.3	Determinação da Atividade Enzimática da β -glicosidase.....	57
2.2.3.4	Determinação de Açúcares Redutores	57
2.2.3.5	Determinação do Conteúdo de Proteínas.....	58
2.2.3.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	58

2.2.4	Análise Estatística	58
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
2.3.1	Efeito do Ultrassom sobre a Atividade Enzimática de Celulases Comerciais ...	59
2.3.1.1	Efeito sobre a Atividade de Endoglucanase (CMCase).....	59
2.3.1.2	Efeito sobre a Atividade de Celulases Totais (FPase)	63
2.3.1.3	Efeito sobre a atividade de β -glicosidase.....	65
2.3.2	Efeito da Aplicação de Ultrassom sobre a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar.....	74
2.4	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
3.	CAPÍTULO 3 - Influência do Tratamento com Dióxido de Carbono Supercrítico na Atividade Enzimática de Celulases Comerciais e na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar.....	84
3.1	INTRODUÇÃO	86
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	87
3.2.1	Aplicação de Dióxido de Carbono Supercrítico em Enzimas Comerciais	87
3.2.2	Influência do Tratamento na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar sob Tratamento com CO ₂ Supercrítico.....	89
3.2.3	Determinações Analíticas	90
3.2.3.1	Determinação da Atividade Enzimática da Endoglucanase (CMCase).....	90
3.2.3.2	Determinação da Atividade de Celulases Totais (FPase)	90
3.2.3.3	Determinação da Atividade Enzimática da β -glucosidase.....	90
3.2.3.4	Determinação de Açúcares Redutores	91
3.2.3.5	Determinação do Conteúdo de Proteínas.....	91
3.2.3.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	91
3.2.4	Análise Estatística	92
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.3.1	Tratamento Com Fluido Supercrítico em Celulase Comercial e Coquetel Enzimático.....	92
3.3.2	Efeito do Tratamento com CO ₂ Supercrítico sobre a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar	100
3.4	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
4.	CAPÍTULO 4 -Discussão Geral.....	109
5.	CAPÍTULO 5 - Conclusões Gerais	112
6.	CAPÍTULO 6 - Referências Bibliográficas	115

1. CAPÍTULO 1

Apresentação do Trabalho e Revisão Bibliográfica

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A necessidade da implementação de combustíveis renováveis está relacionada aos inconvenientes apresentados pelo uso indiscriminado de combustíveis fósseis, tais como: a extensa emissão de gases de efeito estufa e consequente aquecimento global, além do aumento nos preços e flutuações inesperadas (BALAT, 2011; HAGHIGHI MOOD et al., 2013). Além da busca por novas fontes de energia renováveis, cerca de dois terços do consumo mundial de energia provêm de combustíveis líquidos, o que demonstra a necessidade latente de alternativas aos derivados do petróleo (MOHANTY; ABDULLAHI, 2016). Biocombustíveis são as opções mais discutidas e estabelecidas como alternativas promissoras para retirada de carbono – principalmente redução da emissão de monóxido e dióxido de carbono - no setor de transportes e tecnologias significativas devem surgir como resposta à demanda mundial por esses combustíveis *low-carbon* (VALDIVIA et al., 2016; AZHAR et al., 2017; LYND et al., 2017; ZABED et al., 2017)

Os biocombustíveis surgiram como grande promessa para essa substituição, em especial o bioetanol. A produção de etanol de primeira geração (1G) utiliza amido e açúcares derivados do milho e cana-de-açúcar como matéria-prima, respectivamente, enquanto que o etanol de segunda geração (2G) que emprega materiais lignocelulósicos abundantes, de baixo custo e renováveis (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; ÁLVAREZ; REYES-SOSA; DÍEZ, 2016; ROCHA-MARTÍN et al., 2017). O uso de biocombustíveis obtidos a partir de biomassa contribui à mitigação das emissões de gases de efeito estufa, provendo uma fonte de energia sustentável (BALAT, 2011). Embora o preço de aquisição de matérias-primas celulósicas seja competitivo com o petróleo em base energética, o custo da conversão da lignocelulose a etanol utilizando a tecnologia atual ainda é alto (LYND et al., 2017). O etanol proveniente de substratos lignocelulósico também pode fazer importantes contribuições ao desenvolvimento econômico rural e crescente sustentabilidade de áreas agriculturáveis (LYND et al., 2017).

Os materiais lignocelulósicos, incluindo bagaço e palha de cana-de-açúcar, são compostos principalmente por celulose (30 a 60%), hemicelulose (20 a 40%) e lignina (15 a 25%) e surgem como uma rota efetiva para reaproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de etanol 2G (BALAT, 2011; MOHANTY; ABDULLAHI, 2016). Para o aproveitamento máximo da biomassa e conversão total da biomassa em etanol ou outros produtos de biorrefinaria, há uma etapa crítica, que é a hidrólise da celulose presente no material lignocelulósico a monômeros de açúcares fermentescíveis (SANTOS et al., 2016).

A hidrólise enzimática é uma etapa desafiadora para a comercialização do bioetanol 2G e representa uma parte importante do custo operacional junto com a aquisição e pré-tratamento da biomassa (VALDIVIA et al., 2016). Mesmo a rota enzimática de sacarificação representando cerca de 20% do custo total do processo de produção, o que dificulta sua competitividade econômica, esta etapa apresenta um potencial para diminuição dos custos (WANG et al., 2012). Uma redução no custo de produção das enzimas, assim como melhoria da performance e aumento no rendimento de açúcares é vital para o ganho em produtividade do processo (WANG et al., 2012). É necessário maior aperfeiçoamento na eficiência dos coquetéis enzimáticos de modo a reduzir os custos relacionados à produção e incrementar os rendimentos de hidrólise (ROCHA-MARTÍN et al., 2017).

As enzimas que catalisam o processo de hidrólise da celulose são as celulasas (endo-1,4- β -D-glucanase), que são um grupo de enzimas produzidas por fungos, bactérias e protozoários (SUBHEDAR; GOGATE, 2014). A demanda por celulasas está sempre em ascensão devido às suas diversas aplicações, e considerando sua importância econômica é essencial que se encontre um método efetivo para incrementar a atividade dessa enzima. Por exemplo, se seguida a meta do setor energético de produção de etanol lignocelulósico, o mercado projetado para as celulasas no ano de 2030 é de, aproximadamente, 9 bilhões de dólares, sendo o maior mercado de enzimas industriais quando comparado a todas as outras enzimas utilizadas somadas (cerca de 2 bilhões de dólares) (ZHANG; ZHANG, 2013).

As estratégias exploradas para tornar a produção do bioetanol mais competitiva incluem: *screening* de micro-organismos para encontrar novas enzimas celulolíticas com melhor performance, avanços nas tecnologias de pré-tratamento e reutilização de enzimas (KUHAD et al., 2016); aumento da produtividade comercial da celulase, produção de enzimas utilizando substratos mais baratos, preparações enzimáticas mais estáveis e com maior atividade específica – por meio de estudos de evolução dirigida e engenharia de proteínas das enzimas (WANG et al., 2012).

Dessa forma, a utilização de métodos que modifiquem o perfil catalítico de enzimas representa uma oportunidade de desenvolvimento e aprimoramento de coquetéis enzimáticos. Dentre as estratégias atuais pode-se citar a aplicação de ultrassom e fluidos supercríticos. O ultrassom é um som emitido acima da frequência que audição humana é capaz de perceber, é uma energia vibracional não radiante e a aplicação de ultrassom de alta intensidade e baixa frequência em líquidos gera o fenômeno da cavitação (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; HUANG et al., 2017). Atualmente, o ultrassom tem se tornando uma tecnologia emergente amplamente empregada na

área de alimentos, porém não se restringindo a ela. A recente aplicação da tecnologia de ultrassom no campo enzimático tem chamado atenção, uma vez que a nível molecular, o ultrassom é capaz de causar efeitos benéficos ou prejudiciais às enzimas, substratos e reações pelo incremento da taxa de transferência de massa (PRAJAPAT; SUBHEDAR; GOGATE, 2016; HUANG et al., 2017). Sob condições de intensidades e frequências adequadas, os tratamentos com ultrassom podem resultar em mudanças desejáveis às enzimas, levando a um aumento na atividade e estabilidade das mesmas, causando também mudanças conformacionais, acelerando o contato entre enzima e substrato e alterando as características dos substratos, provendo assim um ambiente ótimo para as reações (NGUYEN; LE, 2013; SUBHEDAR; GOGATE, 2014; HUANG et al., 2017).

Da mesma maneira, a utilização de fluidos supercríticos é uma técnica moderna e vantajosa para a condução de um grande número de reações catalisadas por enzimas. O dióxido de carbono (CO₂) é o fluido supercrítico mais empregado, uma vez que é considerado um solvente atrativo não-aquoso, natural, renovável, não-tóxico, não-inflamável e facilmente recuperável (SENYAY-ONCEL; YESIL-CELIKTAS, 2015; WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010). O fluido dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) – meio hidrofóbico e tecnologia *green* - tem chamado atenção como alternativa aos solventes aquosos e orgânicos utilizados na indústria devido às suas propriedades, das quais pode-se destacar: a conferência de altas taxas de difusão, menor probabilidade de reações paralelas e diminuição da limitação da transferência de massa. Conseqüentemente, o estudo da atividade e estabilidade das enzimas nesse meio reacional é importante para que se desenvolvam novos processos biocatalíticos (PENG et al., 2016)

O alto custo relacionado às enzimas se deve ao consumo de energia requerido para agitação aliado ao custo do coquetel enzimático requerido para degradar os materiais lignocelulósicos. A relação entre agitação, mistura e rendimentos tem sido estudada e o efeito adverso da alto conteúdo de sólidos na transferência de massa foi reportado (PALMQVIST; WIMAN; LIDÉN, 2011). Ambos os tratamentos – ultrassom e dióxido de carbono supercrítico – podem incrementar a transferência de massa das reações biocatalisadas.

Tendo em vista as problemáticas encontradas atualmente para produção de etanol 2G, avaliou-se nessa pesquisa o estudo do incremento de atividade enzimática de celulases utilizando dois métodos: aplicação de ultrassom e tratamento com CO₂ supercrítico (SC-CO₂). Desta forma, esse estudo pretende comparar a eficiência desses dois métodos, além de verificar a atuação dos coquetéis enzimáticos frente aos tratamentos e suas conseqüências na eficiência catalítica da enzima e liberação de açúcares redutores de um substrato lignocelulósico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito de ondas ultrassônicas e tratamento com CO₂ supercrítico na atividade enzimática de duas preparações comerciais de celulases Celluclast 1,5L (Novozymes®) e coquetel enzimático Cellic CTec2 (Novozymes®).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência dos tratamentos nas atividades enzimáticas das preparações comerciais pelo tratamento com ultrassom e CO₂ supercrítico;
- Otimizar as condições dos dois tratamentos através do uso da metodologia de planejamento de experimentos;
- Validar as condições de tratamento que incrementem as atividades enzimáticas;
- Avaliar o efeito dos tratamentos na etapa de hidrólise de biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar) e consequente liberação de açúcares redutores;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Produção de Bioetanol

A progressiva depleção das fontes energéticas, principalmente as produzidas por combustíveis não-renováveis, é notada mundialmente (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A natureza finita dos combustíveis fósseis e seu uso indiscriminado aliado às flutuações no preço do petróleo e ao aumento da demanda energética têm gerado um cenário de preocupação acerca dos impactos da atividade industrial no meio ambiente (SOCCOL et al., 2010; BALAT, 2011). A esse respeito, a segurança energética e ambiental são consideradas duas problemáticas mundiais atuais, o que tem impulsionado a busca por alternativas de energia, combustíveis renováveis e ambientalmente corretos e estimulado a implementação de tecnologias sustentáveis por parte do governo, academia, indústria e setor energético (AZHAR et al., 2017; ZABED et al., 2017).

Dentre as energias renováveis, prioridade foi dada aos combustíveis líquidos, devido ao fato de representarem 40% do total de energia consumida mundialmente e do setor de transporte ser quase inteiramente dependente de combustíveis derivados do petróleo (BALAT, 2011; ADITIYA et al., 2016; AZHAR et al., 2017). Os biocombustíveis, ou combustíveis provenientes de biomassa, oferecem vantagens em relação aos derivados de petróleo no que tange à mitigação da emissão de gases poluentes, pois são considerados fonte de energia limpa, renovável e sustentável (SOCCOL et al., 2010; BALAT, 2011; ADITIYA et al., 2016; SALLES-FILHO et al., 2017).

O combustível alternativo para abastecer esse setor deve ser viável tecnologicamente, economicamente competitivo, ambientalmente correto e prontamente disponível. Atendendo a essas demandas, o bioetanol surgiu como uma alternativa com vistas à redução da dependência dos combustíveis fósseis (SOCCOL et al., 2010; BALAT, 2011).

O bioetanol é um combustível líquido, sustentável e renovável, e além de ser o biocombustível mais utilizado no setor de transportes no mundo, o bioetanol (C_2H_5OH , etil-álcool, álcool etílico) oferece vantagens como: maior octanagem e menor toxicidade em relação à gasolina, ser prontamente biodegradável e produzir menos poluentes atmosféricos. (ADITIYA et al., 2016; AZHAR et al., 2017)

A produção de bioetanol conta com uma grande variedade de matérias-primas a serem utilizadas. A primeira geração (1G) envolve as matérias-primas ricas em sacarose (cana-de-açúcar, frutas, beterraba) e amido (milho, arroz, batata, trigo, batata-doce e cevada); a segunda-geração (2G) emprega biomassa lignocelulósica (madeira, palhas e gramíneas) e a

terceira-geração (3G) inclui a utilização de micro e macroalgas como matéria-prima (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; AZHAR et al., 2017).

No Brasil, em 1975 foi iniciado pelo governo brasileiro o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) com o objetivo de substituir a gasolina pelo etanol, e diminuir a dependência político-econômica variável em diferentes períodos. A cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para a produção de etanol naquele programa, devido às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis que tornam o país promissor para exportação dessa *commoditie* (SOCCOL et al., 2010; CONAB, 2017). Algumas características interessantes da cana-de-açúcar são o alto rendimento de biomassa, alto conteúdo de sacarose e alta eficiência em acumular energia solar (SINDHU et al., 2016).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e etanol de cana-de-açúcar, sendo a produção de cana-de-açúcar para a safra 2017/2018 estimada em 647,6 milhões de toneladas e produção de 26,45 bilhões de litros de etanol, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017). No entanto, o maior produtor mundial de bioetanol (utilizando, principalmente, milho como matéria-prima) desde 2006 são os Estados Unidos (EUA): aproximadamente 57 bilhões de litros foram produzidos no país em 2015 (SALLES-FILHO et al., 2017). Juntos, EUA e Brasil, dominam 85% da produção mundial de etanol (RFA, 2017).

Nos últimos 10 anos, mais países e companhias têm investido em tecnologias para tornar a produção de etanol viável, utilizando outras matérias-primas além de cana-de-açúcar e milho. O potencial global de bioenergia contida em resíduos e material lignocelulósicos tem se tornado uma alternativa interessante a ser explorada por ser a biomassa mais abundante no globo terrestre (HUANG et al., 2011). Uma vez que essa biomassa é produzida via fotossíntese pela redução do dióxido de carbono, a utilização de biocombustíveis pode ser carbono neutro, em relação à produção de gases causadores do efeito estufa (SINDHU et al., 2016). A maior parte dos esforços tecnológicos recentes no setor biotecnológico e bioenergético tem se concentrado na produção industrial de etanol de segunda-geração (2G) ou bioetanol celulósico (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; SALLES-FILHO et al., 2017).

Em relação à planta de cana-de-açúcar deve ser notado que apenas uma parte é utilizada para a produção bioenergética: um terço da planta é utilizado para a produção de açúcar (e etanol), um terço da biomassa produzida é bagaço de cana-de-açúcar (que é queimado para produção de energia elétrica) e um terço remanescente é deixado no campo a ser decomposto por micro-organismos (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008). No intuito de aproveitar os subprodutos de maneira eficiente, maximizar a obtenção de energia, e portanto,

alcançar um aumento significativo na produção de etanol, as tecnologias devem ser desenvolvidas a fim de converter os polissacarídeos de folhas, palhas e bagaço de cana-de-açúcar (que representam dois terços da biomassa) em etanol (SOCCOL et al., 2010).

O conceito de biorrefinaria contempla a utilização completa da biomassa de cana-de-açúcar e se torna um termo primordial para a composição de uma indústria sustentável de cana. A biomassa lignocelulósica apresenta um grande potencial para ser utilizada como substrato em processos de bioconversão e pode ser efetivamente explorada para a produção de produtos com valor agregado ou químicos (SINDHU et al., 2016).

De acordo com a União da Indústria de Cana-de-Açúcar, a produção de bagaço de cana no Brasil foi de, aproximadamente, 210 milhões de toneladas na safra de 2016/2017 (UNICA, 2017). Estudos demonstram que seria alcançado um aumento na produção de 60% mais litros de etanol por hectare se 50% do bagaço gerado fosse convertido a etanol (SOCCOL et al., 2010; SALLES-FILHO et al., 2017). Essa atrativa possibilidade colocou o etanol 2G como alternativa de baixo custo de reaproveitamento de resíduos agroindustriais, ainda que custos e viabilidade tecnológica representem barreiras à produção comercial (SALLES-FILHO et al., 2017).

1.3.2 Biomassa Lignocelulósica

A busca por fontes alternativas de energia que utiliza matérias-primas renováveis, sustentáveis e eficientes e que contemple tanto a economia industrial quanto a sociedade de consumo, tem apontado o etanol produzido de biomassa como opção que oferece relativa simplicidade de produção, não-toxicidade e bom custo-benefício. O bioetanol é produzido a partir da conversão de açúcares livres para serem fermentados, ou a partir de carboidratos complexos que são convertidos a esses açúcares disponíveis (ZABED et al., 2016). Dessa maneira, as matérias-primas utilizadas nesse processo podem ser divididas em três grupos: (i) matérias-primas açucaradas: que contêm sacarose – por exemplo: cana-de-açúcar, beterraba; (ii) matérias-primas amiláceas: que contêm amido - milho; trigo, cevada; (iii) biomassa lignocelulósica: que contêm lignocelulose – madeira, palha e gramíneas (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; ZABED et al., 2016).

Ainda que a produção de etanol partindo de amido e cana-de-açúcar apresente relativa facilidade, os custos das matérias-primas, as preocupações ambientais além do debate da utilização de grandes áreas cultiváveis para combustível e não alimentos são barreiras para a sustentação da produção de etanol por essas vias (ZABED et al., 2016). Evitando a competição

por áreas cultiváveis, a produção do biocombustível utilizando resíduos tem mínimo impacto direto no preço e disponibilidade de alimentos (CARRIQUIRY; DU; TIMILSINA, 2011). Por esses motivos, destaque tem sido dado à utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para essa produção, uma vez que são considerados subprodutos, de preço baixo e estável, rico em carboidratos e não-competitivos com a cadeia de produção de alimentos. Além de causar menores emissões líquidas de gases poluentes, considerando o processo de produção, do que o etanol convencional – primeira geração (1G) – o etanol 2G apresenta a possibilidade de maior aproveitamento da matéria-prima pela conversão dos açúcares estruturais no produto final (CARRIQUIRY; DU; TIMILSINA, 2011; ZABED et al., 2016).

Dentre os potenciais insumos para a geração de biocombustíveis de segunda geração são considerados os materiais lignocelulósicos: bagaço e a palha de cana-de-açúcar (SOCCOL et al., 2010). Depois da colheita da cana-de-açúcar, os colmos, caules ou talos, são transportados às moendas para extração do suco da cana. O bagaço de cana-de-açúcar é o material fibroso, resíduo dos talos de cana-de-açúcar, que sobra após o esmagamento e extração do suco (SOCCOL et al., 2010; SINDHU et al., 2016). Já a mistura de folhas secas e ponteiros da cana-de-açúcar deixados no solo após a colheita é chamada de palha ou *trash* (MACRELLI; MOGENSEN; ZACCHI, 2012). Estes subprodutos são gerados em grande quantidade pela indústria sucroalcooleira e geralmente empregados como combustível para queima e caldeiras (PANDEY et al., 2000).

A biomassa lignocelulósica, principal biopolímero e recurso renovável disponível no ambiente, consiste basicamente em holocelulose (celulose e hemiceluloses), lignina e uma pequena fração de cinzas, em diferentes proporções, pois o conteúdo de cada componente na matriz varia de acordo com a sua origem, local de cultivo, variedade e propriedades físicas (SOCCOL et al., 2010; ZABED et al., 2016). A holocelulose compreende cerca de dois terços do peso seco total da biomassa e são os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol (PANDEY et al., 2000). Os materiais lignocelulósicos são geralmente divididos em três componentes predominantes: celulose (30 a 50%), hemicelulose (15 a 35%) e lignina (10 a 20%) (LIMAYEM; RICKE, 2012; ZABED et al., 2016).

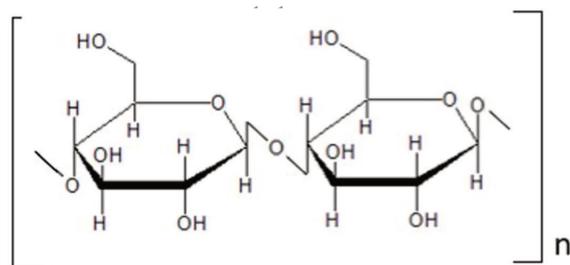
O bagaço consiste de, aproximadamente, 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Apresenta baixo teor de cinzas (2,4 %, aproximadamente), em comparação a outros resíduos de cereais que possuem mais de 10 % de cinzas em sua composição. Também em comparação a outros resíduos agroindustriais, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório de energia solar, devido à sua alta produtividade, que é cerca de 80 toneladas por hectare (PANDEY et al., 2000).

A celulose é o polissacarídeo majoritário presente nas paredes celulares vegetais, constitui cerca de 30 a 50% dos tecidos das plantas e é constantemente reabastecido pela fotossíntese (PANDEY et al., 2000; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; HAGHIGHI MOOD et al., 2013). A celulose encontra-se inserida em uma matriz de polímeros de carboidratos de lignina e hemicelulose. Os polímeros de celulose e hemicelulose são ligados firmemente a lignina por meio de ligações covalentes e de hidrogênio, o que torna a estrutura altamente robusta, recalcitrante à despolimerização e resistente a maioria dos tratamentos a que é submetida (LIMAYEM; RICKE, 2012; ZABED et al., 2016)

A celulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), conforme evidenciado na Figura 1-1. As cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados; a orientação β -(1,4) das ligações glicosídicas resulta na formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares formando microfibrilas. Essa característica confere à molécula de celulose insolubilidade, alta cristalinidade e resistência ao ataque enzimático (BON; FERRARA; CORVO, 2008; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; JOSHI et al., 2011; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; ZABED et al., 2016).

As extensivas ligações de hidrogênio ao longo da molécula resultam em uma matriz de estrutura cristalina, onde as microfibrilas de celulose apresentam regiões de alto grau de ordenação que possuem cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo, tornando rígidas as moléculas de celulose (ZABED et al., 2016). As regiões amorfas são as que possuem menor grau de ordenação das moléculas. Os graus de polimerização e cristalinidade variam e têm impacto significativo no processo de hidrólise (BON; FERRARA; CORVO, 2008; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; JOSHI et al., 2011; ZABED et al., 2016). Embora matérias amiláceas necessitem temperaturas entre 60 e 70°C para converter regiões cristalinas em amorfas, a celulose requer temperaturas de 320°C e pressão de 25 MPa para alterar a rígida estrutura cristalina a uma estrutura amorfa em água (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Figura 1-0-1. Representação da cadeia linear da



Fonte: Autor

A hemicelulose é um heteropolímero curto, variado e altamente ramificado composto de pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose) e ácidos orgânicos (por exemplo: α -D-glucorônico, α -D-galacturônico). Tem estrutura amorfa e menor massa molecular, tornando as moléculas mais facilmente hidrolisáveis (JOSHI et al., 2011; HAGHIGHI MOOD et al., 2013). Os grupos acetato dessa molécula são aleatoriamente ligados, com ligações éster, aos grupos hidroxila dos anéis dos açúcares, provendo a ligação entre lignina e celulose (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). A hemicelulose faz ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose, envolvendo-as em uma rede. Sua estrutura é principalmente constituída de xilanas através de ligações β -1,4 que unem D-xilose e L-arabinose (ZABED et al., 2016). Devido à diversidade de seus açúcares, a hemicelulose requer um amplo espectro de enzimas para completamente hidrolisar sua estrutura a monômeros livres (LIMAYEM; RICKE, 2012).

A lignina é um polímero aromático complexo altamente ramificado formado por fenilpropanóides, apresentando ligações cruzadas com os polissacarídeos da parede vegetal, auxiliando seu empacotamento. A lignina é um biopolímero rígido ligado covalentemente às xilanas (hemicelulose), conferindo rigidez e alto grau de compactidade à parede celular, frequentemente adjacente às fibras de celulose para formar o complexo lignocelulósico (LIMAYEM; RICKE, 2012; ZABED et al., 2016). A molécula de lignina promove suporte estrutural, tem estrutura amorfa e é resistente à degradação biológica (JOSHI et al., 2011).

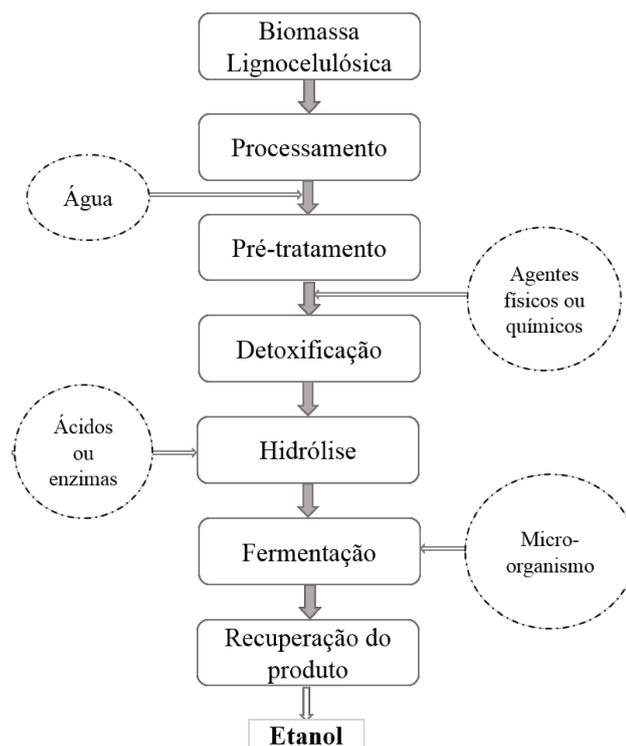
A cristalinidade da celulose, proteção pela lignina e características heterogêneas das partículas constituintes contribuem para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. A relação entre fatores de composição e estruturais refletem na complexidade desses materiais, e na variabilidade da digestão de diferentes biomassas (ZABED et al., 2016). A conversão bioquímica de materiais lignocelulósicos através da sacarificação e fermentação é a principal via para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, e essa resistência natural das moléculas à hidrólise é a principal dificuldade à conversão em açúcares fermentescíveis (BALAT, 2011; MACRELLI; MOGENSEN; ZACCHI, 2012).

1.3.2.1 Bioconversão da Biomassa Lignocelulósica a Bioetanol

A biomassa lignocelulósica pode ser transformada a bioetanol por duas abordagens diferentes: conversão bioquímica ou termoquímica. Ambas as rotas envolvem a degradação da estrutura recalcitrante da lignocelulose em frações de lignina, hemicelulose e celulose. Cada polissacarídeo é então hidrolisado a açúcares que são convertidos a etanol, subsequentemente

seguido por um processo de purificação (LIMAYEM; RICKE, 2012). A abordagem bioquímica de conversão da matéria lignocelulósica a etanol envolve diversas etapas destacadas na Figura 1-2, incluindo basicamente cinco operações unitárias: (i) pré-tratamento: etapa de desconstrução da estrutura da parede celular necessária para liberação da celulose e hemicelulose; (ii) hidrólise da celulose: despolimerização da celulose a moléculas de glicose fermentescíveis; (iii) fermentação das hexoses e pentoses: conversão dos açúcares a etanol pela ação de leveduras; (iv) separação do produto/destilação; (v) tratamento de efluentes (SOCCOL et al., 2010). Atualmente, essa rota é a mais comumente utilizada (ZABED et al., 2016). A adequada combinação de cada etapa é importante para que se atinjam altos rendimentos em etanol de uma maneira sustentável, com bom retorno e bom custo-benefício (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

Figura 1-0-2. Principais etapas do processo de produção do etanol lignocelulósico.



Fonte: Autor

O procedimento geral para a produção de etanol lignocelulósico começa com a moagem da biomassa para redução do tamanho das partículas. A biomassa então moída é misturada com água para fazer um “lodo” (*slurry*) com carga inicial de sólidos na faixa de 10 a 15 %. A geração de etanol a partir de biomassa lignocelulósica requer que a matriz lignocelulósica seja fracionada em porções que incluam individualmente polímeros de celulose,

hemicelulose e lignina, através da utilização de um método de pré-tratamento adequado. A biomassa então pré-tratada contém as moléculas de celulose e hemicelulose liberadas para serem hidrolisadas a açúcares solúveis, por via química ou enzimática. O produto da hidrólise é convertido a etanol durante fermentação microbiana, e uma vez produzido, o etanol presente no caldo fermentativo é recuperado – destilado - e purificado para que se obtenha a graduação adequada (ZABED et al., 2017).

As pesquisas relacionadas ao bioetanol celulósico podem ser divididas em três aspectos: *screening* de matérias-primas promissoras, desenvolvimento de tecnologias efetivas para aumentar o rendimento de etanol e reduzir os custos de produção, e desenvolvimento de bioagentes promissores através de *screening* de micro-organismos ou manipulação e engenharia genética. Entretanto, o conhecimento inadequado da composição da biomassa lignocelulósica, das técnicas de conversão, dos métodos tecnológicos e do papel dos micro-organismos podem limitar as pesquisas (ZABED et al., 2016).

1.3.2.2 Pré-Tratamento

Pré-tratamento efetivo é fundamental para otimização da etapa subsequente de hidrólise e sucesso nas etapas de *downstream* do produto (LIMAYEM; RICKE, 2012). O objetivo básico do pré-tratamento é tornar a celulose acessível à ação das celulasas, que é alcançada pela remoção da lignina e/ou hemicelulose da biomassa (SINDHU et al., 2016). Essa operação de *upstream*, um dos maiores desafios no processo de produção de etanol lignocelulósico, deve romper a complexa matriz de celulose e lignina, ligadas à hemicelulose (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

O tratamento prévio na biomassa aumenta a porosidade do substrato, com redistribuição da lignina, reduzindo assim a cristalinidade da celulose e aumentando a fração amorfa da molécula. Dessa maneira é possibilitada a exposição máxima da superfície da celulose às celulasas, essencial para que se alcance uma hidrólise efetiva com consumo mínimo de energia e máxima recuperação de açúcares (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; SINDHU et al., 2016). Diversas abordagens têm sido implementadas para incrementar a digestibilidade da lignocelulose, dentre os quais pode-se citar métodos físicos, físico-químicos ou biológicos de pré-tratamento da biomassa (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

A classe dos métodos físico-químicos é considerada mais efetiva que as abordagens físicas de tratamento da biomassa. Diferentes agentes químicos são empregados nesse processo, como ácidos, ozônio, peróxidos, bases e solventes orgânicos; e diversos métodos são aplicados

na biomassa, tais como: explosão a vapor, explosão com dióxido de carbono, tratamento ácido (hidrólise com ácido diluído, hidrólise com ácido concentrado), tratamento básico e ozonólise (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). O método convencional utilizado é o pré-tratamento ácido, usualmente ácido sulfúrico diluído com concentração abaixo de 4% e temperaturas altas, entretanto são acompanhados da formação de inibidores tóxicos à levedura, tais como furfural da xilose e hidroximetilfurfural (HMF) da glicose, além de compostos fenólicos e ácido acético (LIMAYEM; RICKE, 2012; YADAV, 2017).

A possível produção de inibidores e a extensão da sua toxicidade deve ser um fator importante a ser considerado na análise da relação custo-efetividade do pré-tratamento, principalmente quando ácido diluído é adicionado. De modo geral, a relação consumo de energia *versus* rendimento de açúcares, bem como a formação de compostos tóxicos inibitórios são os fatores primordiais a serem considerados na estimativa da eficiência do pré-tratamento e do custo-benefício da operação no intuito de atingir as condições ótimas desse processo. As etapas de detoxificação apresentam alto custo e portanto representam um obstáculo para o alcance de um pré-tratamento de alta performance (LIMAYEM; RICKE, 2012).

1.3.2.3 Hidrólise Enzimática

O sucesso da etapa de hidrólise é condicionado à efetividade da operação de pré-tratamento. Durante essa reação, os açúcares são liberados dos polímeros celulose e hemicelulose a monômeros livres de açúcares prontamente disponíveis para conversão a bioetanol na etapa fermentativa. Além disso, a digestibilidade do substrato lignocelulósico enzimático é incrementada com o aumento da porosidade do mesmo e da acessibilidade às enzimas (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Dois tipos de processos de hidrólise vêm sendo utilizados: hidrólise ácida (geralmente com ácido sulfúrico) e hidrólise enzimática. A reação que envolve a aplicação de ácidos pode ser dividida em hidrólise utilizando ácidos concentrados ou diluídos. A hidrólise com ácidos diluídos (1 a 3%) demanda altas temperaturas – 200 a 400°C – para romper a celulose cristalina em um pequeno tempo de reação. Esse processo é acompanhado pela degradação de hexoses e pentoses e formação de altas concentrações de compostos tóxicos, incluindo HMF e fenólicos, que comprometem uma sacarificação efetiva (LIMAYEM; RICKE, 2012). O método com ácido concentrado é tido como uma abordagem prática; ao contrário da utilização de ácido diluído, a hidrólise concentrada não gera altas concentrações de inibidores, pode ser realizada a baixas temperaturas e produz alto rendimento de açúcares livres (cerca de

90%). Porém, as grandes quantidades de ácido necessárias, além do custoso reciclo/disposição ou neutralização do ácido residual e corrosão do equipamento são grandes desvantagens que tornam o método comercialmente menos atrativo (LIMAYEM; RICKE, 2012; ZABED et al., 2017).

Enquanto o pré-tratamento com ácido resulta na formação de substratos mais reativos, quando ácido é usado como catalisador, sua hidrólise causa significativa desidratação química dos monossacarídeos formados, sendo formados aldeídos e produtos de degradação. Esse, entre outros problemas, tem conduzido o desenvolvimento e pesquisa para incrementar a hidrólise enzimática (LIMAYEM; RICKE, 2012).

A hidrólise enzimática é conduzida utilizando um complexo enzimático, composto principalmente de celulasas, que são biocatalisadores que atuam em sinergia (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Comparada à hidrólise ácida, a enzimática requer menos energia e condições brandas de atuação. Contudo, a eficiência econômica da hidrólise enzimática da biomassa é afetada por muitos fatores. Por exemplo, a celulase contribui para cerca de 20 a 30% do custo total da produção do bioetanol. Apesar de a eficiência enzimática ser afetada pela recalitrância da celulose, as pesquisas têm focado na otimização do processo de hidrólise e aumento da atividade enzimática (CHEN; FU, 2016).

Enzimas são capazes de hidrolisar ambas, celulose e hemicelulose, produzindo açúcares solúveis, a baixas temperaturas – 45 a 50°C – e não apresentando nenhum problema relacionado à corrosão de equipamentos. Comparado ao processo ácido, a degradação de açúcares e produção de inibidores é insignificante (ZABED et al., 2017). A sacarificação – conversão de celulose a glicose – é a chave para o custo-efetividade da produção de etanol 2G a longo prazo, uma vez que é um processo brando, fornece altos rendimentos e os custos de manutenção são, relativamente, baixos em comparação às hidrólises ácidas ou básicas (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

A degradação enzimática da celulose sólida é um processo complexo, quando o sistema enzimático das celulasas atua *in vitro* em substratos celulósicos insolúveis, três processos ocorrem simultaneamente: (i) mudanças físicas e químicas na fase sólida da celulose não solubilizada; (ii) hidrólise primária, envolvendo a liberação de intermediários solúveis da superfície reativa da molécula de celulose; (iii) hidrólise secundária, envolvendo a quebra de intermediários solúveis a intermediários de menor peso molecular, e finalmente à glicose (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

A taxa de hidrólise de materiais lignocelulósicos decresce rapidamente. Caracterizada, geralmente, por uma fase inicial rápida seguida de lenta fase secundária que pode

perdurar até o total consumo do substrato. Esse comportamento tem sido atribuído à rápida hidrólise das frações de celulose prontamente disponíveis, forte inibição pelo produto e lenta inativação de enzimas absorvidas (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008). Novas enzimas ou enzimas “melhoradas” continuam a ser desenvolvidas. A hidrólise efetiva da matriz interconectada da celulose, hemicelulose e lignina requer um grande número de celulasas a serem empregadas (SIMS et al., 2010).

1.3.2.4 Fermentação

Além do destacado, existem três processos que podem ser empregados na etapa fermentativa da produção de bioetanol que são: hidrólise e fermentação separados (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF) (AZHAR et al., 2017).

Tipicamente, na hidrólise e fermentação separadas (SHF) ocorre a inibição das enzimas hidrolíticas pelos monossacarídeos resultantes, tais como glicose e celobiose. A vantagem do SHF é que ambas, hidrólise e fermentação, ocorrem em suas condições ótimas: temperaturas mais altas na etapa de hidrólise – ótimas para as enzimas – e temperaturas mais baixas de operação na fase fermentativa – maximização da conversão dos açúcares pelos micro-organismos (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; AZHAR et al., 2017).

Já o processo SSF combina a hidrólise e fermentação mantendo baixa a concentração de açúcares livres de modo a não causar nenhuma inibição significativa das celulasas (LIMAYEM; RICKE, 2012). O tratamento enzimático pode ser realizado simultaneamente com micro-organismos modificados que realizam uma cofermentação em um processo conhecido como sacarificação e cofermentação simultânea (SSF). Em relação ao processo realizado separadamente (SHF), ambas as estratégias, SSF e SSCF, são preferidas por serem realizadas no mesmo tanque, por apresentarem menores custos, maior rendimento em etanol e menor tempo de processo (AZHAR et al., 2017).

O micro-organismo mais frequentemente utilizado para a fermentação em processos industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*, que é capaz de fermentar hexoses a etanol, mas incapaz de assimilar pentoses. A fim de superar esses obstáculos, a engenharia metabólica tem apresentado estratégias para que se aumente o rendimento de xilose em etanol. A falta de micro-organismos capazes de eficientemente fermentar hexoses e pentoses simultaneamente é um dos desafios a serem superados para a comercialização em larga escala do bioetanol lignocelulósico (CHEN; FU, 2016).

1.3.3 Celulases

O conjunto de enzimas envolvidas na completa degradação da celulose é normalmente referido como celulases. Celulases são uma mistura de diferentes enzimas celulolíticas que agem sinergisticamente nas moléculas de celulose, capazes de hidrolisar suas ligações (RECZEY et al., 1996). Os micro-organismos celulolíticos produzem uma combinação complexa de enzimas que têm especificidade pela ligação β -1,4-glicosídica e são altamente específicas quanto ao substrato (CASTRO; PEREIRA, 2010; SOCCOL et al., 2010; MOHANTY; ABDULLAHI, 2016).

Um sistema típico de celulases é composto por, no mínimo, três grupos de enzimas que atuam em colaboração, e que dependendo do sítio de ação no polímero celulose, são classificadas em endoglucanases (EG), exoglucanases (CBH) e β -glucosidases (BGL) (SOCCOL et al., 2010; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). Alguns complexos celulolíticos ainda contêm as enzimas exo-(1,4)- β -D-glucana-4-glucohidrolase (EC 3.2.1.74) e exo-(1,4)- β -celobiosidase (EC 3.2.1.176) (BISWAS; PERSAD; BISARIA, 2014).

Endoglucanases - endo- β -(1,4) -D-glucanases ou 1,4- β -D-glican-4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.4) – também conhecidas como CMCases, têm maior afinidade pelas regiões amorfas da celulose e promovem um ataque aleatório às ligações β -glicosídicas internas, resultando em cadeias de glicanas de diferentes comprimentos, tais como glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. Exercem efeito na celulose amorfa – cadeia solúvel da celulose - resultando na produção de oligossacarídeos com extremidades livres (redutoras). Seus cortes aleatórios causam um rápido decréscimo no comprimento da cadeia, de tal forma que a atividade desse grupo de enzimas resulta na diminuição da viscosidade acompanhada do aumento de grupos com extremidade redutora (SOCCOL et al., 2010; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; ZABED et al., 2017). Quando atuam em celodextrinas, a taxa de hidrólise aumenta com o grau de polimerização, dentro dos limites da solubilidade do substrato, com celobiose e celotriose como principais produtos finais (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

As exoglucanases – celobiohidrolases, avicelases, exo-(1,4)- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) – têm afinidade pela celulose cristalina e atuam nas extremidades da molécula. Podem atuar nas extremidades redutoras (exo-(1,4)- β -celobiosidase) – CBH do tipo I – ou nas extremidades não redutoras (exo-(1,4)- β -D-glucanases) – CBH do tipo II - , liberando β -celobiose como produto (SOCCOL et al., 2010; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; JUTURU; WU, 2014; LIAO et al., 2016; ZABED et al., 2017).

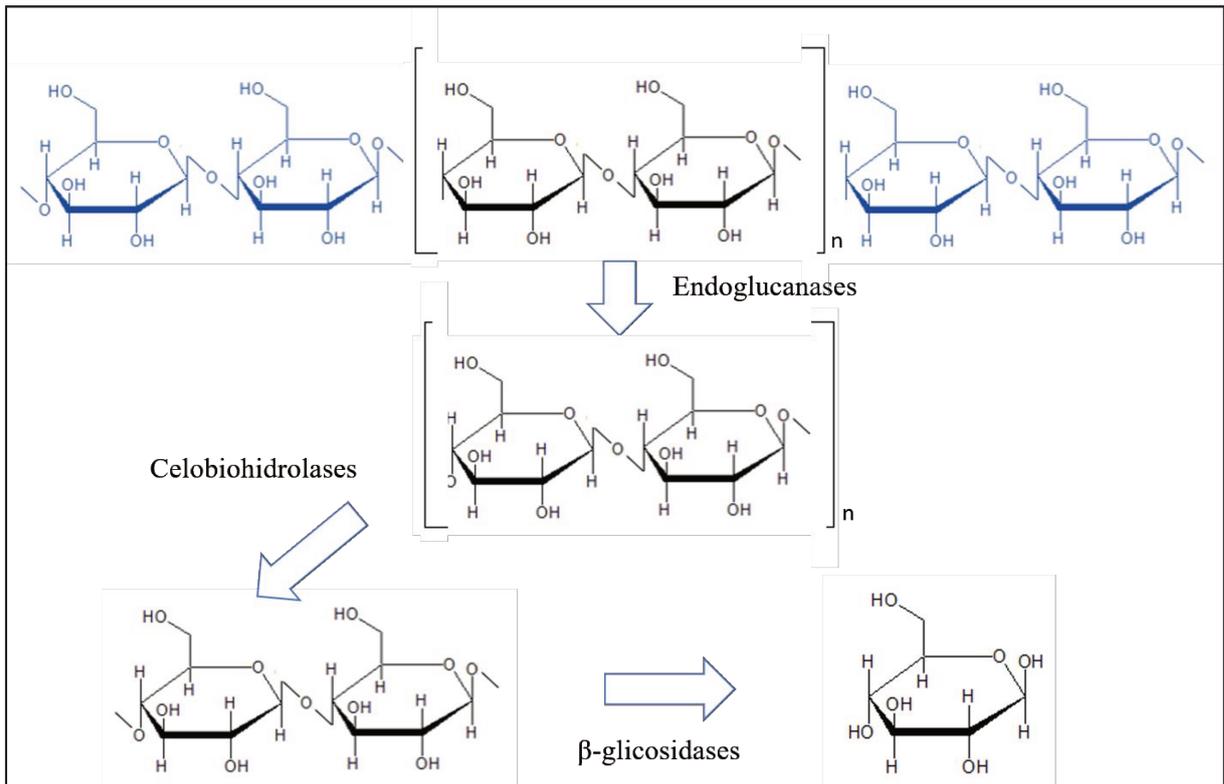
As β -glicosidades – celobiasas (EC 3.2.1.21) – hidrolisam as moléculas do dissacarídeo celobiose, resultante da ação das outras duas classes de enzimas, a duas moléculas de glicose (SOCCOL et al., 2010; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; ZABED et al., 2017). A atuação dessa enzima é essencial para que a hidrólise da celulose até glicose seja completa, também possui papel importante para evitar o acúmulo de celobiose – potente inibidor de celulases (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

Uma limitação do uso da celulase é a existência de inibição da atividade enzimática por produto (celobiose e glicose) e, conseqüentemente, há a redução na taxa de conversão. No processo de produção de bioetanol, uma alternativa para contornar esse problema é a hidrólise da celulose e fermentação simultânea do hidrolisado, conhecida como etapa de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) (BALAT, 2011).

Uma celulase eficiente deve ser capaz de degradar a celulose no seu estágio cristalino, com tolerância a um pH ácido (4-5) e condições de stress inerentes ao meio reacional complexo (ZABED et al., 2017).

Sistemas de celulases não são somente um aglomerado de enzimas representativas das três classes, mas sim catalisadores coordenados de maneira eficiente a hidrolisar a celulose (LYND et al., 2002). O mecanismo aceito para hidrólise enzimática da celulose envolve a ação combinada das endo e exoglucanases e das β -glicosidades. Endoglucanases hidrolisam as ligações intramoleculares β -1,4-glicosídicas acessíveis iniciando forte degradação e produzindo novos fins de cadeia, onde as exoglucanases são capazes de clivar e liberar celobiose. Por fim, as β -glicosidades completam o processo pela hidrólise da celobiose a glicose (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Figura 1-0-3. Estrutura molecular da celulose e sítios de ação das enzimas do complexo celulase



Estruturas em cinza representam a celulose cristalina e a região amorfa é apresentada em preto.
Fonte: Autor

1.3.3.1 Estrutura e Biologia Molecular das Celulases

As proteínas são designadas de acordo com a especificidade pelo substrato, e as celulases são agrupadas família das glicosil-hidrolases (GH). As famílias são definidas de acordo com as similaridades na sequência de aminoácidos, uma vez que existe, usualmente, relação direta entre a sequência de aminoácidos e o enovelamento (*folding*) da enzima (LYND et al., 2002). De acordo com o *Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy)*, as endoglucanases são encontradas nas famílias GH 5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 e 128. As exoglucanases são encontradas nas famílias GH 5-7 e 48, e as β-glicosidases nas famílias GH 1,3,4, 17, 30 e 116. (CAZy, 2017; JUTURU; WU, 2014).

Celulases são compostas de unidades discretas independentes de enovelamento, estrutura e funcionalidade chamados domínios ou módulos (KARMAKAR; RAY, 2011). As celulases provenientes de fungos têm uma arquitetura simples, contendo um sítio catalítico (*catalytic domain – CD*) e um sítio de ligação da celulose (*celulose binding domain – CBD*) no C-terminal unido por uma pequena região *poly-linker* ao sítio catalítico no N-terminal (JUTURU; WU, 2014).

Existem dois modos de ação da hidrólise de celulose pelas celulasas, seja por inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico. Pelo menos dois aminoácidos com grupos carboxílicos localizados no sítio ativo catalisam a reação por catálise ácido-base (KARMAKAR; RAY, 2011).

De acordo com Qin et al. 2008, glicosilação pode influenciar na atividade catalítica, pH ótimo e estabilidade térmica das enzimas em diferentes níveis. A Cel 5A é uma das enzimas mais abundantes de *Trichoderma reesei*, representando 5 a 10% do total de celulasas. Possui uma das maiores eficiências catalíticas dentre as endoglucanases. Os autores expressaram essa enzima na levedura *Saccharomyces cerevisiae* com dois graus diferentes de glicosilação, e concluíram que com glicosilação aumentada dos componentes da enzima, a faixa de pH tornou-se mais ampla bem como maior estabilidade térmica foi alcançada, sem mudanças na atividade enzimática.

A produção de enzimas pelo fungo *T. reesei* para a utilização de substratos complexos, tais como celulose, é induzida somente na presença de substrato, mas suprimida na presença de açúcares prontamente disponíveis, como glicose (LYND et al., 2002).

“Engenheirar” as celulasas para incrementar suas propriedades para que se tornem robustas às aplicações industriais é necessário. Mutagênese sítio-dirigida ou aleatória, ou uma combinação de ambas técnicas, tem sido aplicada para confecção de enzimas para aplicação industrial (LYND et al., 2002).

A inativação de celulasas pela presença de lignina é um grande desafio à hidrólise enzimática da biomassa. A enzima Cel 6A de *T. reesei* teve sua resistência a inativação por lignina incrementada em 15% pela substituição de seis aminoácidos (LAVIGNE et al., 2012). Da mesma maneira que a lignina, altas concentrações de glicose também podem inibir uma hidrólise eficiente e baseado no modelo homólogo da família 6 de *Penicillium chrysosporium* a enzima Cel 6A de *T. reesei* foi modificada. A substituição de aminoácidos selecionados diminuiu a inibição enzimática frente a altas concentrações de glicose 1,43 vezes quando comparada a enzima selvagem (LAVIGNE et al., 2009). Cel 6A de *T. reesei* foi engenheirada (Ser-413-Pro). A mudança de um único aminoácido causou o aumento da temperatura ótima da enzima (+5,6°C) e termoestabilidade(11 vezes) quando comparada à celulase original (ST-PIERRE et al., 2008).

1.3.3.2 Micro-organismos Produtores de Celulases

As celulases podem ser produzidas por bactérias e fungos, que podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos. As bactérias *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes* e *Microbispora* têm sido relatadas como produtoras do complexo celulolítico (JUTURU; WU, 2014).

Fungos filamentosos são a maior fonte de celulases e hemicelulases. Dentre eles, os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicilium* são amplamente utilizados para a produção de celulases (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008). *Trichoderma reesei* é um dos mais eficientes e produtivos fungos utilizados para a produção grau industrial de enzimas celulolíticas (LIMAYEM; RICKE, 2012). Linhagens selvagens e cepas mutantes de *Trichoderma* sp. (*T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*) têm sido considerados os fungos mais produtivos e são utilizados para a produção industrial de celulases devido às suas altas quantidades de enzima secretada e alto poder de hidrólise da celulose cristalina (SUN; CHENG, 2002; BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; BALAT, 2011). CBH I e CBH II, também conhecidas como Cel 7A e Cel 6A, são as principais enzimas produzidas por *T. reesei*, sendo que CBH I compreende cerca de 60% do total proteico celulolíticos (LYND et al., 2002), sendo relatado que produz pelo menos seis enzimas geneticamente diferentes: duas celobiohidrolases e quatro endoglucanases (Cel 7B, Cel 5B, Cel 2A e Cel 45A – ou EG I, II, III e IV) (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; QIN et al., 2008).

O fungo *Trichoderma reesei* produz uma quantidade satisfatória de endo e exoglucanases, entretanto secreta pequenas quantidades de β -glicosidases. O fungo *Aspergillus niger* é capaz de produzir maiores quantidades dessa enzima. O *screening* e descoberta de outros micro-organismos capazes de secretar celulases e novas estratégias de produção das enzimas são grande foco de pesquisa (CASTRO; PEREIRA, 2010; GOLDBECK et al., 2012, 2013a, 2013b, KUPSKI et al., 2014, 2015).

As celulases são expressas por um amplo espectro de micro-organismos na natureza. *Screening* e isolamento de novos micro-organismos produtores de celulases a partir do ambiente é uma das maneiras mais importantes de se obterem novas enzimas. Esses recém descobertos micro-organismos são fonte promissora de novos genes de celulases com propriedades distintas. De uma maneira geral, celulases são encontradas onde há o decaimento da matéria-orgânica por micro-organismos, sendo também expressas por alguns patógenos (JUTURU; WU, 2014). Nesse contexto, explorar a biodiversidade na busca por novos micro-

organismos capazes de produzir biocatalisadores é de grande interesse industrial (GOLDBECK et al., 2012).

1.3.3.3 Produção e Aplicação

A hidrólise enzimática representa o segundo maior custo operacional do processo produtivo de bioetanol, perdendo somente para a produção da biomassa, para etanol 2G é cerca de 25 a 30% dos custos operacionais. A grande diferença entre os dois é o coquetel enzimático necessário para o processo 2G, que devem conter uma combinação de ampla gama de atividades e propriedades, como celulasas, hemicelulasas e β -glicosidasas, que convertam os polissacarídeos a açúcares C6 e C5. A maioria das enzimas utilizadas comercialmente são de origem microbiana e, atualmente, existem três companhias que comercializam esse tipo de coquetel: *Novozymes*[®], *Dupont*[®] e *Abengoa*[®] (VALDIVIA et al., 2016).

Porém, além do já mencionado uso das celulasas para produção de bioetanol, as celulasas têm um amplo espectro de potenciais aplicações em biotecnologia e muitas endoglucanases termoestáveis tem chamado atenção pela possibilidade de aplicação industrial em diversas áreas. A demanda por essas enzimas está em constante ascensão devido às suas diversas aplicações, principalmente nas áreas de alimentos, bebidas (cerveja e vinho), alimentação animal, indústria têxtil, indústria de papel e celulose (KARMAKAR; RAY, 2011). Devido à crise no setor energético e aumento na demanda para produção de biocombustíveis e químicos a partir de fontes renováveis, a aplicação das celulasas em biorrefinarias tem demonstrado rápido crescimento (JUTURU; WU, 2014)

Na indústria têxtil, as celulasas são utilizadas rotineiramente para o processamento e finalização de tecidos a base de celulose, removendo fios ou sendo aplicadas em algodão como lavagem enzimática. Na indústria de alimentos, têm sido utilizadas para extração e clarificação de sucos de frutas, reduzindo sua viscosidade, aumentando seu rendimento, estabilidade e propriedades aromáticas durante o processamento (JUTURU; WU, 2014).

1.3.4 Estratégias para o Aumento da Atividade Enzimática

As celulasas utilizadas no processo de produção de etanol 2G representam grande parte dos custos envolvidos nessa tecnologia, porém apresentam grande potencial para redução dos custos associados à sua utilização (WANG et al., 2012). Comparado ao processo químico de hidrólise, a rota enzimática pode oferecer maior possibilidade de avanços no futuro. O Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA (*National Renewable Energy Laboratory*

– *NRel*) estima que a redução futura de custos pode ser quatro vezes maior para o processo enzimático do que para o processo de hidrólise por ácido concentrado, e três vezes maior que para a técnica com ácido diluído (KUHAD et al., 2016). Logo, além de um pré-tratamento eficiente que reduza a cristalinidade da celulose e remova a maior quantidade possível de lignina, o processo de hidrólise deve ser bem delineado para que tanto o tempo de hidrólise quanto a quantidade de enzima utilizada sejam minimizados (MOHANTY; ABDULLAHI, 2016).

As pesquisas relacionadas ao melhoramento do processo de produção do etanol 2G atualmente têm sido conduzidas pela necessidade de redução de custos (SOCCOL et al., 2010; NGUYEN; LE, 2013). No mercado há o consenso de que a custo final da contribuição enzimática deve ser estabilizado em cerca de \$0,4/gal – que atualmente se encontra na faixa de \$0,68/gal a \$1,47/gal (JOHNSON, 2016; VALDIVIA et al., 2016). Essa contribuição deve ser acompanhada de performance satisfatória em escala comercial (VALDIVIA et al., 2016).

Os coquetéis podem ser incrementados (i) pela redução da carga enzimática acoplado ao aumento da atividade enzimática via engenharia genética – utilizando estratégias de mutagênese de alta performance; (ii) através da redução do custo da proteína via melhoramento das metodologias; (iii) pelo aperfeiçoamento do rendimento da hidrólise adaptando o coquetel enzimático às condições de processo (VALDIVIA et al., 2016).

Além disso, diferentes estratégias têm sido aplicadas para superar os desafios da hidrólise enzimática da biomassa, dentre elas pode-se citar o *screening* e identificação de micro-organismos celulolíticos com melhor performance, otimização das cepas via modificação genética, evolução direta e engenharia de proteínas das enzimas, estudos teóricos do mecanismo de ação do complexo multienzimático, engenharia de misturas enzimáticas, avanços nas tecnologias de pré-tratamento, reutilização das enzimas e desenvolvimento de celulasas com maior atividade específica visando o aumento do rendimento e taxa de hidrólise enzimática (SOCCOL et al., 2010; NGUYEN; LE, 2013; KUHAD et al., 2016; ROCHA-MARTÍN et al., 2017).

A estabilidade desses biocatalisadores no processo catalítico é um parâmetro crítico e, portanto, é de extrema importância determinar os fatores que a afetam bem como as suas estreitas condições de operação (DOS SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2016). Dentre os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose destacam-se os substratos (estrutura da celulose), a atividade enzimática, as condições de reação (pH, temperatura) e presença de inibidores (SUN; CHENG, 2002; BALAT, 2011). Dessa maneira, as enzimas destinadas ao

processo de produção do etanol 2G devem ser otimizadas e testadas quanto a novos métodos para o incremento de suas atividades específicas.

1.3.4.1 Ultrassom

Ultrassom (US) é geralmente associado com efeito prejudicial às células e é utilizado como protocolo de rompimento de paredes celulares para liberação de produtos intracelulares. Enzimas e outras macromoléculas são conhecidas como suscetíveis aos danos causados pelo ultrassom, entretanto condições adequadas de ultrassom tem o potencial de incrementar a produtividade de bioprocessos envolvendo células, enzimas ou outras moléculas bioativas (SULAIMAN et al., 2011).

Ultrassom é um tipo de energia não radiante (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015), tecnologia emergente, considerada “verde” devido a suas propriedades, com alta eficiência e reprodutibilidade nas áreas que tem sido aplicada. O principal efeito do US em meio líquido é atribuído ao fenômeno físico da cavitação e ao fenômeno químico da formação de radicais livres (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; DALAGNOL et al., 2017).

As ondas ultrassônicas geradas pelo movimento periódico da sonda ultrassônica transferem energia à solução e causam alterações na pressão do sistema, levando à formação de pequenas bolhas. As bolhas se expandem e se contraem de acordo com o ciclo, e após as oscilações no tamanho durante múltiplos ciclos, elas finalmente colapsam violentamente gerando altas pressões, temperaturas e tensões de cisalhamento localizadas, sendo esse processo denominado cavitação (BUSSEMAKER; ZHANG, 2013; SUBHEDAR; GOGATE, 2014).

A cavitação pode causar alterações em nível molecular, aumentando a transferência de massa, minimizando o tempo de processo, aumentando a qualidade e garantindo segurança de produtos. Esse fenômeno também pode levar a alterações na funcionalidade de enzimas, uma vez que as mesmas atuam em meio aquoso (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; DALAGNOL et al., 2017; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; MAWSON et al., 2011).

Ondas ultrassônicas em diferentes frequências podem superar as limitações da difusão do substrato à enzima através da indução do movimento do fluido, aumentando a transferência de massa, garantindo a disponibilidade de substrato para a enzima e removendo os produtos das enzimas. O aumento da transferência de massa é obtido tanto a baixas frequências (pela geração da cavitação) quanto a altas frequências (através da geração de microcorrentes turbulentas). Esse colapso também pode resultar na formação de radicais livres

através da dissociação das moléculas dentro e próximas às bolhas (GOGATE; KABADI, 2009; ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; BUSSEMAKER; ZHANG, 2013).

A aplicação de US pode mudar o biocatalisador principalmente por três mecanismos: efeito térmico – elevação da temperatura leva à cavitação; formação de radicais livres – gerados pela sonicação de moléculas de água, tais como $\cdot\text{OH}$ e $\text{H}\cdot$; e alterações em nível molecular – causadas por forças mecânicas e de cisalhamento provenientes da cavitação, resultando em microcorrentes turbulentas e coalescência de bolhas (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015). Entretanto, as interferências desses efeitos são fortemente dependentes da intensidade e duração da aplicação do US, utilizando condições adequadas o tratamento pode ajudar a desintegrar agregados moleculares de enzimas a pequenos fragmentos expondo mais sítios ativos, contribuindo para a intensificação da atividade enzimática (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; SZABÓ; CSISZÁR, 2013).

A flutuação periódica na pressão (onda ultrassônica) pode controlar as características das enzimas através da alteração de sua estrutura em resposta a perturbação dinâmica. Em frequências de 10 a 1000 kHz, o ultrassom é capaz de perturbar regiões da enzima, como seu enovelamento e sítio catalítico, e afetar sua atividade (GOGATE; KABADI, 2009; ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

Mesmo que altas intensidades de ultrassom ou alto tempo de sonicação possam desnaturar enzimas, sendo relatado como método de inativação enzimática (por exemplo, (ANTHON et al., 2002; TIWARI et al., 2009; ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014; AGHAJANZADEH et al., 2016), estudos apresentaram resultados comprovando que o US pode ativar e incrementar a atividade catalítica de algumas enzimas, também o rendimento da reação e reduzir o tempo de catálise (LEAES et al., 2013; SUBHEDAR; GOGATE, 2014; AJMAL; FIEG; KEIL, 2016). em frequências e níveis de intensidade apropriados.

O tratamento com ultrassom pode resultar em mudanças conformacionais favoráveis nas moléculas de enzima sem alterar a sua integridade estrutural (NGUYEN; LE, 2013; SUBHEDAR; GOGATE, 2014). Nesse sentido, o conhecimento do efeito do US na atividade enzimática é importante e por mais que alguns desses efeitos são conhecidos, eles podem diferir dentre as enzimas devido às diferenças na sequência de aminoácidos e estrutura da proteína (SZABÓ; CSISZÁR, 2013; ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014).

Recentemente, processos com aplicação de ultrassom têm sido utilizados para aumentar a atividade catalítica de enzimas (WANG et al., 2012; NGUYEN; LE, 2013; SZABÓ; CSISZÁR, 2013), aumentar a eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos (BENZAZZI

et al., 2013), aumentar a produtividade de bioetanol (SULAIMAN et al., 2011), e estudar o rendimento do crescimento de leveduras e tolerância a etanol (DAI et al., 2017).

Guisseppi-Elie, Choi, and Geckeler (2009) avaliaram a atividade enzimática de glicose-oxidase sob ação de ultrassom e os resultados indicaram que a enzima sonicada a 23 kHz apresentou sua composição alterada com frações reduzidas de β -folha e α -hélice comparadas às enzimas não tratadas. Além das mudanças na estrutura secundária da enzima, um decréscimo na atividade enzimática também foi observado, indicando que o tempo e intensidade são parâmetros importantes de avaliação.

O estudo realizado por Nguyen e Le (2013) para investigar os efeitos do pré-tratamento com ultrassom na atividade catalítica do complexo de celulasas concluiu que mudanças na intensidade ultrassônica e no tempo de sonicação afetaram significativamente a atividade enzimática. No tratamento com ultrassom na intensidade de 6 W.mL^{-1} durante 80 segundos, a atividade da CMCase aumentou 18,7% e a FPase (celulasas totais) aumentou 39,4%, ambas em relação ao controle sem tratamento ultrassônico. Os autores também concluíram que, sob intensidades maiores de ultrassom e maiores tempos de tratamento, a atividade celulolítica foi reduzida drasticamente.

Subhedar and Gogate (2014) estudaram o efeito do tratamento ultrassônico de baixa intensidade na atividade enzimática de celulasas, bem como nos parâmetros cinéticos e termodinâmicos e na estrutura molecular da enzima. Os autores concluíram que o ultrassom teve um efeito positivo na atividade enzimática e que a seleção das condições de operação tem um papel crucial nesse aumento de atividade. A atividade máxima de celulase (aumento de 25% em relação à enzima não tratada) foi obtida com intensidade de ultrassom de $17,33 \text{ W.cm}^{-2}$ e tempo de 30 min. Após o tratamento ultrassônico, os parâmetros termodinâmicos de Energia de ativação (E_a) e variações de energia livre (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram reduzidos em 47%, 1,97%, 50% e 65%, respectivamente. E a partir das análises de fluorescência e dicroísmo circular foi observado um aumento no número de moléculas de triptofano na superfície da celulase estudada.

Szabó e Csiszár (2013) estudaram o efeito de ultrassom de baixa frequência na atividade e eficiência de celulase comercial (Celluclast 1,5 L), para obter informações detalhadas sobre o impacto de uma frequência de 40 kHz na atividade do complexo enzimático. Os autores reportaram uma diminuição na atividade enzimática relacionada fortemente à amplitude ultrassônica, e indicaram uma perda de 12% na atividade enzimática com uma amplitude de 40% em um tempo de 65 min.

Wang e colaboradores (2012) exploraram o mecanismo de impacto do ultrassom na atividade da celulase livre e imobilizada. Os resultados indicaram que a maior atividade enzimática (aumento de 18,17% em relação à enzima não tratada) foi obtida quando a enzima livre foi tratada com ultrassom de baixa intensidade de 15 W, 24 kHz por 10 min. O espectro de fluorescência e de dicroísmo circular revelou que o tratamento com ultrassom aumentou o número de moléculas de triptofano na superfície da celulase, com certa deformação na estrutura α -hélice.

Gasparotto et al. (2015) estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar não tratado sob sonicação direta e indireta utilizando enzimas produzidas por fermentação em estado sólido. Os autores demonstraram que existe grande diferença na utilização dos dois tipos de sonicação e que considerável incremento no rendimento da hidrólise foi obtido com sonicação indireta.

O efeito geral do ultrassom nas enzimas depende de parâmetros como tempo de duração da aplicação, quantidade de energia fornecida, tipo de enzima e presença de mediadores redox. A otimização desses parâmetros permitirá a determinação de condições ótimas das enzimas, bem como as condições para que atinjam sua máxima taxa de reação. Dessa forma é importante entender a relação sonicação-ação da enzima para o desenvolvimento de processos efetivos na área de sonobiotecnologia (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; SUBHEDAR; GOGATE, 2014).

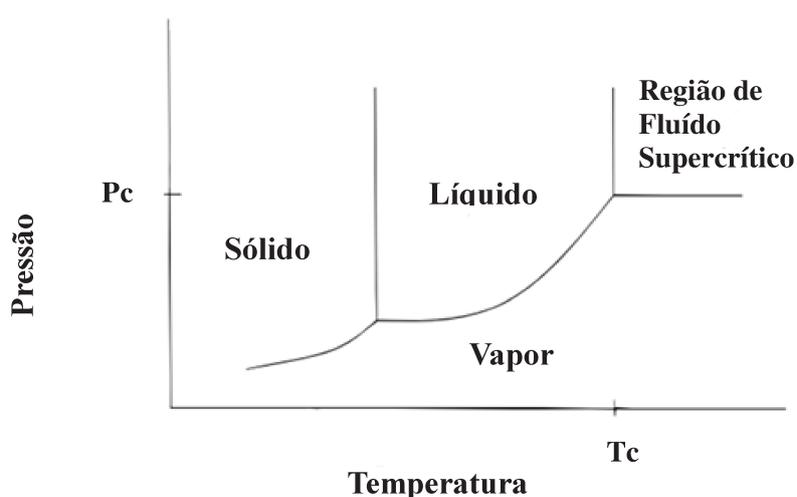
1.3.4.2 Fluidos Supercríticos

A aplicação de fluidos supercríticos (SFs) em técnicas de extração, fracionamento, catálise e como meio reacional tem crescido como uma alternativa ambientalmente correta e possibilitando o desenvolvimento de uma grande variedade de processos alternativos que independem do uso de solventes orgânicos (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007; RAMSEY et al., 2009). Fluidos supercríticos são substâncias acima de seus pontos críticos de pressão (P_c) e temperatura (T_c), conforme ilustrado na Figura 1-4. As propriedades dos SFs figuram entre as propriedades de líquidos e gases: a densidade dos SFs são comparáveis as de líquidos, enquanto as difusividades e viscosidades são semelhantes às dos gases (MESIANO; BECKMAN; RUSSELL, 1999; CANTONE; HANEFELD; BASSO, 2007).

Em processos de biocatálise, a difusividade semelhante à de gases e a baixa viscosidade aumentam a taxa de transferência de massa dos reagentes até o sítio ativo das enzimas dispersas no SF e simplificam os processos de *downstream*. Dessa maneira, as reações são limitadas pelas taxas de difusão e ocorrerão mais rapidamente do que em líquidos normais

(CANTONE; HANEFELD; BASSO, 2007). Perto do ponto crítico, pequenas mudanças na pressão e temperatura causam alterações significativas na densidade, coeficiente de partição, constante dielétrica e solubilidade (WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010). A habilidade para manipular propriedades físicas do solvente por meio da alteração de pressão ou temperatura é uma característica única dos sistemas supercríticos e os tornam meios atrativos para conduzir e, mais importante, controlar reações biocatalíticas (MESIANO; BECKMAN; RUSSELL, 1999).

Figura 1-0-4. Diagrama de Fases.



Fonte: Autor

Dentre os SFs mais utilizados destaca-se o dióxido de carbono (CO_2). O CO_2 supercrítico (SC- CO_2) apresenta como vantagens ser natural, não-tóxico, não-inflamável, e possui ponto crítico de pressão e temperatura (7,36 MPa e 31,0°C) considerado baixo em relação a outros fluidos supercríticos. Além dessas características atrativas, o SC- CO_2 é um meio de reação ambientalmente correto para a síntese química e biocatálise, pois é altamente disponível, de baixo custo, uma vez que é um subproduto de processos industriais e pode ser facilmente separado dos produtos reacionais através da redução de pressão. O subsequente reuso do CO_2 gasoso após sua recompressão no mesmo processo de reação representa outro fator importante que permite a classificação desse processo como “verde” e de tecnologia sustentável para o meio reacional com CO_2 (MESIANO; BECKMAN; RUSSELL, 1999; WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010; SENYAY-ONCEL; YESIL-CELIK TAS, 2015).

O comportamento de enzimas expostas ao SC- CO_2 quanto a sua estabilidade e atividade depende da espécie da enzima, do conteúdo de água na solução, da presença de solventes, da pressão e da temperatura empregados. Sob condições extremas, a estrutura

tridimensional das enzimas pode ser significativamente alterada, levando à desnaturação e consequente perda de atividade. Entretanto, pequenas mudanças podem induzir um estado ativo alternativo da enzima com alteração na atividade, estabilidade e especificidade (WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010). O fator mais importante que talvez cause a perda da atividade enzimática é, provavelmente, a etapa de despressurização do sistema, inevitável em sistemas operando em batelada. A compreensão da relação enzima-estrutura-função-meio pode alterar radicalmente o futuro da engenharia de solventes para o melhoramento da atividade enzimática (MESIANO; BECKMAN; RUSSELL, 1999).

Rezaei; Temelli; Jenab (2007) discorreram sobre os efeitos da pressão e temperatura em reações enzimáticas sob condições supercríticas de fluidos, incluindo com CO₂, e demonstraram que a maioria das enzimas são ativadas em fluidos supercríticos, e suas atividades podem ser incrementadas dentro de certos limites de temperatura e pressão.

Leitgeb et al. (2013) investigaram as atividades enzimáticas de celulase e α -amilase de *Hortae werneckii* depois de tratamento das células com SC-CO₂, e encontraram atividade residual suficiente após o tratamento e que ambas poderiam continuar a ser utilizadas como biocatalisadores nesse meio.

Park et al.(2001) conduziram experimentos de aplicação de SF na hidrólise de celulose pela enzima celulase. Os autores reportaram que a estabilidade da enzima foi mantida por 90 min a 50°C e em pressões superiores a 160 atm em SC-CO₂. Na hidrólise da celulose, o rendimento de glicose foi 100% e as constantes cinéticas foram incrementadas em condições supercríticas em relação às condições atmosféricas.

Senyay-Oncel and Yesil-Celiktas (2015) estudaram o aumento da atividade e estabilidade, parâmetros cinéticos e inativação térmica da celulase produzida a partir de *Trichoderma longibrachiatum*, tratada ou não com SC-CO₂. De acordo com o estudo, as condições ótimas de operação, que resultaram em uma atividade enzimática 48,3% maior para a enzima tratada em comparação a não tratada, foram 54°C, 180 bar e uma vazão de 10 g.min⁻¹ de CO₂ por 120 min.

Os processos enzimáticos tradicionais para reações de biocatálise envolvem grande quantidade de água e consumo energético. É de grande valia que se investigue a atividade e estabilidade das enzimas em meio reacional de dióxido de carbono supercrítico, de modo a desenvolver diferentes processos biocatalíticos integrando ou combinando enzimas. Teoricamente, a atividade e estabilidade de enzimas em meios supercríticos com dióxido de carbono são pontos cruciais e básicos para o desenvolvimento/aplicação de qualquer metodologia ou processo biocatalítico em meios livres de água (PENG et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.
- AGHAJANZADEH, S.; ZIAIIFAR, A. M.; KASHANINEJAD, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; ESMAILZADEH, E. Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 185, p. 72–77, 1 set. 2016.
- AJMAL, M.; FIEG, G.; KEIL, F. Analysis of process intensification in enzyme catalyzed reactions using ultrasound. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 110, p. 106–113, 2016.
- ÁLVAREZ, C.; REYES-SOSA, F. M.; DÍEZ, B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 149–156, 2016.
- ANTHON, G. E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; BARRETT, D. M. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6153–6159, 2002.
- AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; AZLAN, J.; AZIFA, A.; FAIK, M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**. v. 10, n. March, p. 52–61, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.
- BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4, p. 247–250, 2013.
- BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. S. Production of Cellulolytic Enzymes. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**, p. 105–132, 2014.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008.
- BRASIL, Ministério de Minas e Energia. Plano Decenal de Expansão de Energia 2024. Disponível em <Http://www.epe.gov.br/PDEE/.pdf>. 26 out 2017.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.
- BUSSEMAKER, M. J.; ZHANG, D. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 10, p. 3563–3580, 2013.
- CANTONE, S.; HANEFELD, U.; BASSO, A. Biocatalysis in non-conventional media-ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 954–971, 2007.
- CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**, v. 39, n. 7, p. 4222–4234, 1 jul. 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CAZy (CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES DATABASE). Glycoside Hydrolase Family classification. Disponível em < <http://www.cazy.org/> >. 26 out 2017.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n. p.813–835,2011.

CHEN, H.; FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468–478, 2016.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar**. Disponível em < <http://www.conab.gov.br/> >. 26 out 2017.

CORTEZ, L.A.B., LORA, E.E.S., GÓMEZ, E.O., 2008. **Biomassa para Bioenergia**. UNICAMP, Campinas.

DAI, C.; XIONG, F.; HE, R.; ZHANG, W.; MA, H. Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 191–197, 2017.

DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, n. July, p. 80–87, 2017.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 2015.

DOS SANTOS, P.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 170–178, 2016.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. Springer, 2011.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; FOLETTI, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 480–485, 2015.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60–72, 2009.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C.; PEREIRA, G.; MAUGERI FILHO, F. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 53, p. 11595–11603, 2012.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C.; RAMOS, M.; PEREIRA, G.; MAUGERI FILHO, F. Identification and characterization of cellulases produced by *Acremonium strictum* isolated from Brazilian biome. **International Research Journal of Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 2141–5463, 2013a.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using

different substrates. **Bioresource Technology**. v. 128, p. 797-803, 2013b.

GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S.-H.; GECKELER, K. E. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 118–123, 2009.

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

HUANG, G.; CHEN, S.; DAI, C.; SUN, L.; SUN, W.; TANG, Y.; XIONG, F.; HE, R.; MA, H. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 144–149, 2017.

HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225–245, 2011.

HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SCHOEN, P.; LUKAS, J.; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D.; DUDGEON, D. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. **Renewable Energy**, v. 303, n. May, p. 147, 2011.

ISLAM, M. N.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. The Inactivation of Enzymes by Ultrasound-A Review of Potential Mechanisms. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 1–21, 2014.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 2, p. 164–174, 2016.

JOSHI, B.; RAJ, M.; DINITA, B.; JARINA, S.; RAJANI, J. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. November, p. 172–182, 2011.

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

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. **Research Journal of Microbiology**. v. 6, p. 41-53, 2011.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139–144, 2001.

KNEZ; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ HRNČIČ, M.; ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 2014.

KUHAD, R. C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K. K.; KAUR, A.; PLETSCHKE, B. I.; SINGH, A.; KARP, M. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 1 mar. 2016.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, p. 280696, 2011.

KUPSKI, L.; DE CARVALHO SILVELLO, M. A.; FONTES, M. R. V.; LIMA, T. S.; TREICHEL, H.; BADIALE FURLONG, E. *R. Oryzae* cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129–138, 2015.

- KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; BUFFON, J. G.; FURLONG, E. B. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458–468, 2014.
- LAVIGNE, J.; SCOTT, B.R.; WHISSEL, M.; TOMASHEK, J.J.; Family 6 cellulase with decreased inactivation by lignin. US Pat US 8110389 B2. 2012
- LAVIGNE, J.; HILL, C.M.D.; TREMBLAY, A.; ST-PIERRE, P.; TOMASHEK, J.J.; **Cellulase variants with reduced inhibition by glucose**. US Pat. WO2009089630 A1. 2009
- LEAES, E. X.; LIMA, D.; MIKLASEVICIUS, L.; RAMON, A. P.; DAL PRÁ, V.; BASSACO, M. M.; TERRA, L. M.; MAZUTTI, M. A. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2013.
- LEITGEB, M.; ČOLNIK, M.; PRIMOŽIČ, M.; ZALAR, P.; CIMERMAN, N. G.; KNEZ, Ž. Activity of cellulase and α -amylase from *Hortaea werneckii* after cell treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 78, p. 143–148, 2013.
- LIAO, J. C.; MI, L.; PONTRELLI, S.; LUO, S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 288–304, 2016.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- LYND, L. R.; LIANG, X.; BIDDY, M. J.; ALLEE, A.; CAI, H.; FOUST, T.; HIMMEL, M. E.; LASER, M. S.; WANG, M.; WYMAN, C. E. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202–211, jun. 2017.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 3, p. 506–77, 2002.
- MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G.; Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, p.22, 2012.
- MAWSON, R.; GAMAGE, M.; TEREFE, N.S.; KNOERZER, K.; Ultrasound in Enzyme Activation and Inactivation. In: FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. Springer, 2011.
- MESIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A. J. Supercritical Biocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 2, p. 623–633, 1999.
- MOHANTY, B.; ABDULLAHI, I. I. Bioethanol Production from Lignocellulosic Waste-A Review. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, n. 2, p. 1153–1161, 2016.
- MURATOV, G.; KIM, C. Enzymatic Hydrolysis of Cotton Fibers in Supercritical CO₂. p. 85–88, 2002.
- MURATOV, G.; SEO, K.-W.; KIM, C. Application of Supercritical Carbondioxide to bioconversion of cotton Fibers. **Ind. Eng. Chem.** 2005. .

- NGUYEN, T. T. T.; LE, V. V. M. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 557–563, 2013.
- PALMQVIST, B.; WIMAN, M.; LIDÉN, G. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 10, 2011.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 1 ago. 2000.
- PARK, C. Y.; RYU, Y. W.; KIM, C.; UNIVEZZITY, A. Kinetics and Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide. **Koren Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 4, p. 475–478, 2001.
- PENG, Y.-K.; SUN, L.-L.; SHI, W.; LONG, J.-J. Investigation of enzymatic activity, stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide. **Journal of Cleaner Production**, v. 125, p. 331–340, 2016.
- PRAJAPAT, A. L.; SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 84–92, 2016.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. **Protein Expression and Purification**, v. 58, n. 1, p. 162–167, 2008.
- QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251–256, 2012.
- RAMSEY, E.; SUN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; GOU, W. Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 6, p. 720–726, jan. 2009.
- RECZEY, K.; SZENGYEL, Z.; EKLUND, R.; ZACCHI, G. Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 25–30, 1 jul. 1996.
- REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 272–280, 2007.
- RFA (Renewable Fuels Association). **World Fuel Ethanol Production**. Disponível em <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. 26 out 2017.
- ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 48–56, 2017.
- RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 70–77, 2015.
- ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298–306, 2009.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015.

SALLES-FILHO, S. L. M.; FELÍCIO, P.; CASTRO, D. De; BIN, A.; EDQUIST, C.; FLÁVIA, A.; FERRO, P.; CORDER, S. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector : The innovation driver. **Energy Policy**, v. 108, n. May, p. 70–77, 2017.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, V. E. N.; ELY, R. N.; SZKLO, A. S.; MAGRINI, A. Chemicals, electricity and fuels from biorefineries processing Brazil's sugarcane bagasse : Production recipes and minimum selling prices. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 53, p. 1443–1458, 2016.

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIKTAS, O. Activity and stability enhancement of α -amylase treated with sub- and supercritical carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 435–440, 2011.

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIKTAS, O. Characterization, immobilization, and activity enhancement of cellulase treated with supercritical CO₂. **Cellulose**, v. 22, n. 6, p. 3619–3631, 2015.

SERNA, L. V. D.; ALZATE, C. E. O.; ALZATE, C. A. C. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 113–120, 2016.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; SOARES, M. B. A.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, D.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Enzymatic hydrolysis of non-treated sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas with and without ultrasound assistance. **Renewable Energy**, v. 83, p. 674–679, 2015.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products: An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203–215, 1 dez. 2016.

SINGH, S.; BHARADWAJA, S. T. P.; YADAV, P. K.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Mechanistic Investigation in Ultrasound-Assisted (Alkaline) Delignification of Parthenium hysterophorus Biomass. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 37, p. 14241–14252, 2014.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; SILVA BON, E. P. da; MORAES, L. M. P. de; ARAÚJO, J. de A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

ST-PIERRE, P.; MASRI, N.; FOURNIER, M.C.; WHITE, T.C.; **Family 6 Cellulases With Increased Thermostability, Thermophilicity, And Alkalophilicity**. Us Pat WO/2008/025164. 2008.

- SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 108–114, 2014.
- SULAIMAN, A. Z.; AJIT, A.; YUNUS, R. M.; CHISTI, Y. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 141–150, 2011.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- SZABÓ, O. E.; CSISZÁR, E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1483–1489, 2013.
- TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 166–171, 2009.
- UNICA (União Das Indústrias De Cana-De-Açúcar). Histórico de Produção e Moagem. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php>>. 03 nov 2016.
- VALDIVIA, M.; GALAN, J. L.; LAFFARGA, J.; RAMOS, J. L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585–594, 2016.
- WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, 1 set. 2017.
- WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 222–227, 2012.
- WIMMER, Z.; ZAREVÚCKA, M. A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 233–253, 2010.
- YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 2017.
- ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.
- ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources : Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. January, p. 475–501, 2017.
- ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, p. 131–146, 2013.

2. CAPÍTULO 2

Influência da Aplicação de Ultrassom na Atividade Enzimática de Celulases Comerciais e na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar

Autores: Maria Augusta de Carvalho Silvello, Julian Martínez e Rosana Goldbeck

Artigo será submetido à revista *Ultrasonics Sonochemistry*

RESUMO

Aplicação de energia ultrassônica tem sido considerada uma tecnologia emergente para incrementar a atividade catalítica de enzimas através das mudanças conformacionais aportadas e da redução da resistência à transferência de massa em reações heterogêneas. O incremento das atividades enzimáticas de celulases tem particular interesse para a indústria do bioetanol, de modo que ao aumentar a eficiência de hidrólise há uma redução dos custos associados à via enzimática. Além disso, a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos sob tratamento com ondas ultrassônicas pode resultar em maior eficiência de liberação de açúcares prontamente assimiláveis. Em virtude disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do tratamento com ultrassom na atividade enzimática de celulases comerciais, bem como analisar os efeitos sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse trabalho a influência do tratamento com ultrassom foi avaliada em celulases comerciais (Celluclast 1,5L[®] e Cellic CTec2[®]) através da estratégia de planejamento experimental visando determinar o efeito do tempo de aplicação (10s a 330s), intensidade da sonda ultrassônica (160W a 350W) e temperatura do meio reacional (25° a 50°C). Após o planejamento experimental, as condições foram validadas e a estabilidade das enzimas foi avaliada após 48h. As mesmas condições aplicadas para as enzimas comerciais foram empregadas para o estudo da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (2 % m.v⁻¹) com uma carga enzimática de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹ para ambas as enzimas. Em relação aos resultados do estudo com as enzimas livres, a intensidade apresentou efeito positivo para a enzima Celluclast, sendo as condições que levaram ao aumento das atividades enzimáticas: tempo de 170s, intensidade de 240W (30%) e 30°C de temperatura. O coquetel enzimático (Cellic CTec2) apresentou melhor desempenho frente ao substrato insolúvel (FPase). Para os ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, foi incrementada a liberação de açúcares fermentescíveis com a aplicação de ultrassom. Quando aplicadas as condições validadas para a enzima Celluclast 1,5L (200W, 25°C, 330s) foram alcançadas concentrações 89% superiores ao controle de açúcares redutores. Já para o coquetel enzimático Cellic CTec2 na condição de 75s de aplicação de ultrassom e intensidade de 200W a 30°C foi registrada alta concentração de açúcares liberados (91,81% superiores ao controle) e rendimento teórico de hidrólise de celulose de 66,31%. O tratamento com ultrassom, em condições propícias, levou a resultados favoráveis de aumento de atividade catalítica de celulases e grau de hidrólise do substrato lignocelulósico, o que demonstra seu potencial de aplicação para o melhoramento de coquetéis enzimáticos empregados na hidrólise de bagaço-de-cana-de-açúcar.

2.1 INTRODUÇÃO

Ultrassom é um som emitido acima da frequência que audição humana é capaz de perceber, é uma energia não radiante e sua tecnologia é utilizada para uma grande variedade de aplicações em diversas áreas (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015). A tecnologia de sonicação é considerado uma tecnologia verde devido a sua alta eficiência, confiável repetibilidade, baixos requerimentos instrumentais, além de aportar significativa redução dos tempos de processo quando comparado aos processos tradicionais e performance economicamente viável (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; DALAGNOL et al., 2017).

A aplicação de ondas ultrassônicas gera cavitação, levando à formação de radicais livres, turbulência local e microturbulência de líquidos. A microcirculação de líquidos pode ser empregada na melhoria do transporte fluídico e atuar na redução da transferência de massa em sistemas heterogêneos. A cavitação pode causar alterações a nível molecular, aumentando a transferência de massa, minimizando o tempo de processo, aumentando a qualidade e garantindo segurança de produtos. (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; DALAGNOL et al., 2017).

Pela variação dos parâmetros de aplicação do ultrassom (frequência, intensidade, número de ciclos e duração da aplicação) diversos efeitos físicos, químicos e biológicos podem ser alcançados com a finalidade de aprimorar o processo desejado e potencializar a atividade de moléculas biológicas. A cavitação contribui para o efeito do ultrassom nas enzimas através de alguns mecanismos, podendo incrementar a catálise enzimática ou degradar o próprio biocatalisador (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015). Entretanto, em bioprocessos as condições que levam a efeitos benéficos do ultrassom são caso-específicas e não estão disponíveis em grandes quantidades na literatura (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

O mecanismo da cavitação pode acelerar a taxa de reação enzimática usufruindo da energia do ultrassom, talvez por aumentar o movimento de moléculas líquidas, consequentemente o acesso do substrato ao sítio ativo seja maior (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015).

Além disso, a utilização de tecnologias como ultrassom tem sido demonstradas com o potencial de incrementar a eficiência da hidrólise enzimática, de materiais lignocelulósicos,

por exemplo, sem a necessidade de pré-tratamentos severos ou alto *loading* enzimático (SILVA et al., 2015). Gasparotto et al., (2015) compararam a utilização de duas tecnologias de sonicação direta e indireta para incrementar a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzimas celulolíticas produzidas por via fermentativa em estado sólido, e concluíram que a aplicação de ondas ultrassônicas indiretas foram a tecnologia mais promissora a ser utilizada em reações enzimáticas por apresentar efeitos positivos no rendimento da hidrólise enzimática.

Em face disto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do tratamento com ultrassom na atividade enzimática de celulasas comerciais (Celluclast 1,5L[®] e Cellic CTec2[®]) e verificar também a influência desse tratamento na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Os efeitos de diferentes parâmetros de processo como tempo de aplicação, intensidade e temperatura do tratamento com ultrassom foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. Adicionalmente, o efeito do tratamento dos substratos com ultrassom durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foi estudado.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Aplicação de Ultrassom em Enzimas Comerciais e Avaliação da Estabilidade das Enzimas

A fim de estudar o efeito do tratamento com ultrassom (US) na atividade enzimática de celulasas foi adotada a estratégia do Planejamento Experimental (*Design of Experiments – DOE*) (RODRIGUES; IEMMA, 2014) para ambas as preparações comerciais: celulase comercial Celluclast 1,5L e coquetel enzimático Cellic CTec2 (Novozymes[®]).

A sonda ultrassônica (UNIQUE Group, DES500, Campinas, Brasil) – pertencente ao Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA – UNICAMP) foi utilizada nos experimentos, com macroponta de titânio de 13 mm de diâmetro, ligada a um transdutor piezoelétrico, com potência total de 800W que opera com geração de ultrassom de 20 a 99% da intensidade total.

O planejamento experimental com ultrassom realizado para as enzimas comerciais foi feito de acordo com um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis independentes (2^3), totalizando 17 ensaios – 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. Foram testadas as variáveis intensidade (W), tempo de aplicação (s) e temperatura (°C), sendo as faixas estudadas para a intensidade de 160 W a 350 W, para o tempo de 10 a 330 s, e para a temperatura de 25° a 50°C. A enzima foi diluída (1:100) em Tampão Acetato de Sódio 0,2M pH 4,8 e submetida ao tratamento com ultrassom, de acordo com a combinação de condições dispostas

na matriz do planejamento experimental apresentada na Tabela 2-1, com seus níveis codificados e valores reais (entre parênteses). As variáveis dependentes avaliadas (respostas) foram as atividades enzimáticas de endoglucanases (CMCase), celulases totais (FPase) e β -glicosidase). A mesma matriz dos planejamentos experimentais foi aplicada para o estudo de ambas preparações comerciais realizados separadamente.

As atividades enzimáticas foram quantificadas logo após os ensaios propostos pelos delineamentos experimentais e novamente após 48h para o teste de estabilidade enzimática das mesmas. As atividades enzimáticas das celulases comerciais brutas sem tratamento com ultrassom foram quantificadas (30 FPU.mL⁻¹ para Celluclast 1,5L e 70 FPU.mL⁻¹ para Cellic CTec2) e utilizadas como referência para adição de enzimas no processo de hidrólise com substrato. Após determinadas as condições ótimas do DCCR, foram realizados ensaios de validação do planejamento experimental.

Tabela 2-1. Matriz do planejamento experimental DCCR para otimização das atividades enzimáticas das celulases comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) separadamente.

Ensaios	Tempo (s)	Intensidade (W)	Temperatura (°C)
1	-1 (75)	-1 (200)	-1 (30)
2	+1 (265)	-1 (200)	-1 (30)
3	-1 (75)	+1 (311,2)	-1 (30)
4	+1 (265)	+1 (311,2)	-1 (30)
5	-1 (75)	-1 (200)	+1 (45)
6	+1 (265)	-1 (200)	+1 (45)
7	-1 (75)	+1 (311,2)	+1 (45)
8	+1 (265)	+1 (311,2)	+1 (45)
9	- 1,68 (10)	0 (255)	0 (37,5)
10	+ 1,68 (330)	0 (255)	0 (37,5)
11	0 (170)	- 1,68 (160)	0 (37,5)
12	0 (170)	+ 1,68 (350)	0 (37,5)
13	0 (170)	0 (255)	- 1,68 (25)
14	0 (170)	0 (255)	+ 1,68 (50)
15	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)
16	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)
17	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)

2.2.2 Influência do Tratamento na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar sob Tratamento com Ultrassom

As enzimas comerciais foram avaliadas quanto à sua capacidade de aumentar o grau de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela

empresa Raízen – Usina Costa e Pinto (Piracicaba, SP, Brasil), pré-tratado pelo método de hidrólise a ácido diluído (H₂SO₄) 0,5% sob pressão e caracterizado quanto a seus componentes químicos, segundo a metodologia descrita por Gouveia et al., (2009).

As celulasas comerciais Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 foram adicionadas com uma *loading* de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹ ao bagaço de cana-de-açúcar a uma concentração de 2% (m.v⁻¹) dissolvidos em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,8 (HUMBIRD et al., 2011). Os sistemas enzima + substrato foram submetidos aos tratamentos com ultrassom propostos pelo planejamento experimental. Um DCCR com três variáveis independentes (2³): intensidade (W), tempo de aplicação (s) e temperatura (°C) com total de 17 ensaios foi executado para cada uma das enzimas comerciais estudadas. As faixas das condições testadas foram intensidade de 160 W a 350 W, tempo de 10 a 330 s, e temperatura de 25° a 50°C. A matriz do planejamento experimental empregada foi a mesma descrita anteriormente (Tabela 2-1).

Após os tratamentos com ultrassom, o sistema enzima + substrato lignocelulósico foi mantido a 50°C por 24h para completar o processo de hidrólise. O aumento no grau de hidrólise foi verificado pela diferença na concentração inicial e final (após 24 h) de açúcares redutores liberados, que foram quantificados conforme proposto por Miller (1959) e por cromatografia HPLC, descritas a seguir. Também foi realizado o mesmo planejamento para o sistema sem enzima (com biomassa lignocelulósica e tratamento ultrassônico), para verificar possível liberação de açúcares somente pela aplicação do ultrassom (controle negativo). Já para o ensaio controle positivo para a liberação de açúcares redutores foram considerados os ensaios realizados com as enzimas comerciais sem aplicação de tratamento ultrassônico. A atividade das enzimas sem tratamento ultrassônico foi quantificada e considerada controle para o cálculo das atividades relativas.

2.2.3 Determinações Analíticas

As determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata e foram expressas em termos de atividade relativa ao controle, conforme a Equação 2-1.

$$\% \text{ Atividade Relativa} = \frac{\text{Atividade Enzimática dos Ensaios}}{\text{Atividade Enzimática do Controle}} * 100\% \quad (\text{Eq. 2-1})$$

2.2.3.1 Determinação da Atividade Enzimática da Endoglucanase (CMCase)

A atividade da enzima endoglucanase foi avaliada utilizando carboximetilcelulose (CMC) 1% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,8, como substrato, com uma razão enzima/substrato 1:1 (v.v⁻¹). A solução foi incubada por 10 min a 50°C (GHOSE, 1987). A

quantidade de açúcares redutores foi quantificada de acordo com Miller (1959), utilizando o reagente ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). Uma unidade de atividade da endoglucanase, também denominada CMCase, foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto.

2.2.3.2 Determinação da Atividade de Celulases Totais (FPase)

A atividade de celulases totais foi determinada utilizando como substrato o papel filtro (Whatman nº1), de acordo com Mandels e Sternberg (1976). O sistema foi constituído de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,8 e papel de filtro (substrato) com uma razão substrato/enzima 1:2 (m.v^{-1}), e incubado por 60 min a 50°C. A quantidade de açúcares redutores liberados foi quantificada espectrofotometricamente pelo método descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade de celulases totais, também denominada FPase, foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto a partir do papel filtro original.

2.2.3.3 Determinação da Atividade Enzimática da β -glicosidase

Para determinar a atividade da enzima β -glicosidase foi utilizado o método descrito por Afolabi (1997), utilizando uma solução de pNPG (*p*-nitrophenyl β -D-glucanopyranoside) 1 mg.mL^{-1} como substrato em tampão acetato 0,2 M pH 4,8. O sistema foi constituído de uma razão enzima/substrato 1:1 (v.v^{-1}) e a solução foi incubada por 30 min a 50°C. Subsequentemente, foi adicionado carbonato de sódio à reação e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto.

2.2.3.4 Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A quantificação foi realizada através de regressão linear obtida pela curva padrão de glicose (0 a 1 mg.mL^{-1}). A concentração de açúcares redutores foi expressa em termos de concentração relativa (%) em relação a concentração de açúcares (g.L^{-1}) liberadas pelo controle positivo, conforme Equação 2-2.

$$\text{Concentração Relativa de AR (\%)} = \frac{\text{AR dos Ensaios}}{\text{AR do controle}} * 100\% \quad (\text{Eq. 2-2})$$

2.2.3.5 Determinação do Conteúdo de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* 0,5 mol.L⁻¹ em meio alcalino. A quantificação foi realizada através de correlação com curva padrão de albumina (0 a 2,5 mg mL⁻¹).

2.2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para quantificar a concentração de açúcares após os tratamentos com ultrassom nos sistemas com enzima e substratos, as alíquotas dos ensaios de cada planejamento experimental foram analisadas por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) em cromatógrafo Accela (Thermo Fisher Scientific, EUA) equipado com bomba de gradiente (Accela 600 Pump) e detector de índice de refração (RI detector Accela). A separação dos compostos foi obtida em coluna analítica de troca iônica Aminex HPX-87H a 35°C e solução de H₂SO₄ pH 2,6 como fase móvel, vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e tempo de corrida individual de 20 min. A concentração dos açúcares foi analisada através dos tempos de retenção, por comparação com curva de calibração utilizando padrões analíticos de açúcares e ácidos orgânicos – glicose, celobiose, xilose, arabinose e ácido acético.

Partindo das concentrações (g.L⁻¹) de açúcares liberados [glicose, celobiose, xilose e arabinose], da biomassa (g.L⁻¹) inicial de substrato utilizada e da fração de celulose e hemicelulose [*f*] no bagaço de cana-de-açúcar é possível o cálculo do rendimento teórico da hidrólise de celulose (Equação 2-3) e hemicelulose (Equação 2-4) (QIU; AITA; WALKER, 2012).

$$\text{Rendimento teórico de Celulose (\%)} = \frac{[\text{Glicose}] + 1,053[\text{Celobiose}]}{1,111 * f * [\text{Biomassa}]} * 100\% \quad (\text{Eq. 2-3})$$

$$\text{Rendimento teórico de Hemicelulose (\%)} = \frac{0,9[\text{Xilose}] + 0,9[\text{Celobiose}]}{1,111 * f * [\text{Biomassa}]} * 100\% \quad (\text{Eq. 2-4})$$

2.2.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos de atividade enzimática do planejamento experimental foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), ao nível de 90% de confiança, utilizando o *software* Protimiza Experimental Design (PROTIMIZA, 2018). Os ensaios de validação, realizados em triplicata, foram analisados de acordo com teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05), utilizando o *software* STATISTICA[®] 8.0

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Efeito do Ultrassom sobre a Atividade Enzimática de Celulases Comerciais

Dois planejamentos experimentais independentes foram realizados para as celulases comerciais Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 de acordo com a matriz dos experimentos apresentadas na Tabela 2-1. Na Tabela 2-2 são apresentadas as variáveis estudadas - onde X1 = tempo de exposição (s), X2 = intensidade (W) e X3 = temperatura (°C) - com seus valores reais e os resultados do delineamento experimental para as atividades enzimáticas de endoglucanase (CMCase), celulases totais (FPase) e β -glicosidase, expressas em atividade relativa ao controle, e concentração de proteínas solúveis para ambos os planejamentos experimentais.

Conforme as condições testadas para o tratamento com ultrassom na enzima Celluclast (Tabela 2-2), a atividade enzimática da endoglucanase (CMCase) variou de 87% a 111% em relação à enzima sem tratamento. Já a atividade de celulases totais (FPase) de 44% a 119%, enquanto que para β -glicosidase variou de 85% a 106%. Também foi avaliada a concentração de proteínas que variou de 85,01 a 105,68 mg.mL⁻¹. Os pontos centrais (ensaios 15 a 17) apresentaram pequena variação entre si, indicando boa repetibilidade do processo.

Na tabela de resultados (Tabela 2-2) também pode-se observar que o coquetel enzimático (Cellic CTec2) apresentou atividade relativa de endoglucanases (CMCase) variando de 77 a 108%. Para a atividade de celulases totais (FPase) houve variação de 48 a 99%, enquanto que para a atividade enzimática da beta-glicosidase houve variação na faixa de 97 a 116%. Os pontos centrais (15 a 17) também apresentaram pequena variação, indicando boa repetibilidade do processo.

2.3.1.1 Efeito sobre a Atividade de Endoglucanase (CMCase)

Para os resultados obtidos foram calculados os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 2-3, bem como o erro padrão dos ensaios. Foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$). Analisando a Tabela 2-3 verifica-se que nenhum parâmetro foi estatisticamente significativo para o coquetel enzimático Cellic CTec2, os resultados experimentais apresentaram pequena variação dentro da faixa estudada, logo nenhum parâmetro influenciou significativamente nas respostas. A Tabela 2-4 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os ensaios do planejamento experimental para a Celluclast 1,5L.

Tabela 2-2. Resultados das atividades relativas (%) dos planejamentos experimentais quando empregado tratamento com ultrassom nas enzimas comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec 2).

Ensaio	Celluclast 1,5L [®]				Cellic CTec2 [®]						
	X1 (s)	X2 (W)	X3 (°C)	CMCase (%)	FPase (%)	β-glicosidase (%)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	CMCase (%)	FPase (%)	β-glicosidase (%)	Proteína (mg.mL ⁻¹)
1	-1 (75)	-1 (200)	-1 (30)	100,4	105,6	102,6	102,61	91,9	69,3	106,4	135,62
2	+1 (265)	-1 (200)	-1 (30)	95,6	112,8	95,1	95,09	91,5	61,7	110,4	118,69
3	-1 (75)	+1 (311)	-1 (30)	106,2	119,5	105,7	105,68	89,5	84,9	101,4	152,46
4	+1 (265)	+1 (311)	-1 (30)	104,0	68,2	99,9	99,92	108,4	55,5	97,5	183,31
5	-1 (75)	-1 (200)	+1 (45)	100,0	101,7	99,5	99,51	83,8	48,4	106,1	204,71
6	+1 (265)	-1 (200)	+1 (45)	88,0	106,7	97,2	97,16	86,3	73,6	98,3	175,33
7	-1 (75)	+1 (311)	+1 (45)	107,2	68,0	103,4	103,43	92,5	70,6	109,6	215,31
8	+1 (265)	+1 (311)	+1 (45)	104,6	47,5	101,8	101,83	106,5	54,2	111,3	217,56
9	-1,68 (10)	0 (255)	0 (37,5)	86,8	83,9	96,9	96,94	84,3	62,8	109,4	164,18
10	+1,68 (330)	0 (255)	0 (37,5)	91,7	44,2	98,2	98,15	87,0	67,4	104,4	140,56
11	0 (170)	-1,68 (160)	0 (37,5)	104,6	60,4	92,6	92,57	86,4	85,6	114,1	180,45
12	0 (170)	+1,68 (350)	0 (37,5)	111,4	54,0	90,9	90,87	81,4	88,8	115,6	200,54
13	0 (170)	0 (255)	-1,68 (25)	102,7	109,9	105,2	105,18	77,4	98,8	103,0	182,1
14	0 (170)	0 (255)	+1,68 (50)	86,6	55,2	96,3	96,35	84,9	93,2	98,8	175,45
15	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)	93,9	53,9	85,7	85,68	87,6	96,9	111,3	190,31
16	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)	92,6	54,8	85,0	85,01	87,6	94,3	108,1	207,51
17	0 (170)	0 (255)	0 (37,5)	95,0	54,3	85,8	85,82	88,6	97,5	109,8	184,82

X1-Tempo (s), X2- Intensidade (W), X3- Temperatura (°C)

Atividades enzimáticas relativas (%) = Atividades enzimáticas nos ensaios. Atividade enzimática do Controle⁻¹

Tabela 2-3. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de endoglucanase (CMCase) para ambos os planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão		t (7)		p - valor	
	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic
Média	93,617	87,229	2,885	5,372	32,455	16,238	0,000	0,000
(1) Tempo (L)	-0,972	2,901	1,355	2,523	-0,718	1,150	0,496	0,288
Tempo (Q)	-0,896	1,535	1,491	2,777	-0,601	0,553	0,567	0,598
(2) Intensidade (L)	3,622	2,563	1,355	2,523	2,674	1,016	0,032	0,344
Intensidade (Q)	5,719	0,913	1,491	2,777	3,836	0,329	0,006	0,752
(3) Temperatura (L)	-2,445	0,029	1,355	2,523	-1,805	0,011	0,061	0,991
Temperatura (Q)	1,013	-0,065	1,491	2,777	0,68	-0,023	0,519	0,982
(1L)·(2L)	1,491	3,839	1,77	3,296	0,842	1,165	0,427	0,282
(1L)·(3L)	-0,951	-0,234	1,77	3,296	-0,537	-0,071	0,608	0,945
(2L)·(3L)	1,196	1,804	1,77	3,296	0,676	0,547	0,521	0,601

Em negrito, fatores estatisticamente significativos (90% confiança)
Termos lineares (L); termos quadráticos (Q).

Tabela 2-4 Análise de variância da endoglucanase (CMCase) com enzima Celluclast 1,5L do DCCR.

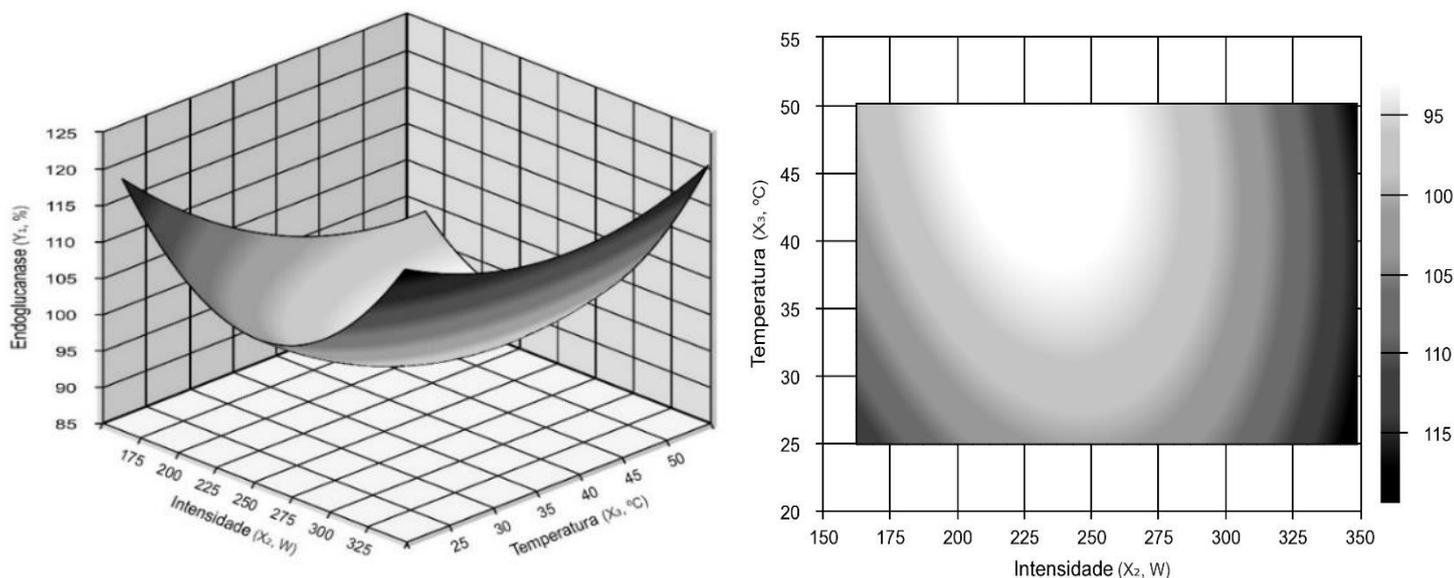
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Regressão	683,05	3	227,68	11,65	0,0005
Resíduos	253,99	13	19,54		
Total	937,04	16			

Porcentagem de variação explicada (R^2)=72,89% $F_{0,1;3;13}=2,56$

Os coeficientes de regressão da temperatura e intensidade, além do termo quadrático da intensidade foram considerados estatisticamente significativos ($p < 0,1$) para a celulase comercial Celluclast, após a reparametrização do modelo. Os requisitos para a construção do modelo codificado reparametrizado e superfície de respostas foram atendidos, sendo esses apresentados pela Equação 2-5 - onde X_1 =tempo, X_2 = intensidade, X_3 = temperatura. A Figura 2-1 apresenta as superfícies de resposta e curvas de contorno para CMCase da enzima Celluclast 1,5L.

$$\text{Atividade relativa de endoglucanase (\%)} = 93,73 + 3,62 X_2 + 5,69 X_2^2 - 2,45 X_3 \quad (\text{Eq. 2-5})$$

Figura 2-1. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade enzimática de endoglucanases (CMCase) da enzima Celluclast 1,5L em função da Intensidade e Temperatura de aplicação do ultrassom



Em relação ao coquetel enzimático Cellic CTec2, as atividades de CMCase da Celluclast 1,5L apresentaram melhor atividade enzimática média. Da análise das superfícies de resposta e da estimativa dos coeficientes de regressão, pode-se notar que o aumento da intensidade leva a atividades relativas de endoglucanase maiores, contrário do verificado para temperatura que apresenta melhores resultados quando seus níveis são os inferiores. O melhor resultado para essa atividade enzimática foi de $89,95 \text{ U.mL}^{-1}$ obtida no ensaio 12 com intensidade de 350W por 170s e temperatura de $37,5^\circ\text{C}$.

Conforme pode ser observado na Tabela 2-3 e visualizado com auxílio da Figura 2-1, nota-se que maiores intensidades da sonda ultrassônica causam aumento da atividade enzimática de CMCases para a enzima Celluclast 1,5L. Comportamento contrário ao relatado por Szabó e Csiszár (2013) que estudaram o efeito do ultrassom de baixa frequência na atividade e eficiência da mesma celulase comercial (Celluclast 1,5 L), avaliando, porém, a atividade de celulases totais (FPase). Nesse estudo, condições de pH 4,5 a 5,0, ótimas para a atividade enzimática, foram empregadas para que se obtivessem maiores detalhes acerca do efeito de tratamento com sonda ultrassônica de 40 kHz na atividade enzimática. Os autores reportaram uma diminuição na atividade enzimática relacionada fortemente à amplitude ultrassônica, e indicaram uma perda de 12% na atividade enzimática com uma amplitude de 40% em um tempo de 65 min.

Ao mesmo tempo que a intensidade incrementa a atividade, o aumento da temperatura causa redução da atividade enzimática (Fig. 2-1). Esse fato pode estar relacionado com o fato de que temperaturas na faixa de 50°C são consideradas ótimas para a atuação de celulasas, de tal forma que o sítio ativo das mesmas poderia estar mais exposto ao tratamento com ultrassom nos ensaios realizados nessa temperatura e por consequência, o ultrassom pode ter afetado o sítio ativo. De acordo com Szabó e Csiszár (2013), dependendo dos parâmetros de sonicação, a enzima é suscetível ao ultrassom e sua atividade decresce significativamente. Apesar da redução preocupante da atividade enzimática, o resultado da hidrólise catalisada por enzima foi sempre positivo, implicando que efeitos vantajosos da sonicação são perceptíveis na reação enzimática heterogênea, superando as modificações indesejáveis na estrutura enzimática após o tratamento com ultrassom.

2.3.1.2 Efeito sobre a Atividade de Celulasas Totais (FPase)

Foram calculados os coeficientes de regressão para os resultados da atividade enzimática de celulasas totais (FPase) para ambas as enzimas (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) e esses estão apresentados na Tabela 2-5. Os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$) foram considerados significativos. O coeficiente de correlação obtido foi de 77,82% para a enzima comercial Celluclast 1,5L e 76,28% para o coquetel enzimático Cellic CTec2, antes da reparametrização. A Tabela 2-6 apresenta a ANOVA dos resultados da FPase para Celluclast 1,5L e a Tabela 2-7 apresenta a análise de variância para a resposta de atividade de celulasas totais da Cellic CTec2, ambas para o modelo reparametrizado.

Tabela 2-5. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de celulases totais (FPase) para ambos planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão		t (7)		p - valor	
	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic
Média	52,877	97,342	10,974	7,171	4,818	13,575	0,002	0,000
(1) Tempo (L)	-9,245	-1,506	5,153	3,367	-1,793	-0,447	0,116	0,668
Tempo (Q)	8,443	-14,825	5,672	3,706	1,489	-4,00	0,179	0,005
(2) Intensidade (L)	-9,849	1,288	5,153	3,367	-1,911	0,383	0,098	0,713
Intensidade (Q)	6,004	-7,006	5,672	3,706	1,059	-1,89	0,325	0,099
(3) Temperatura (L)	-12,745	-2,494	5,153	3,367	-2,473	-0,741	0,043	0,483
Temperatura (Q)	14,969	-3,886	5,672	3,706	2,639	-1,049	0,033	0,329
(1L)·(2L)	-10,509	-7,928	6,733	4,4	-1,561	-1,802	0,163	0,115
(1L)·(3L)	3,586	5,707	6,733	4,4	0,533	1,297	0,611	0,236
(2L)·(3L)	-7,763	-0,817	6,733	4,4	-1,153	-0,186	0,287	0,858

Em negrito, fatores estatisticamente significativos (90% confiança)
 Legenda: termos lineares (L); termos quadráticos (Q).

Tabela 2-6. Análise de variância de celulases totais (FPase) para DCCR com enzima Celluclast 1,5L.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Regressão	5318,9	3	1773,0	3,761	0,0496
Resíduos	6129,3	13	471,46		
Total	11448,20	16			

Porcentagem de variação explicada (R^2)=46,46% ; $F_{0,1;3;13}=2,56$

Excluindo os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos do modelo para a enzima Celluclast, o coeficiente de correlação é reduzido drasticamente e os requisitos não são atendidos para a construção do modelo preditivo e superfícies de respostas. Mesmo assim, o ensaio 3 (com 312 W de intensidade, 30°C por 75s) apresentou boa resposta de atividade relativa de celulases totais 39,42 U.mL⁻¹.

Tabela 2-7. Análise de variância de celulases totais (FPase) para DCCR com enzima Cellic CTec2.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calculado}	p-valor
Regressão	2910,98	3	970,33	7,60	0,0035
Resíduos	1653,39	13	127,60		
Total	4566,75	16			

Porcentagem de variação explicada (R^2)=63,70% ; $F_{0,1;3;13}=2,56$

Para o coquetel Cellic CTec2, os termos quadráticos do tempo e intensidade e a interação entre tempo e intensidade foram estatisticamente significativos, porém o coeficiente de correlação é baixo para que sejam construídos modelos e superfícies de resposta. Pode-se observar que os pontos centrais foram o ponto de inflexão, de maior atividade relativa de celulases totais, indicando que tempos de 100 a 250 s, e intensidades de 200 a 320 W podem ser favoráveis a atividade enzimática de celulases totais (FPase), uma vez que quando comparada à enzima comercial (Celluclast 1,5L) essa atinge maiores porcentagens. Talvez pelo fato do coquetel possuir outras enzimas acessórias, a degradação de um substrato insolúvel como o papel filtro tenha sido facilitada.

2.3.1.3 Efeito sobre a atividade de β -glicosidase

A Tabela 2-8 apresenta os coeficientes de regressão para a resposta β -glicosidase, bem como os p-valores – que foram considerados significativos a um nível de 90% de confiança para ambas as enzimas. O coeficiente de correlação obtido foi de 86,20% e 82,68% para a Celluclast e Cellic CTec2, respectivamente. A Tabela 2-9 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta de β -glicosidase para a enzima comercial Celluclast e a Tabela 2-10 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta de β -glicosidase da enzima comercial Cellic CTec2.

Tabela 2-8. Estimativa dos coeficientes de regressão para atividade enzimática de β -glicosidase para ambos os planejamentos (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão		t (7)		p – valor	
	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic	Celluclast	Cellic
Média	85,292	109,898	2,155	1,99	39,57	55,233	0,000	0,000
(1) Tempo (L)	-1,112	-1,063	1,012	0,934	-1,099	-1,138	0,308	0,293
Tempo (Q)	4,989	-1,516	1,114	1,028	4,478	-1,474	0,003	0,184
(2) Intensidade (L)	0,997	0,087	1,012	0,934	0,985	0,093	0,357	0,929
Intensidade (Q)	2,931	1,284	1,114	1,028	2,631	1,248	0,034	0,252
(3) Temperatura (L)	-1,188	0,182	1,012	0,934	-1,174	0,195	0,279	0,851
Temperatura (Q)	6,128	-3,634	1,114	1,028	5,5	-3,533	0,001	0,009
(1L)·(2L)	0,314	0,199	1,323	1,221	0,238	0,163	0,819	0,875
(1L)·(3L)	1,165	-0,769	1,323	1,221	0,881	-0,63	0,407	0,549
(2L)·(3L)	0,085	4,294	1,323	1,221	0,064	3,517	0,951	0,009

Em negrito, fatores estatisticamente significativos (90% confiança)
 Legenda: termos lineares (L); termos quadráticos (Q)

Tabela 2-9. Análise de variância de β -glicosidase para o DCCR empregando a enzima Celluclast 1,5L.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Regressão	550,17	3	183,39	14,95	0,00017
Resíduos	159,41	13	12,26		
Total	709,58	16			

Porcentagem de variação explicada (R^2)=77,53% ; $F_{0,1;3;13}=2,56$

Os termos quadráticos do tempo, intensidade e temperatura foram estatisticamente significativos para a Celluclast, conforme apresentado no modelo preditivo reparametrizado (Equação 2-6), onde X1=tempo, X2= intensidade, X3= temperatura.

$$\text{Atividade relativa de } \beta\text{-glicosidase (\%)} = 85,29 + 4,99 X_1^2 + 2,93 X_2^2 + 6,13 X_3^2 \text{ (Eq. 2-6)}$$

A Figura 2-2 apresenta as superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática da β -glicosidase da celulase comercial Celluclast 1,5L. Pela análise das superfícies de resposta, aliado aos coeficientes de regressão observa-se que as condições dos

pontos centrais apresentaram os menores valores de atividade enzimática. Porém os ensaios 3 (com 312 W de intensidade, 30°C por 75s) e 13 (com 256 W de intensidade, 25°C por 170s) apresentaram bons resultados de atividade e indicam que os pontos axiais são mais apropriados para maximização da atividade enzimática.

Dessa maneira, pode-se verificar que para a celulase comercial Celluclast 1,5L as condições muito drásticas de altas intensidades e tempos não são benéficas para o incremento da atividade enzimática, salvo para a resposta de endoglucanase que é afetada positivamente com o aumento da intensidade.

Tabela 2-10. Análise de variância de β -glicosidase para o DCCR empregando a enzima Cellic CTec2.

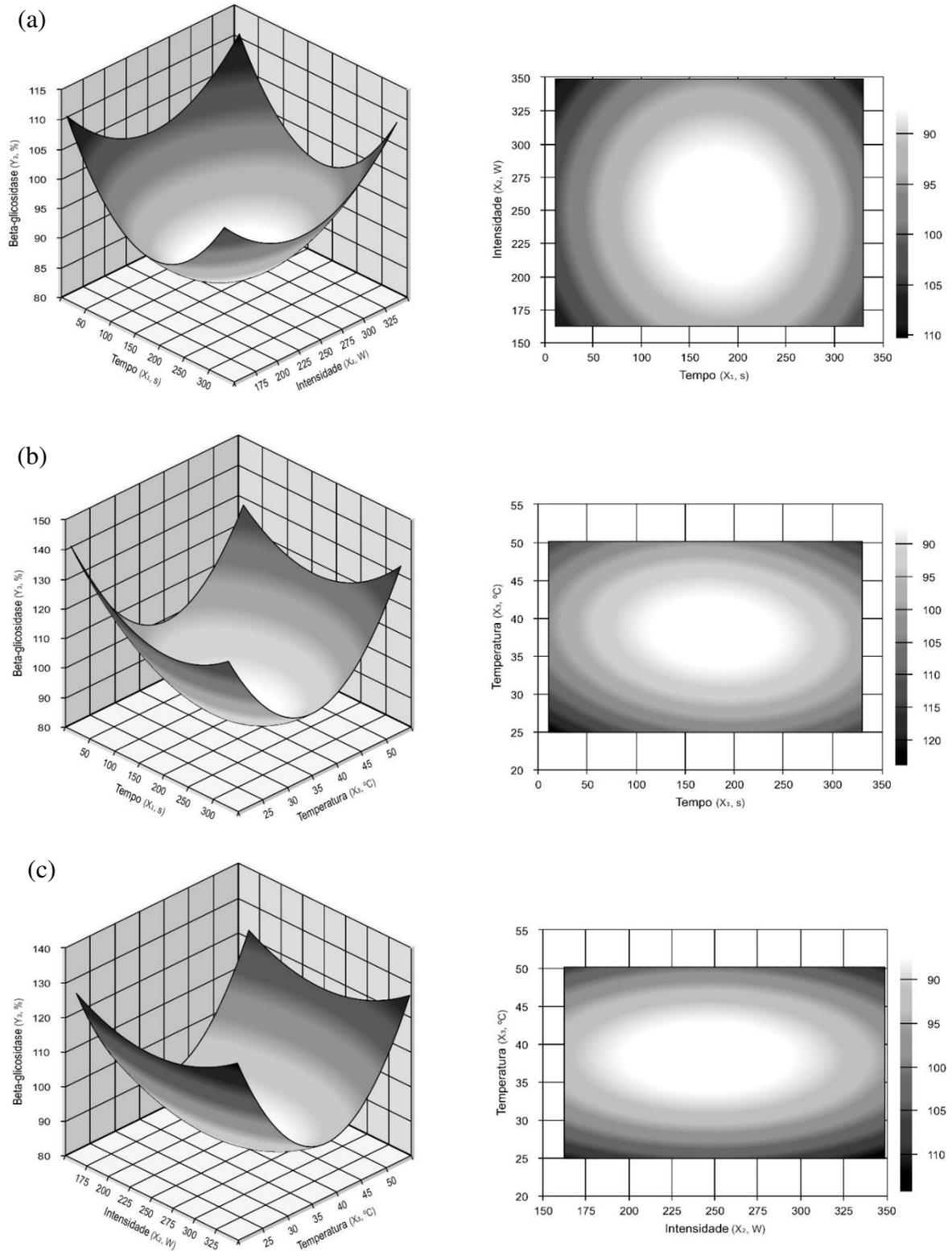
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calculado}	p-valor
Regressão	315,39	2	157,69	13,23	0,0004
Resíduos	166,83	14	11,91		
Total	482,22	16			

Porcentagem de variação explicada (R^2)=65,40% ; $F_{0,1;2;14}=3,74$

Para o coquetel enzimático, o termo quadrático da temperatura e interação dos termos da intensidade e da temperatura foram estatisticamente significativos, porém, além do $F_{calculado}$ atender o pré-requisito para a construção do modelo, o coeficiente de relação apresentou um valor baixo. Entretanto, pode-se inferir que tempos nas condições intermediárias das faixas testadas – 150 a 200s – e temperaturas de 35 a 40°C levam a maiores atividades do coquetel enzimático. Quando comparadas, a enzima Celluclast 1,5L apresenta menor atividade enzimática de β -glicosidase que o coquetel enzimático. Segundo Rodrigues et al., (2015) o conteúdo de β -glicosidases na enzima comercial Celluclast 1,5L é reduzido.

Quanto ao conteúdo de proteínas, os ensaios que apresentaram os melhores resultados e que foram testados quanto a sua estabilidade, continham as maiores concentrações de proteína. Isso pode demonstrar que nos outros ensaios houve degradação da estrutura proteica, proveniente de alta absorção da energia ultrassônica e provável rompimento de ligações estruturais na molécula enzimática.

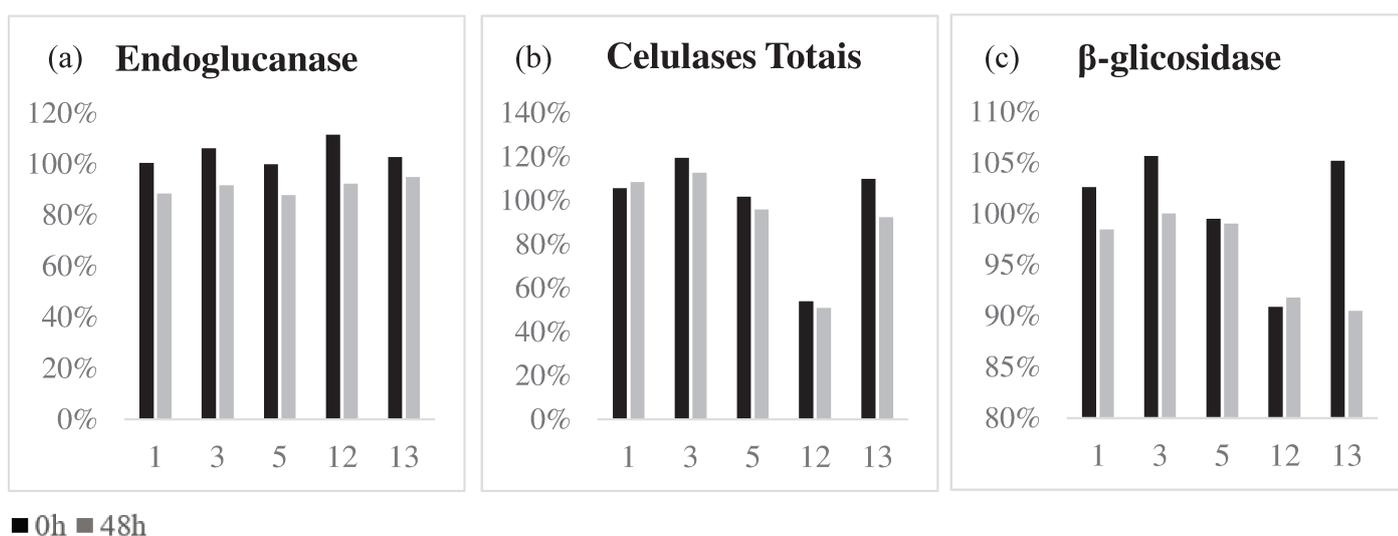
Figura 2-2. Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática de β -glicosidase de Celluclast 1,5L em função de (a) Tempo e intensidade (b) Tempo e temperatura (c) Intensidade e Temperatura de aplicação do ultrassom.



Os ensaios que apresentaram aumento da atividade enzimática em relação ao controle (atividades relativas maiores que 100%) para as três atividades enzimáticas testadas foram considerados ensaios com resultados satisfatórios para compor o teste de estabilidade. Com auxílio dos resultados dos planejamentos experimentais e análises das superfícies de resposta (Fig. 2-1 e 2-2) para a enzima Celluclast 1,5L, os ensaios 1,3,5 e 13 foram escolhidos para o teste de estabilidade, além do ensaio 12 que apresentou incremento significativo na atividade enzimática de endoglucanase (CMCase). A Figura 2-3 apresenta os resultados de estabilidade para a enzima Celluclast 1,5L.

Em relação ao coquetel Cellic Ctec2, as condições testadas para a estabilidade foram os ensaios 4,8, 12 e 15. Foram identificados os mesmos padrões de comportamento que para a enzima Celluclast, com redução da atividade após 48h.

Figura 2-3. Testes de estabilidade dos ensaios de Celluclast 1,5L submetidos a tratamento com ultrassom.



De modo geral, as três enzimas avaliadas apresentaram redução da atividade enzimática após 48h de armazenamento. As perdas de atividade após 48h foram mais evidentes para a enzima endoglucanase, demonstrando que o tratamento com ultrassom não foi capaz de manter as possíveis modificações positivas em sua estrutura que causavam o aumento da atividade enzimática após o tratamento com a sonda ultrassônica. A imobilização das enzimas pode ser capaz de contornar esses problemas. De acordo com Wang et al. (2012), quando ultrassom de baixa frequência e intensidade (24 kHz e 15W) foi aplicado à enzima livre (celulase), houve perda da atividade enzimática após 15 min de tratamento. Porém quando imobilizadas, a atividade catalítica das enzimas foi incrementada quando aplicadas as mesmas condições.

O efeito negativo da intensidade do ultrassom indica que altas intensidades podem causar efeitos irreversíveis na estrutura enzimática, corroborando com o efeito nas respostas das atividades enzimáticas, uma vez que maior a desativação enzimática mais enzima é necessário para completar o processo de hidrólise (GASPAROTTO et al., 2015).

Para os ensaios de validação experimental do modelo comercial foram escolhidas 3 condições para cada uma das enzimas com base na análise das superfícies de resposta, dos modelos e dos efeitos das variáveis (Fig. 2-1 e 2-2 para Celluclast 1,5L), sendo essas condições apresentadas na Tabela 2-11. Os resultados para os ensaios de validação e as atividades relativas previstas pelos modelos (para as atividades que foram significativas) estão apresentadas nas Tabelas 2-12 e 2-13 para as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2, respectivamente.

Tabela 2-11. Condições de validação para as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2.

Ensaio	Tempo(s)	Intensidade (W)	Temperatura (°C)
Celluclast 1,5L			
1V₁	75	320	30,0
2V₁	170	320	37,5
3V₁	170	240	25,0
Cellic CTec2			
1V₂	170	200	30,0
2V₂	170	275	37,5
3V₂	170	320	37,5

O Controle das atividades enzimáticas relativas para a enzima Celluclast 1,5L - sem sonicação - apresentou concentração de proteínas de 161,39 mg.mL⁻¹, atividade de CMCase de 68,44 U.mL⁻¹, atividade enzimática de FPase de 29,89 U.mL⁻¹ e 15,76 U.mL⁻¹ para atividade de β-glicosidase. Todos os ensaios apresentaram resultados satisfatórios para a endoglucanase e celulases totais (maiores que 100%), entretanto para a atividade de β-glicosidase somente o ensaio 3V₁ (170s, 240W, 25°C) apresentou o mesmo comportamento. Portanto essas condições foram consideradas ótimas para a faixa das condições em estudo.

É interessante notar que a condição 3V₁ - considerada otimizada – foi a única onde não houve redução da concentração proteica em relação ao controle sem sonicação. Em relação ao ensaio 12, onde a intensidade era o máximo valor aplicado (350W), foi registrado perda de atividade de FPase. Enquanto que no ensaio de validação 2V₁ nas mesmas condições de temperatura e tempo do ensaio 12 (37,5°C e 170s), porém com menor intensidade, houve aumento da atividade. Nesse caso, a redução de 30 W na intensidade da sonda ultrassônica foi

responsável pelo aumento da atividade. Foi também reportado por Nguyen e Le (2013) que quando aplicadas condições mais altas de intensidade e maior tempo de tratamento em seu estudo, a atividade celulolítica reduziu drasticamente.

Tabela 2-12. Resultados para atividades enzimáticas relativas nas condições de validação dos modelos experimentais para a enzima Celluclast 1,5L.

		Atividade (U.mL⁻¹)	Atividade Relativa (%)	Atividade predita (%)
Endoglucanase	1V₁	71,97±2,5 ^b	106,00	107,87
	2V₁	68,50±0,9 ^c	100,00	105,42
	3V₁	77,31±1,8 ^a	113,00	109,53
Celulases Totais	1V₁	40,84±0,73 ^b	130%	-
	2V₁	32,44±0,99 ^c	107%	-
	3V₁	47,49±0,38 ^a	157%	-
β-glicosidase	1V₁	15,34±0,01 ^b	97%	100,28
	2V₁	15,48±0,02 ^{a,b}	98%	89,16
	3V₁	16,08±0,02 ^a	102%	106,47
Concentração de proteínas (mg.mL⁻¹)				
Proteínas	1V₁		129,65±5,12 ^b	
	2V₁		117,59±4,85 ^c	
	3V₁		161,36±3,95 ^a	

Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05)

(-) Não foi ajustado modelo experimental para Celulases Totais (FPase)

O Controle das atividades enzimáticas relativas para o coquetel Cellic CTec2 - sem sonicação - apresentou concentração de proteínas de 214,2 mg.mL⁻¹, atividade de CMCase de 214,05 U.mL⁻¹, atividade enzimática de FPase de 65,04 U.mL⁻¹ e 17,74 U.mL⁻¹ para atividade de β-glicosidase. Para o coquetel enzimático, a condição de validação que apresentou os melhores resultados combinados para as enzimas foi o ensaio 3, de tempo de 170s, intensidade de 320W e temperatura de 37,5°C. Apesar da atividade das celulases totais (FPase) não apresentar incremento, foi superior aos outros dois ensaios.

No estudo realizado por Nguyen e Le (2013), onde foram estudados os efeitos do ultrassom na atividade celulolítica do complexo celulase, a enzima foi diluída em tampão citrato e a atividade catalítica foi determinada frente a substratos solúveis e insolúveis na presença e

ausência do tratamento com ultrassom. Os resultados apresentados indicam que mudanças na intensidade e no tempo de sonicação afetaram significativamente a atividade enzimática.

Tabela 2-13. Resultados para atividades enzimáticas relativas nas condições de validação dos modelos experimentais para a enzima Cellic CTec2.

		Atividade (U.mL⁻¹)	Atividade Relativa (%)
Endoglucanase	1V₂	190,88±0,5 ^c	89
	2V₂	197,31±1,9 ^b	92
	3V₂	229,48±1,8 ^a	107
Celulases Totais	1V₂	44,89±0,6 ^b	69
	2V₂	44,89±0,6 ^b	69
	3V₂	50,09±1,5 ^a	77
β-glicosidase	1V₂	18,62±0,75 ^a	105
	2V₂	19,50±0,5 ^a	110
	3V₂	19,86±0,5 ^a	112
Concentração de proteínas (mg.mL⁻¹)			
Proteínas	1V₂	154,43±2,5 ^b	
	2V₂	121,75±1,64 ^c	
	3V₂	204,02±1,7 ^a	

Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05)

A atividade celulolítica foi incrementada quando a intensidade ultrassônica foi aumentada de 0 a 6 W.mL⁻¹ e o tempo prolongado de 0 a 80 s, em estudo realizado por Nguyen e Le (2013). Isso ocorreu devido a pequenas mudanças na estrutura espacial das moléculas enzimáticas, que foi suportado pela formação do complexo enzima-substrato e que aumentou a adsorção de celulase na celulose insolúvel. Nesse mesmo estudo, quando a solução de celulase foi sonicada por 80 segundos com intensidade ultrassônica de 6 W.mL⁻¹, sua atividade catalítica foi incrementada em 18,7% frente ao substrato CMC e 39,4% frente ao papel filtro. Os resultados encontrados no presente trabalho apresentam condição otimizadas com menor aumento frente ao CMC (13%) e maior aumento da atividade enzimática de papel filtro. As condições otimizadas de 170s e 240W a 25°C são mais altas do que os autores encontraram. As diferenças entre os trabalhos para a mesma enzima comercial podem estar relacionadas à influência da temperatura, significativa de acordo com os planejamentos experimentais, não avaliada pelos autores.

De acordo com Szabó e Csiszár (2013), a preparação comercial Celluclast 1,5L contém baixas concentrações de β -glicosidase e é esperada que a reação heterogênea é esperada que seja mais pronunciada que a reação homogênea. Comparado com o presente trabalho, pode-se observar que para a enzima comercial (Celluclast), o aumento da intensidade levou ao aumento da atividade relativa de endoglucanases, porém a atividade de celulasas não foi expressiva como a apresentada pelo coquetel enzimático. Dessa maneira, a atividade de β -glicosidases apresentou menor média para Celluclast do que para o coquetel Cellic CTec2.

Subhedar e Gogate (2014) estudaram o efeito da aplicação de ultrassom de baixa intensidade (20 kHz) na atividade enzimática de celulasas com alto teor de endoglucanases. O estudo conclui que foi estabelecido que esse tipo de tratamento resultou em efeito positivo à atividade enzimática. A máxima atividade encontrada foi observada na condição de 17,33 W.cm⁻² de intensidade por 30 minutos, o qual superou em 25% a atividade enzimática do controle. Quanto aos parâmetros termodinâmicos, foi registrada significativa redução após o tratamento com ultrassom: a energia de ativação foi reduzida em 64,7%, o que pode levar ao aumento na taxa da reação enzimática. Os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{máx}$ foram maiores quando comparados com a enzima sem tratamento, além de que a análise de espectro de fluorescência refletiu que o tratamento ultrassônico incrementou o número de triptofanos na superfície molecular. A análise de dicroísmo circular estabeleceu a estrutura molecular da celulase indicando mudanças favoráveis em termos de composição de α -hélice, β -folhas e estruturas aleatórias (*random coils*). Foi observado redução no conteúdo de α -hélice, que podem tornar a enzima mais uniforme e flexível devido às alterações na pressão e turbulência.

Wang e colaboradores (2012) exploraram o mecanismo de impacto do ultrassom na atividade da celulase livre e imobilizada. Os resultados indicaram que a maior atividade enzimática (aumento de 18,17% em relação à enzima não tratada) foi obtida quando a enzima livre foi tratada com ultrassom de baixa intensidade de 15 W, 24 kHz por 10 min. O espectro de fluorescência e de dicroísmo circular revelou que o tratamento com ultrassom aumentou o número de moléculas de triptofano na superfície da celulase, com certa deformação na estrutura α -hélice.

Esses resultados demonstram que os estudos das condições adequadas de aplicação de ultrassom geram incremento da atividade enzimática. As diferenças encontradas entre os parâmetros utilizados nos estudos relatados pela literatura e o presente trabalho sugerem que as interações entre as variáveis têm papel importante nas modificações estruturais da enzima.

2.3.2 Efeito da Aplicação de Ultrassom sobre a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar

Com o intuito de avaliar a possibilidade de aumentar o grau de hidrólise e liberação de açúcares redutores foi testado a aplicação de ultrassom em um sistema constituído por enzima (*loading* de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹) e bagaço de cana-de-açúcar (concentração de 2% em Tampão Acetato de Sódio 0,2M pH 4,8). A composição do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizado se encontra na Tabela 2-14, sendo os dados utilizados para o cálculo dos rendimentos teóricos de hidrólise.

Tabela 2-14. Composição centesimal do bagaço de cana-de-açúcar

Componente	Composição (%)
Celulose	45,02±0,15
Hemicelulose	26,63±0,56
Lignina	23,08±0,62
Cinzas	3,5±0,31

*Resultados reportados por Ávila et. al, (2017) (No prelo)

A matriz do planejamento experimental realizado para as celulasas comerciais foi aplicada para o sistema composto de bagaço de cana-de-açúcar e enzimas com objetivo de aumentar a liberação de açúcares redutores e identificar comportamentos diferentes de ambas as enzimas utilizadas. Os resultados experimentais para a enzima Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 do planejamento experimental com bagaço de cana-de-açúcar se encontram na Tabela 2-15.

Para a concentração de açúcares liberados relativo ao controle as respostas ficaram em uma faixa de 82,60% (Ensaio 14) a 121,53% (Ensaio 2) para a enzima Celluclast 1,5L, enquanto que a concentração variou de 141,22% (Ensaio 12) a 195,39% (Ensaio 1) para o coquetel Cellic CTec2. Os pontos centrais (Ensaio 15 a 17) apresentaram pequena variação entre si, indicando boa repetibilidade do processo.

Foram realizados os mesmos 17 ensaios para o bagaço de cana-de-açúcar com tratamento ultrassônico, porém na ausência do *loading* enzimático. Não houve liberação de açúcares redutores, indicando que os dados apresentados resultam da hidrólise enzimática.

Tabela 2-15. Resultados experimentais para ambos planejamentos experimentais empregando as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 e bagaço de cana-de-açúcar

Ensaio	X1 (s)	X2 (W)	X3 (°C)	Açúcar Redutor (%)	
				Celluclast 1,5L	Cellic CTec2
1	75,0	200,0	30,0	104,62	195,39
2	265,0	200,0	30,0	121,53	185,81
3	75,0	311,0	30,0	98,08	157,60
4	265,0	311,0	30,0	106,05	174,90
5	75,0	200,0	45,0	90,57	152,75
6	265,0	200,0	45,0	111,36	143,30
7	75,0	311,0	45,0	99,08	162,13
8	265,0	311,0	45,0	98,36	146,57
9	10,0	255,5	37,5	90,72	145,68
10	330,0	255,5	37,5	110,20	142,56
11	170,0	160,0	37,5	112,58	163,09
12	170,0	350,0	37,5	91,83	141,22
13	170,0	255,5	25,0	110,07	158,36
14	170,0	255,5	50,0	82,60	154,15
15	170,0	255,5	37,5	113,3	159,20
16	170,0	255,5	37,5	112,6	160,57
17	170,0	255,5	37,5	113,7	159,74

X1-Tempo (s), X2- Intensidade (W), X3- Temperatura (°C)

Para a resposta de liberação de açúcares redutores, a média da concentração relativa considerando os 17 ensaios foi de 159%, indicando assim uma boa performance da hidrólise enzimática por parte do coquetel Cellic Ctec2. Esse resultado demonstra que a utilização da enzima Cellic CTec2 sob sonicação para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi mais efetiva que a Celluclast significativamente ($p < 0,05$), que apresentou média de 112%. De maneira geral, espera-se que o coquetel enzimático seja mais eficaz na liberação de açúcares que somente a celulase comercial, por possuir enzimas acessórias que estão ausentes na Celluclast 1,5L.

A Tabela 2-16 apresenta os coeficientes de regressão, os p-valores, os coeficientes de correlação (R^2) e os valores de F calculados e tabelados para as variáveis dependentes de ambos planejamentos experimentais (Celluclast e Cellic CTec2) em relação à concentração de açúcares redutores.

A resposta de maior interesse no planejamento experimental de hidrólise enzimática sob aplicação de ultrassom é a liberação de açúcares redutores. Essa variável dependente apresentou coeficiente de correlação de 89,90% , para o modelo reparametrizado, e a média da concentração relativa de açúcares redutores foi de 112,89% para a enzima Celluclast 1,5L. Com exceção das interações entre tempo-temperatura e intensidade-temperatura, todos os termos foram significativos, e estão incluídos no modelo preditivo da Equação 2-7, onde X_1 =tempo (s), X_2 =intensidade (W) e X_3 =temperatura (°C).

$$\text{Açúcares redutores (\%)} = 112,89 + 5,69 X_1 - 3,43 X_1^2 - 4,50 X_2 - 2,81 X_2^2 - 5,65 X_3 - 4,88 X_3^2 - 3,81 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 2-7})$$

Tabela 2-16. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para as respostas de açúcares redutores para ambos planejamentos experimentais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2).

Fatores	Celluclast 1,5L		Cellic CTec2	
	Coeficiente de Regressão	p - valor	Coeficiente de Regressão	p - valor
Média	112,887	0,000	158,902	0,000
(1) Tempo (L)	5,690	0,005	-1,650	0,672
Tempo (Q)	-3,425	0,060	-2,336	0,588
(2) Intensidade (L)	-4,496	0,014	-5,333	0,196
Intensidade (Q)	-2,808	0,109	0,505	0,906
(3) Temperatura	-5,646	0,005	-8,496	0,057
Temperatura (Q)	-4,884	0,015	1,955	0,649
(1L)·(2L)	-3,806	0,074	2,596	0,611
(1L)·(3L)	-0,601	0,750	-4,091	0,429
(2L)·(3L)	2,191	0,266	7,669	0,160
R ²	87,64%		51,89%	
F _{calculado}	9,11		4,673	
F _{tabelado}	2,51		3,07	

Em negrito, fatores estatisticamente significativos ($p < 0,10$)

Legenda: termos lineares (L); termos quadráticos (Q)

$F_{0,1;7;9}=2,51$; $F_{0,1;1;15}=2,51$

A superfície de resposta para a enzima Celluclast 1,5L apresentada na Figura 2-3 para a concentração de açúcares redutores indica que tempos nos níveis superiores (de 170 a 330s), temperaturas de 27,5° a 37,5°C, e intensidades de 160 a 255 W são as condições que propiciaram maior liberação de açúcares redutores. O ensaio 2 (30°C, 200W e 265s) apresentou maior concentração de açúcares redutores. Pela análise desse ensaio em HPLC, foi encontrada concentração de 2,660 g.L⁻¹ de glicose, além de 0,495 g.L⁻¹ de celobiose e 0,140 g.L⁻¹ de xilose, em relação ao controle que apresentou 1,998 g.L⁻¹ de glicose, 0,278 g.L⁻¹ de celobiose e 0,183 g.L⁻¹ para xilose. Para esse ensaio, o rendimento de hidrólise em celulose e hemicelulose, respectivamente, foi de 31,81% e 2,18%.

Foram realizados 5 ensaios de validação da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar por Celluclast 1,5L. As condições escolhidas de acordo com a análise dos resultados dos planejamentos experimentais se encontram na Tabela 2-17, bem como os resultados para a concentração de açúcares redutores.

Tabela 2-17. Condições de validação para hidrólise enzimática de bagaço com Celluclast 1,5L

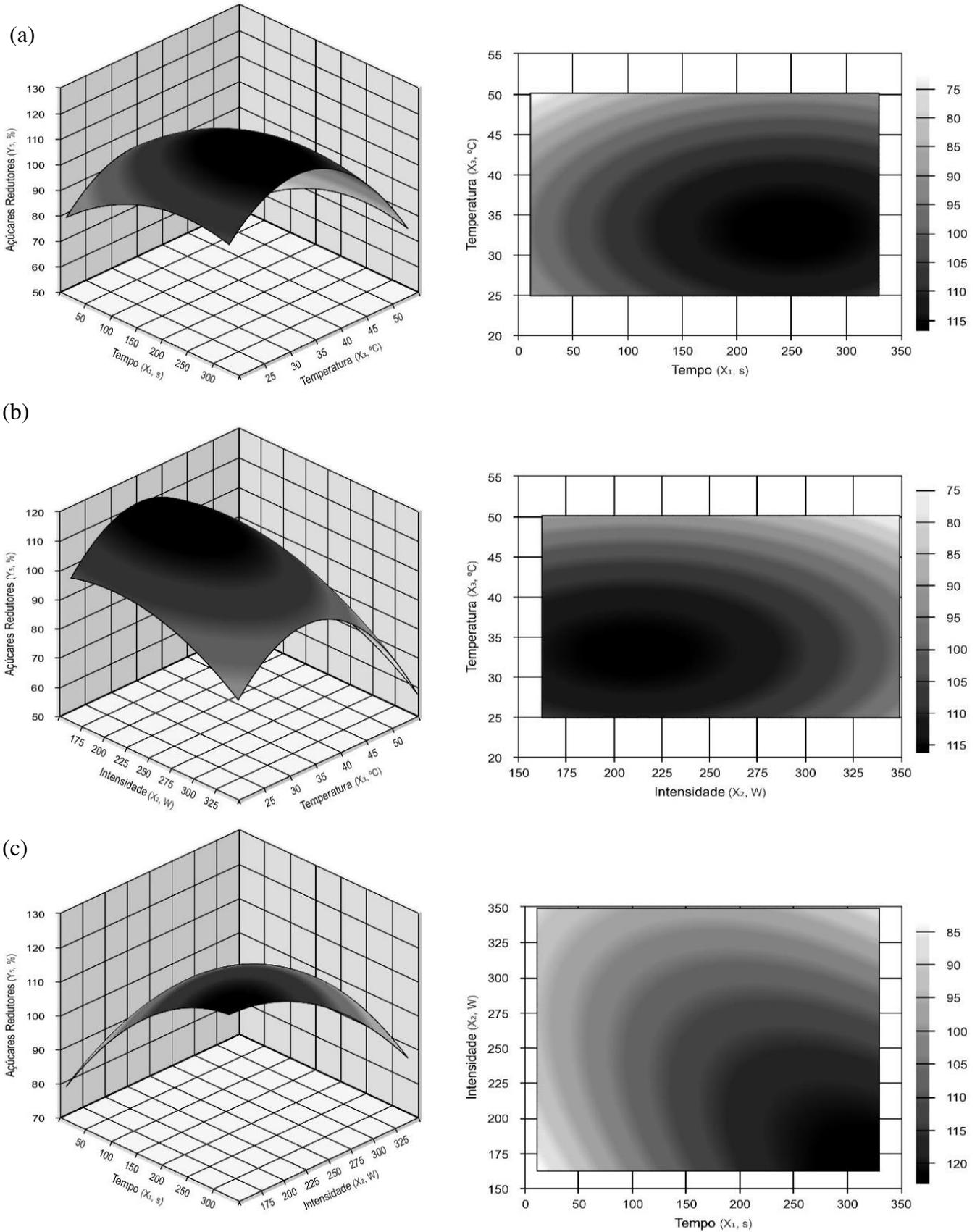
Ensaios	Tempo (s)	Intensidade (W)	Temperatura (°C)	Açúcares Redutores (%)
1V	330,0	160,0	25,0	160,56±0,78 ^c
2V	330,0	200,0	25,0	189,37±2,57 ^a
3V	330,0	160,0	30,0	172,48±1,32 ^b
4V	170,0	160,0	25,0	171,57±2,95 ^b
5V	75,0	240,0	30,0	142,61±0,88 ^d

Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05)

As condições de validação apresentaram bons resultados em relação ao controle e a melhor condição (estatisticamente significativa, p<0,05) foi considerada a aplicação de ultrassom com intensidade de 200W a 25°C por 330s para a liberação dos açúcares prontamente assimiláveis, com rendimento teórico de hidrólise em celulose de 45% para a enzima Celluclast 1,5L.

Já em relação ao coquetel enzimático Cellic CTec2 a condição de validação testada foi 75s, 200W e 30°C (Ensaio 1) e o resultado obtido foi de 191,81% de concentração de açúcares redutores relativos ao ensaio controle. Nessas condições, o rendimento teórico em celulose foi de 66,31% e de xilose 7,01%.

Figura 2-4. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de açúcares redutores liberados pela enzima Celluclast 1,5L em função de (a) Tempo e temperatura (b) Intensidade e Temperatura (c) Tempo e intensidade de aplicação do ultrassom



A reação catalisada por enzimas de um substrato celulósico sólido é uma reação heterogênea. Em sistemas celulolíticos onde se encontram os três principais tipos de atividades enzimáticas, a reação pode ser simplificada em duas etapas. A primeira etapa é a reação heterogênea entre o substrato sólido e a solução enzimática. Nessa etapa taxa-limitante, a interação sinérgica entre a atuação de exo e endoglucanases leva a geração de oligossacarídeos solúveis e celobiose. A segunda etapa é uma reação homogênea de hidrólise dos produtos à glicose pela ação da β -glicosidase. Uma vez que a enzima comercial Celluclast 1,5L contém baixo conteúdo de β -glicosidase, a reação heterogênea é mais pronunciada (SZABÓ; CSISZÁR, 2013).

Nesse estudo, as atividades enzimáticas para o ensaio de hidrólise enzimática da Celluclast 1,5L de celulasas totais e β -glicosidase, não apresentou aumento de atividade, mas sim a endoglucanase responsável pela reação heterogênea. Apesar disso, os resultados de liberação de açúcares fermentescíveis foram positivos. Esse resultado colabora com o estudo de Szábo and Csiszár (2013), onde demonstraram que apesar da sonicação reduzir a atividade enzimática da celulase, o resultado da hidrólise catalisada pela enzima foi positivo. Os autores concluíram que o efeito vantajoso da aplicação do ultrassom na reação heterogênea celulose-celulase supera os efeitos indesejados do ultrassom na modificação da enzima.

Gasparotto et al. (2015) reportaram que o efeito da intensidade do ultrassom na faixa de teste (20 a 40% de 300 W.cm^{-2}) foi negativo, porém não significativo e apesar disso afetou negativamente a eficiência da hidrólise, uma vez que a enzima produzida pode haver sido desnaturada sob altos poderes de sonicações e a hidrólise não ultrapassou $31,3 \text{ g}_{\text{açúcar}} \cdot \text{kg}_{\text{bagaco}}^{-1}$. Em comparação a esse trabalho, com o coquetel enzimático foi obtido uma hidrólise 10 vezes maior para o ensaio 1, onde a concentração de açúcares liberados foi $6,25 \text{ g.L}^{-1}$. O grupo de pesquisa verificou ainda que a atividade de enzimas hidrolíticas aumentaram sob tratamento com ultrassom indireto – onde há menor poder ultrassônico dissipado no meio de reação – em banho ultrassônico com intensidade de 136W (BENZAZZI et al., 2013; LEAES et al., 2013; SILVA et al., 2015). Entretanto, diferente do trabalho dos autores onde a aplicação indireta de ultrassom foi testada e com resultados melhores de rendimentos de hidrólise que a sonicação direta, no presente trabalho ambas enzimas comerciais apresentaram alta concentração de açúcares redutores liberados com intensidade de 200W. A microturbulência gera um fluxo de líquido através da matriz de biomassa que impulsiona a remoção de unidades monossacarídeos formados e liberados pela hidrólise, enquanto as colisões interpartículas – propiciadas pela cavitação transiente – causam aquecimento

localizado que impulsiona a cinética de hidrólise (SINGH et al., 2014). Dessa maneira, a sonicação direta pode trazer vantagens na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.

Em relação a hidrólise, poucos estudos estão investigando a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos assistida com ultrassom. Essa tecnologia é mais utilizada para o pré-tratamento da biomassa. Alguns autores relatam os efeitos físicos e químicos do ultrassom e do fenômeno de cavitação na hidrólise e pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Estudos revelaram que ambos efeitos físicos e químicos do ultrassom e cavitação contribuem para a delignificação. Os efeitos físicos – microturbulência e ondas de choque – contribuem para o aumento da despolimerização da lignina através de hidrólise. O efeito químico da cavitação transiente contribui para a redução de grupamentos aromáticos na matriz de lignina por oxidação (SINGH et al., 2014).

Rodrigues et al. (2015) estudaram as enzimas Celluclast e Cellic CTec2 para sacarificação e fermentação de palha de trigo, partição sólido-líquido e potencial de reciclo das enzimas por lavagem alcali. A hidrólise/fermentação da palha de trigo e a adsorção, desorção e desativação das celulases utilizando Cellic e Celluclast misturadas com Novozyme 188. Foi investigado a distribuição de enzimas (celobiohidrolase I – Cel7A, endoglucanase I – Cel7B e β -glicosidase) das duas formulações entre o substrato residual e sobrenadante durante o curso da hidrólise enzimática e fermentação. Os autores alcançaram eficiência de hidrólise de 98% utilizando Cellic Ctec em um *loading* enzimático de 10 FPU.g⁻¹, enquanto a Celluclast apresentou conversão de 52% e 81%, sem e com suplementação de Novozyme 188. Também foi observado que a atividade do complexo enzimático foi reduzida ao longo do processo, e foi relacionado à maior deativação de Cel7A do que Cel7B e β -glicosidase.

As diferenças entre os trabalhos para a mesma enzima comercial podem estar relacionadas à influência da temperatura, uma vez que a interação entre variáveis pode ser significativa de acordo com os planejamentos experimentais do presente estudo, e que não é avaliada nos outros estudos.

Em relação ao tratamento com ondas ultrassônicas na enzima, é possível identificar condições diferentes para as melhores condições de tratamento. Isso se deve ao fato de que o ultrassom pode ter afetado a conformação do substrato além da enzima, tornando a conformação espacial da reação mais favorável à sua eficiência catalítica. De maneira geral foi possível observar que o tratamento com ultrassom por sonda ultrassônica, nas condições apropriadas, leva a resultados favoráveis de aumento de atividade enzimática além de propiciar aumento no grau de hidrólise do bagaço de-cana-de-açúcar.

2.4 CONCLUSÃO

A condição validada para aplicação de ultrassom na enzima comercial (Celluclast 1,5L) foi de tratamento durante 170s, com intensidade de 240W (30%) a 30°C de temperatura, onde os três tipos de atividades catalíticas de celulases foram incrementadas em 13,0%, 57,0% e 2,0% para endoglucanases (CMCase), celulases totais (FPase) e β -glicosidases, respectivamente. Já para a enzima Cellic CTec2 a condição validada foi tempo de 170s, intensidade de 320W e temperatura de 37,5°C.

Quanto aos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob aplicação de ultrassom, a enzima comercial Celluclast 1,5L apresentou menores concentrações de açúcares redutores liberados em relação ao coquetel enzimático Cellic CTec2 pelo planejamento experimental. Porém com a validação dos resultados, a condição otimizada de aplicação de ultrassom de intensidade de 200W a 25°C por 330s apresentou alta concentração (189%) com rendimento teórico de hidrólise de celulose de 45%. Apesar de nenhuma resposta apresentar modelou ou superfície de resposta para o coquetel enzimático Cellic CTec2, as condições de melhores resultados podem ser consideradas condições apropriadas para o aumento da concentração de açúcares redutores como: 75s, 200W, 30°C.

Em relação ao tratamento com ondas ultrassônicas na enzima, é possível identificar condições diferentes para as melhores condições de tratamento. Isso se deve ao fato de que o ultrassom pode ter afetado a conformação do substrato além da enzima, tornando a conformação espacial da reação mais favorável à sua eficiência catalítica. De maneira geral foi possível observar que o tratamento com ultrassom por sonda ultrassônica, nas condições apropriadas, leva a resultados favoráveis de aumento de atividade enzimática além de propiciar aumento no grau de hidrólise do bagaço de-cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, O. A. M.S. Tese, The University of Akron, Akron, OH. 1997

ÁVILA, P.F.; FORTE, M.B.S.; GOLDBECK, R.; Optimization of commercial mixture enzymes concentrations for xylooligosaccharides production by hydrolysis of sugarcane biomasses pretreated with ionic liquid or dilute acid. **Industrial Crops and Products**. 2017 (No Prelo).

BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4, p. 247–250, 2013.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 2015.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; FOLETTI, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 480–485, 2015.

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

GOUVEIA, E. C. et al. Validação de metodologia para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**. v. 32, n.6, p. 1500-1503, 2009.

HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SCHOEN, P.; LUKAS, J.; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D.; DUDGEON, D. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic **Biomass to Ethanol**. **Renewable Energy**, v. 303, n. May, p. 147, 2011.

LEAES, E. X.; LIMA, D.; MIKLASEVICIUS, L.; RAMON, A. P.; DAL PRÁ, V.; BASSACO, M. M.; TERRA, L. M.; MAZUTTI, M. A. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Biological chemistry**, p. 193 - 265, 1951.

MANDELS, M.; STERNBERG, D.; Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B.; Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains. **Journal of biotechnology**, v. 83, p. 177 -187, 2000.

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

NGUYEN, T. T. T.; LE, V. V. M. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 557–563, 2013.

O'DONNELL, C. P, TIWARI, B.K., BOURKE, P., CULLEN, P.J., et al. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 358–367, 2010.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251–256, 2012.

RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 70–77, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Design of Experiments and Process Optimization. 1st. ed. Campinas, CRC Press, (2014).

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298–306, 2009.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; SOARES, M. B. A.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, D.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Enzymatic hydrolysis of non-treated sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas with and without ultrasound assistance. **Renewable Energy**, v. 83, p. 674–679, 2015.

SINGH, S.; BHARADWAJA, S. T. P.; YADAV, P. K.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Mechanistic Investigation in Ultrasound-Assisted (Alkaline) Delignification of Parthenium hysterophorus Biomass. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 37, p. 14241–14252, 2014.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 108–114, 2014.

SZABÓ, O. E.; CSISZÁR, E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1483–1489, 2013.

WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 222–227, 2012.

3. CAPÍTULO 3

Influência do Tratamento com Dióxido de Carbono Supercrítico na Atividade Enzimática de Celulases Comerciais e na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar

Autores: Maria Augusta de Carvalho Silvello, Julian Martínez e Rosana Goldbeck

Artigo será submetido à revista *Journal of Supercritical Fluids*

RESUMO

O aperfeiçoamento das atividades enzimáticas representa uma grande oportunidade para a produção biotecnológica. O estudo da eficiência catalítica e parâmetros cinéticos das mesmas em diversos meios reacionais pode fornecer informações importantes para o incremento da estabilidade e atividade enzimática. A aplicação de fluidos supercríticos em complexos enzimáticos e em sistemas enzima-substrato pode fornecer incrementos na eficiência desses biocatalisadores, pelo aporte da redução da resistência à transferência de massa propiciado pelo fluido. O dióxido de carbono (CO₂) é um dos fluidos mais empregados em condições supercríticas por apresentar características vantajosas em relação à sua facilidade de recuperação e relativamente baixas condições de pressão e temperaturas críticas. O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos causados nas celulases comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) pela aplicação do tratamento com CO₂ supercrítico. Além de otimizar e maximizar a atividade enzimática pós tratamento com fluido supercrítico, esse estudo visou avaliar a influência desse tratamento na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Os efeitos do tempo de aplicação (60 a 180 min), pressão (100 a 300 bar) e temperatura da reação (40° a 60°C) foram avaliados pela estratégia de planejamento experimental em celulases comerciais. As mesmas condições do planejamento aplicados para as enzimas comerciais foram empregadas para o estudo da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (2 % m.v⁻¹) com uma carga enzimática de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹. Nos estudos empregando tratamento supercrítico, a enzima Celluclast 1,5L apresentou condição otimizada de temperatura do meio reacional de 40°C, pressão de 300 bar e tempo de aplicação de 180 min, levando ao aumento de 14,31% para atividade enzimática de celulases totais (FPase). Já para o coquetel Cellic CTec2 pequeno incremento na atividade enzimática de CMCase foi obtida na condição de 60 min, 300 bar e 40°C. De modo geral, a temperatura de 60°C teve efeito negativo tanto no tratamento supercrítico nas enzimas livres quanto na hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foi incrementada com o tratamento com CO₂ supercrítico em 73,63% e 32,49% na concentração de açúcares redutores para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2, respectivamente. O tratamento com CO₂ supercrítico resultou em incrementos de atividades enzimáticas do complexo celulolítico e aumento do grau de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

3.1 INTRODUÇÃO

Tecnologias de alta pressão, envolvendo fluidos supercríticos, oferecem a possibilidade de desenvolver novos processos e produtos de uma maneira sustentável, pela redução do consumo energético (KNEZ et al., 2014). Os fluidos supercríticos oferecem características atrativas ao processamento de alimentos e bioprodutos devido às suas propriedades que facilitam a transferência de massa: difusividade (similar a gases) e densidade (similares aos líquidos), além de possuírem baixa viscosidade e tensão superficial (BRUNNER, 2005).

Aproveitando-se dessas propriedades atrativas, os processos com fluidos supercríticos são vantajosos por apresentarem a possibilidade de trabalhar em baixas temperaturas com consumo de energia reduzido, podendo haver reciclo do solvente utilizado, prevenção de reações de oxidação e geração de produtos com alto grau de pureza. Por outro lado, ainda possuem um alto custo de investimento (WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010).

Os fluidos supercríticos são empregados, em escala comercial, em processos desenvolvidos para as indústrias farmacêuticas, de alimentos e têxteis, principalmente relacionados à extração de compostos (KNEZ et al., 2014). Enquanto a pesquisa continua a investigar suas habilidades, novas finalidades e aplicações para os fluidos supercríticos têm sido desenvolvidas, e nesse contexto, nos últimos anos, o dióxido de carbono supercrítico tem sido considerado para finalidades não extrativas (KIM; HONG, 2001). Dentre essas capacidades, tem sido reportado o efeito de delignificação aportado por esse tipo de tratamento em altas pressões, representando assim a aplicação de fluidos supercríticos para o pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas (SERNA; ALZATE; ALZATE, 2016).

Um dos fluidos supercríticos mais utilizados tanto na indústria quanto na pesquisa é o dióxido de carbono (CO_2). Esse composto tem a densidade próxima a de um líquido, baixa viscosidade e se difunde com um gás, característica que lhe garante excelentes qualidades como solvente não-aquoso. Destaca-se pela baixa toxicidade (solvente GRAS), não inflamável, recuperável, de baixo custo, inerte, de condições críticas relativamente seguras quando comparadas a outros solventes, tornando-se apropriado tanto para a extração de compostos voláteis e termolábeis quanto para a condução de reações biocatalisadas (BRUNNER, 2005).

Da literatura surgem estudos que afirmam que o tratamento das enzimas com fluidos sub ou supercríticos ajudam a incrementar a atividade enzimática (PARK et al., 2001; REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007; LEITGEB et al., 2013). Senyay-Oncel & Yesil-Celiktas

(2011) determinaram condições ótimas para o aumento da atividade enzimática de α -amilase sob tratamento com SC-CO₂ variando os parâmetros operacionais.

Quanto às enzimas celulolíticas, o estudo dos parâmetros operacionais como temperatura, tempo e pressão de trabalho adequados levou a aumentos da atividade enzimática, conforme descrito por Senyay-Oncel e Yesil-Celiktas (2015). Benazzi et al. (2013) estudaram o tratamento com SC-CO₂ combinado com tecnologia ultrassônica para incrementar a hidrólise enzimática de bagaço de cana, e concluíram que o presente arranjo de pré-tratamento da matéria-prima lignocelulósica a baixas temperaturas é eficiente e promissor sem fazer uso de condições drásticas ou solventes.

A utilização de CO₂ supercrítico como tratamento na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar não é relatada na literatura, uma vez que a aplicação de SC-CO₂ é realizada como pré-tratamento da biomassa ou separadamente na enzima.

Em face disto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do tratamento com CO₂ supercrítico na atividade enzimática de celulasas comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2). Além de otimizar e maximizar a atividade enzimática pós tratamento com fluido supercrítico, este projeto também visou avaliar a influência desse tratamento na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

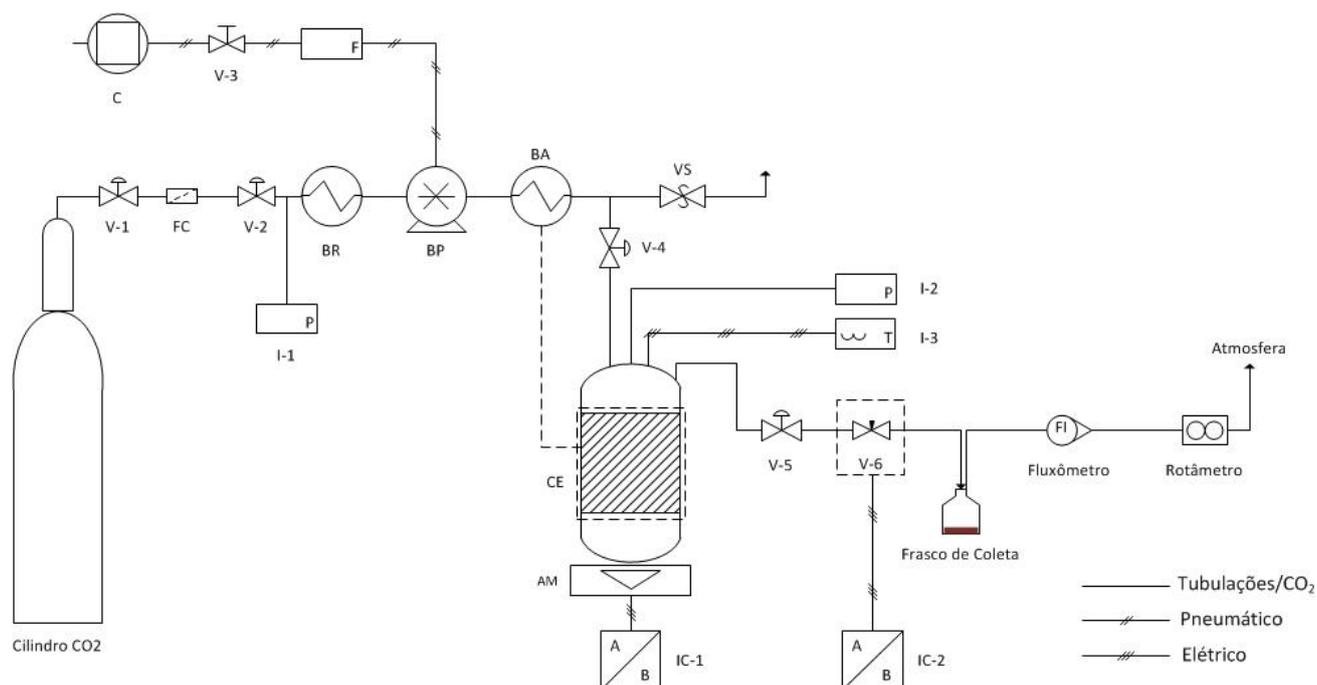
3.2.1 Aplicação de Dióxido de Carbono Supercrítico em Enzimas Comerciais

A fim de estudar o efeito do tratamento com fluidos supercríticos na atividade enzimática de celulasas foi adotada a estratégia do Planejamento Experimental (*Design of Experiments – DOE*) (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Planejamentos experimentais independentes foram aplicados para as celulasas comerciais Celluclast 1,5L[®] (Novozymes[®]) e Cellic CTec2[®] (Novozymes[®]). Determinadas as melhores condições para ambas as enzimas, foram estudadas as melhores condições para aumentar o grau de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar frente ao tratamento com dióxido de carbono supercrítico.

A unidade de reação química utilizando CO₂ supercrítico do Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA – UNICAMP) foi operada em modo batelada. O aparato consiste em uma bomba de CO₂ (Maximator M-111, Zorge/Alemanha), reservatório de solvente, um banho termostático de aquecimento (Marconi S.A., Campinas-SP, Brasil), um banho termostático de resfriamento (SOLAB SL152/18, Êxodo Científica, Hortolândia-SP,

Brasil), manômetros (Zurich, São Paulo – SP, Brasil), agitador magnético (IKA, RCT Basic, Staufen, Alemanha), termopares, válvulas de controle (Autoclave Engineers, Eire-PA, EUA), válvula micrométrica (Autoclave Engineers, Eire-PA, EUA), e um reator de 100 mL de aço inoxidável. A Figura 3-1 apresenta um diagrama esquemático da unidade de reação à alta pressão com agitação e controle de temperatura.

Figura 3-1. Esquema da unidade de reações químicas em meio supercrítico



V-1, V-2, V-3, V-4 e V-5 – Válvulas de bloqueio; V-6 – Válvula micrométrica; VS – Válvula de segurança ($P_{\max} = 450$ bar); C- Compressor; F-Filtro de ar comprimido; FC – Filtro de CO₂; BR – Banho de refrigeração; BP- Bomba pneumática (Booster); BA – Banho de aquecimento; I-1 e I-2 – Indicadores de pressão; I-3 Indicador de temperatura; IC-1 – Controlador e indicador do agitador magnético; IC-2 – Controlador e indicador de temperatura da válvula micrométrica; AM – Agitador magnético; CE – Célula de reação química com aquecimento.

O dióxido de carbono, com 99,0% de pureza (White Martins, Campinas/SP), estocado no reservatório é resfriado a -5°C ao passar pelo banho termostatizado. O CO₂ é liquefeito para que não chegue no estado de agregação gasoso na entrada da bomba pneumática. A bomba comprime o solvente até a pressão requerida, e o estado supercrítico é atingido através da pressão e por troca térmica de uma serpentina instalada dentro de um banho de aquecimento, regulado à temperatura desejada. A temperatura do processo é monitorada por termopares que se encontram em contato com a parede externa e na saída do solvente da célula de reação.

O planejamento experimental realizado foi um Delineamento Composto Central (DCC) com três variáveis independentes (2^3) mais três pontos centrais, totalizando 11 ensaios.

Foram testadas as variáveis tempo (60 a 180 min), pressão (100 a 300 bar) e temperatura (40 a 60°C).

Nestes experimentos, a enzima foi diluída (1:100) em Tampão Acetato de Sódio 0,2M pH 4,8 e submetida ao tratamento com o SC-CO₂ de acordo com a combinação de condições dispostas na matriz do planejamento experimental, para otimização e maximização das atividades enzimáticas frente ao tratamento. Para as celulases comerciais, as atividades enzimáticas foram quantificadas logo após os ensaios propostos pelos delineamentos experimentais.

3.2.2 Influência do Tratamento na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar sob Tratamento com CO₂ Supercrítico

As enzimas comerciais foram avaliadas quanto a sua capacidade de aumentar o grau de hidrólise de um substrato lignocelulósico - bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela empresa Raízen – Usina Costa e Pinto (Piracicaba, SP, Brasil). O bagaço pré-tratado pelo método de hidrólise a ácido diluído (H₂SO₄) 0,5% sob pressão foi caracterizado quanto a seus componentes químicos, segundo a metodologia descrita por Gouveia et al., (2009).

As celulases comerciais (Celluclast 1,5L[®] e Cellic CTec2[®]) foram adicionadas com um *loading* de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹ ao bagaço de cana-de-açúcar a uma concentração de 2% dissolvidos em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,8. Os sistemas enzima + substrato foram submetidos aos tratamentos com SC-CO₂ propostos pelo planejamento experimental. A matriz do DCC utilizado com fluido supercrítico e substrato lignocelulósico e os níveis das variáveis com seus valores reais são os mesmos apresentados anteriormente e foram testadas as variáveis tempo (60 a 180 min), pressão (100 a 300 bar) e temperatura (40 a 60°C).

Após os ensaios propostos pelo planejamento experimental, o sistema enzima + substrato lignocelulósico foi mantido a 50°C por 24h para completar o processo de hidrólise. O aumento no grau de hidrólise foi verificado pela diferença na concentração inicial e final (após 24 h) de açúcares redutores liberados, que foram quantificados conforme proposto por Miller (1959) e por cromatografia HPLC, descritas a seguir. Também foi realizado o mesmo planejamento sem enzima, para verificar possível liberação de açúcares somente pela reação com fluido supercrítico. A atividade da enzima sem tratamento foi quantificada e considerada controle, para o cálculo das atividades relativas.

3.2.3 Determinações Analíticas

As determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata e foram expressas em termos de atividade relativa ao controle, conforme a Equação 3-1.

$$\% \text{ Atividade Relativa} = \frac{\text{Atividade Enzimática dos Ensaios}}{\text{Atividade Enzimática do Controle}} * 100\% \quad (\text{Eq. 3-1})$$

3.2.3.1 Determinação da Atividade Enzimática da Endoglucanase (CMCase)

A atividade da enzima endoglucanase foi avaliada utilizando carboximetilcelulose (CMC) 1% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,8, como substrato, com uma razão enzima/substrato 1:1 (v.v⁻¹). A solução foi incubada por 10 min a 50°C (GHOSE, 1987). A quantidade de açúcares redutores foi quantificada de acordo com Miller (1959), utilizando o reagente ácido-3,5-dinitrosalisílico (DNS). Uma unidade de atividade da endoglucanase, também denominada CMCase, foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por minuto.

3.2.3.2 Determinação da Atividade de Celulases Totais (FPase)

A atividade de celulases totais foi determinada utilizando como substrato o papel filtro (Whatman nº1), de acordo com Mandels e Sternberg (1976). O sistema foi constituído de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,8 e papel de filtro (substrato) com uma razão substrato/enzima 1:2 (m.v⁻¹), e incubado por 60 min a 50°C. A quantidade de açúcares redutores liberados foi quantificada espectrofotometricamente pelo método descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade de celulases totais, também denominada FPase, foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por minuto a partir do papel filtro original.

3.2.3.3 Determinação da Atividade Enzimática da β-glucosidase

Para determinar a atividade da enzima β-glucosidase foi utilizado o método descrito por Afolabi (1997), utilizando uma solução de pNPG (*p*-nitrophenyl β-D-glucanopyranoside) 1 mg.mL⁻¹ como substrato em tampão acetato 0,2 M pH 4,8. O sistema foi constituído de uma razão enzima/substrato 1:1 (v.v⁻¹) e a solução foi incubada por 30 min a 50°C. Subsequentemente, foi adicionado carbonato de sódio à reação e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade de β-glucosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

3.2.3.4 Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A quantificação foi realizada através de regressão linear obtida pela curva padrão de glicose (0 a 1 mg.mL⁻¹). A concentração de açúcares redutores foi expressa em termos de concentração relativa (%) em relação a concentração de açúcares (g.L⁻¹) liberadas pelo controle positivo, conforme Equação 3-2.

$$\text{Concentração Relativa de AR (\%)} = \frac{\text{AR dos Ensaios}}{\text{AR do controle}} * 100\% \quad (\text{Eq. 3-2})$$

3.2.3.5 Determinação do Conteúdo de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* 0,5 mol.L⁻¹ em meio alcalino. A quantificação foi realizada através de correlação com curva padrão de albumina (0 a 2,5 mg mL⁻¹).

3.2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para quantificar a concentração de açúcares após os tratamentos com ultrassom nos sistemas com enzima e substratos, as alíquotas dos ensaios de cada planejamento experimental foram analisadas por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) em cromatógrafo Accela (Thermo Fisher Scientific, EUA) equipado com bomba de gradiente (Accela 600 Pump) e detector de índice de refração (RI detector Accela). A separação dos compostos foi obtida em coluna analítica de troca iônica Aminex HPX-87H a 35°C e solução de H₂SO₄ pH 2,6 como fase móvel, vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e tempo de corrida individual de 20 min. A concentração dos açúcares foi analisada através dos tempos de retenção, por comparação com curva de calibração utilizando padrões analíticos de açúcares e ácidos orgânicos – glicose, celobiose, xilose, arabinose e ácido acético.

Partindo das concentrações (g.L⁻¹) de açúcares liberados [glicose, celobiose, xilose e arabinose], da biomassa (g.L⁻¹) inicial de substrato utilizada e da fração de celulose e hemicelulose [*f*] no bagaço de cana-de-açúcar é possível o cálculo do rendimento teórico da hidrólise de celulose (Equação 3-3) e hemicelulose (Equação 3-4) (QIU; AITA; WALKER, 2012).

$$\text{Rendimento teórico de Celulose (\%)} = \frac{[\text{Glicose}] + 1,053[\text{Celobiose}]}{1,111 * f * [\text{Biomassa}]} * 100\% \quad (\text{Eq. 3-3})$$

$$\text{Rendimento teórico de Hemicelulose (\%)} = \frac{0,9[\text{Xilose}] + 0,9[\text{Celobiose}]}{1,111 * f * [\text{Biomassa}]} * 100\% \quad (\text{Eq. 3-4})$$

3.2.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos de atividade enzimática do planejamento experimental foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), ao nível de 90% de confiança, utilizando o *software* Protimiza Experimental Design (PROTIMIZA, 2018). Os ensaios de validação, realizados em triplicata, foram analisados de acordo com teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), utilizando o *software* STATISTICA® 8.0

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Tratamento Com Fluido Supercrítico em Celulase Comercial e Coquetel Enzimático

Planejamentos experimentais independentes foram conduzidos para o tratamento das enzimas com SC-CO₂ e, logo após, avaliadas as atividades enzimáticas relativas comparadas com o controle sem tratamento com o fluido supercrítico. Os resultados para as atividades enzimáticas foram expressos em atividade relativa (porcentagem) e se encontram na Tabela 3-1, onde X1 é o tempo (min), X2 é a pressão (bar) e X3 é a temperatura (°C).

De maneira geral, os pontos centrais (Ensaio 9 a 11) apresentaram pouca variação, indicando boa repetibilidade do planejamento experimental. Para a Celluclast, os resultados variaram de 86,74% (Ensaio 5) a 114,18% (Ensaio 9) para a endoglucanase (CMCase), de 14,99% (Ensaio 8) a 114,31% (Ensaio 4) para celulases totais (FPase) e de 88,41% a 105,47% (Ensaio 2) para β -glicosidases. Para o coquetel enzimático Cellic CTec2, a resposta de endoglucanase (CMCase) variou de 84,79% (Ensaio 6) a 103,37% (Ensaio 4), a atividade de celulases totais (FPase) de 48,96% (Ensaio 7) a 108,49% (Ensaio 4) e a β -glicosidase de 96,36% (Ensaio 9) a 103,58% (Ensaio 5).

A Tabela 3-2 apresenta os coeficientes de regressão para as atividades enzimáticas de CMCase, FPase e β -glicosidase para a Celluclast 1,5L. Para as enzimas CMCase e FPase, o coeficiente de correlação apresentou valores elevados, sendo a curvatura significativa para ambas as atividades enzimáticas relativas. Em relação à β -glicosidase, as respostas apresentaram pequena variação nas condições estudadas, logo apresentou um coeficiente de correlação baixo e nenhum dos parâmetros foi significativo. Entretanto, as médias das respostas – considerando os 11 ensaios – foi acima de 100%, indicando que apesar de não apresentar um modelo preditivo, é possível encontrar condições favoráveis ao incremento de suas atividades.

Tabela 3-1. Resultados dos planejamentos experimentais para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 com tratamento com SC-CO₂.

Ensaio	X1 (min)	X2 (bar)	X3 (°C)	Celluclast 1,5L [®]			Cellic CTec2 [®]		
				Endoglucanase (%)	Celulases Totais (%)	β-glicosidase (%)	Endoglucanase (%)	Celulases Totais (%)	β-glicosidase (%)
1	-1 (60)	-1 (100)	-1 (40)	109,32	92,73	101,63	95,82	93,46	100,75
2	+1 (180)	-1 (100)	-1 (40)	102,89	97,49	105,47	97,81	78,57	103,66
3	-1 (60)	+1 (300)	-1 (40)	115,56	92,46	101,33	103,60	94,83	100,58
4	+1 (180)	+1 (300)	-1 (40)	105,32	114,31	88,41	103,37	108,49	98,38
5	-1 (60)	-1 (100)	+1 (60)	86,74	21,95	104,01	103,29	57,15	103,58
6	+1 (180)	-1 (100)	+1 (60)	109,77	35,94	103,16	84,79	64,04	99,78
7	-1 (60)	+1 (300)	+1 (60)	97,22	19,14	102,47	103,35	48,96	101,56
8	+1 (180)	+1 (300)	+1 (60)	92,56	14,99	110,00	97,19	71,23	102,82
9	0 (120)	0 (200)	0 (50)	114,18	95,36	100,12	99,05	93,29	96,36
10	0 (120)	0 (200)	0 (50)	111,40	99,76	101,66	100,29	93,98	99,99
11	0 (120)	0 (200)	0 (50)	109,24	97,96	93,67	100,00	93,00	97,50

X1- tempo (min); X2 – pressão (bar), X3 – temperatura (°C)

Tabela 3-2. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para respostas do planejamento experimental de Celluclast 1,5L com SC-CO₂.

	Endoglucanase		Celulases Totais		β-glicosidase	
	Coeficiente de Regressão	p-valor	Coeficiente de Regressão	p-valor	Coeficiente de Regressão	p-valor
Média	102,42	0,000	61,13	0,000	102,06	0,000
Curvatura	9,18	0,082	36,57	0,005	-3,58	0,456
(1) Tempo	0,21	0,917	4,56	0,071	-0,30	0,900
(2) Pressão	0,24	0,905	-0,90	0,754	-1,51	0,540
(3) Temperatura	-5,85	0,052	-38,12	0,001	2,85	0,284
(1)·(2)	-3,94	0,043	-0,13	0,963	-1,05	0,665
(1)·(3)	4,38	0,101	-2,10	0,482	1,97	0,434
(2)·(3)	-1,93	0,378	-5,04	0,050	2,83	0,286
R ²	86,57%		98,90%		65,24%	
F _{calculado}	5,99		101,1		-	
F _{tabelado}	3,11		3,11		-	

Em negrito, fatores estatisticamente significativos após reparametrização (90% confiança)
 $F_{\text{tabelado}}(0,1;4;6)=3,11$

Além da curvatura, a temperatura, a interação tempo-temperatura e a interação tempo-pressão foram parâmetros considerados significativos. Os requisitos foram atendidos e foi possível a construção de modelo preditivo codificado e reparametrizado, apresentado na Equação 3-5, onde X_1 = tempo (min), X_2 =pressão (bar) e X_3 =temperatura (°C). A curva de contorno representada para a atividade relativa de CMC_{Case} se encontra na Figura 3-2.

$$\text{Atividade relativa CMC}_{\text{Case}} (\%) = 102,42 - 5,85X_3 - 3,938 X_1 \cdot X_2 + 4,38 X_1 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 3-5})$$

A temperatura apresenta efeito negativo para a atividade de CMC_{Case}, o mesmo acontece para a atividade de celulases totais (FPase), sendo estatisticamente significativa, porém com influência maior (coeficiente de regressão maior, Tabela 3-2). Para essa atividade enzimática, o termo da temperatura e a curvatura foram considerados significativos e a Equação 3-6 apresenta o modelo preditivo, onde X_1 = tempo (min), X_2 =pressão (bar) e X_3 =temperatura (°C) e a Figura 3-3 apresenta a curva de contorno para a atividade relativa de FPase.

$$\text{Atividade relativa FPase} (\%) = 61,12 - 4,55X_1 - 38,12 X_3 - 5,038X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 3-6})$$

Figura 3-2. Curva de contorno do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função do tempo e da temperatura para tratamento do SC-CO₂ para Celluclast 1,5L.

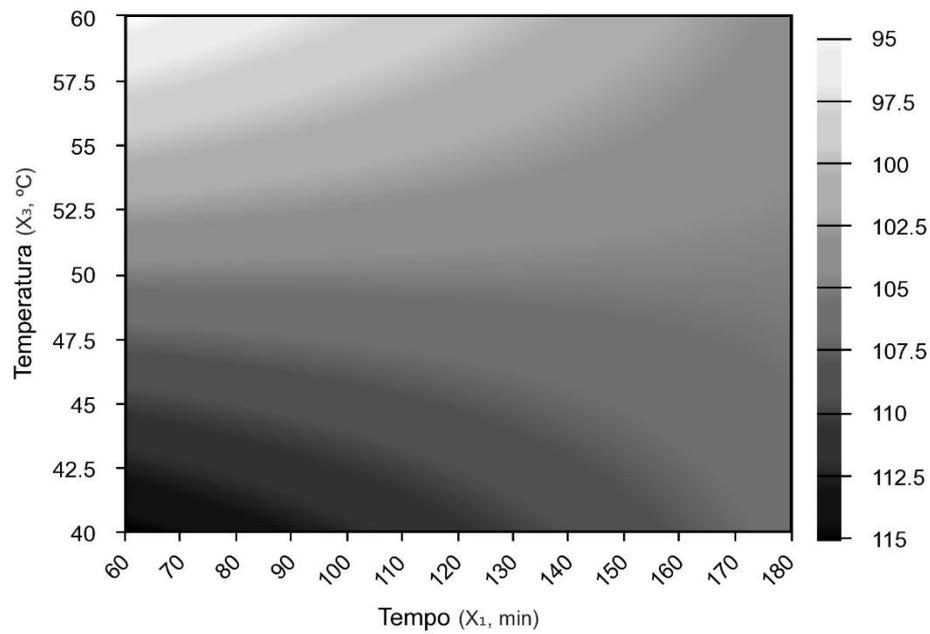
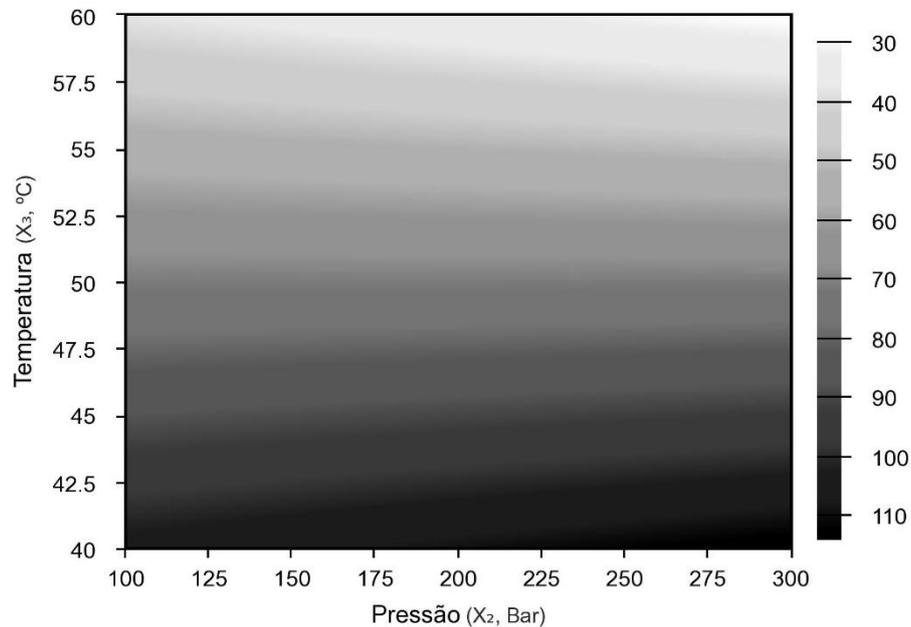


Figura 3-3. Curva de contorno do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função do tempo e da temperatura para tratamento do SC-CO₂ para Celluclast 1,5L.



Pela análise da Figura 3-2, observa-se que menores tempos e temperaturas levam ao incremento da atividade enzimática de CMCase, sendo mesmo comportamento observado para o parâmetro da temperatura na atividade enzimática de FPase. Conforme evidenciado pelo modelo e pela Figura 3-3, os valores de atividade dessa enzima (FPase) foram influenciados

negativamente pelo tratamento com SC-CO₂ de modo que a média das atividades é baixa, o aumento da temperatura também causou o decréscimo da eficiência catalítica, e o único ensaio que apresentou incremento da atividade foi o que atuou nas condições de 300 bar de pressão a 40°C por 180 min (42,78 U.mL⁻¹).

Efeito similar também foi descrito por Muratov e Kim (2002), onde foi observado atividade enzimática máxima de celulase *Trichoderma viride* foi alcançada a 50°C sob aplicação de CO₂ supercrítico e que um decréscimo na atividade enzimática foi obtido com o aumento da temperatura até 70°C. Muratov; Seo; Kim, (2005) também reportaram que complexo celulolítico de *T. longibrachiatum* não é termofílica e era inativada com o aumento da temperatura de aplicação do tratamento supercrítico.

Senyay-oncel e Yesil-celiktas (2015) testaram distintas temperaturas (28°, 54° e 80°C) para o aumento da atividade enzimática de celulase tratada com SC-CO₂ mantendo constantes as condições de 180 bar e tempo de 120 min de aplicação do tratamento. Os autores concluíram que um incremento de atividade foi determinado a 54°C (8,01 U.mL⁻¹) porém ao aumentar a temperatura a atividade foi reduzida a 5,74 U.mL⁻¹. Considerando a atividade da enzima sem tratamento (6,25 U.mL⁻¹), a temperatura de 54°C e pressão de 180 bar foram condições adequadas para incremento da atividade de endoglucanase e estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Pelos resultados obtidos, foi possível o cálculo dos coeficientes de regressão para o coquetel Cellic CTec2, demonstrados na Tabela 3-3 que apresenta a estimativa dos efeitos para as atividades enzimáticas de endoglucanase, celulases totais e β-glicosidase, além dos p-valores e coeficientes de correlação.

A ANOVA para as respostas da atividade enzimática de β-glicosidase apresentou um coeficiente de relação baixo e nenhuma das variáveis foi significativa. Pela análise dos resultados, nota-se que a variação foi pequena e que a atividade enzimática quase não foi alterada.

Para a atividade enzimática de endoglucanase, os termos do tempo, pressão e a interação tempo-temperatura foram considerados estatisticamente significativos (p-valores < 0,1) e o coeficiente de correlação obtido foi de 90,77%, após a reparametrização.

Tabela 3-3. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e $F_{\text{calculado}}$ por ANOVA para respostas do planejamento experimental de Cellic CTec2 com SC-CO₂.

	Endoglucanase		Celulases Totais		β-glicosidase	
	Coeficiente de Regressão	p-valor	Coeficiente de Regressão	p-valor	Coeficiente de Regressão	p-valor
Média	98,65	0,000	77,09	0,000	101,39	0,000
Curvatura	1,13	0,621	16,33	0,003	-3,44	0,142
(1) Tempo	-2,86	0,075	3,49	0,036	-0,23	0,817
(2) Pressão	3,22	0,057	3,79	0,029	-0,56	0,584
(3) Temperatura	-1,50	0,255	-16,75	0,000	0,55	0,589
(1)·(2)	1,26	0,322	5,49	0,011	-0,01	0,995
(1)·(3)	-3,30	0,054	3,80	0,029	-0,41	0,684
(2)·(3)	-0,11	0,924	-4,03	0,025	0,81	0,439
R ²	90,77%		99,38%		65,66%	
F _{calculado}	9,02		68,11		-	
F _{tabelado}	3,070		5,266		-	

Em negrito, fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

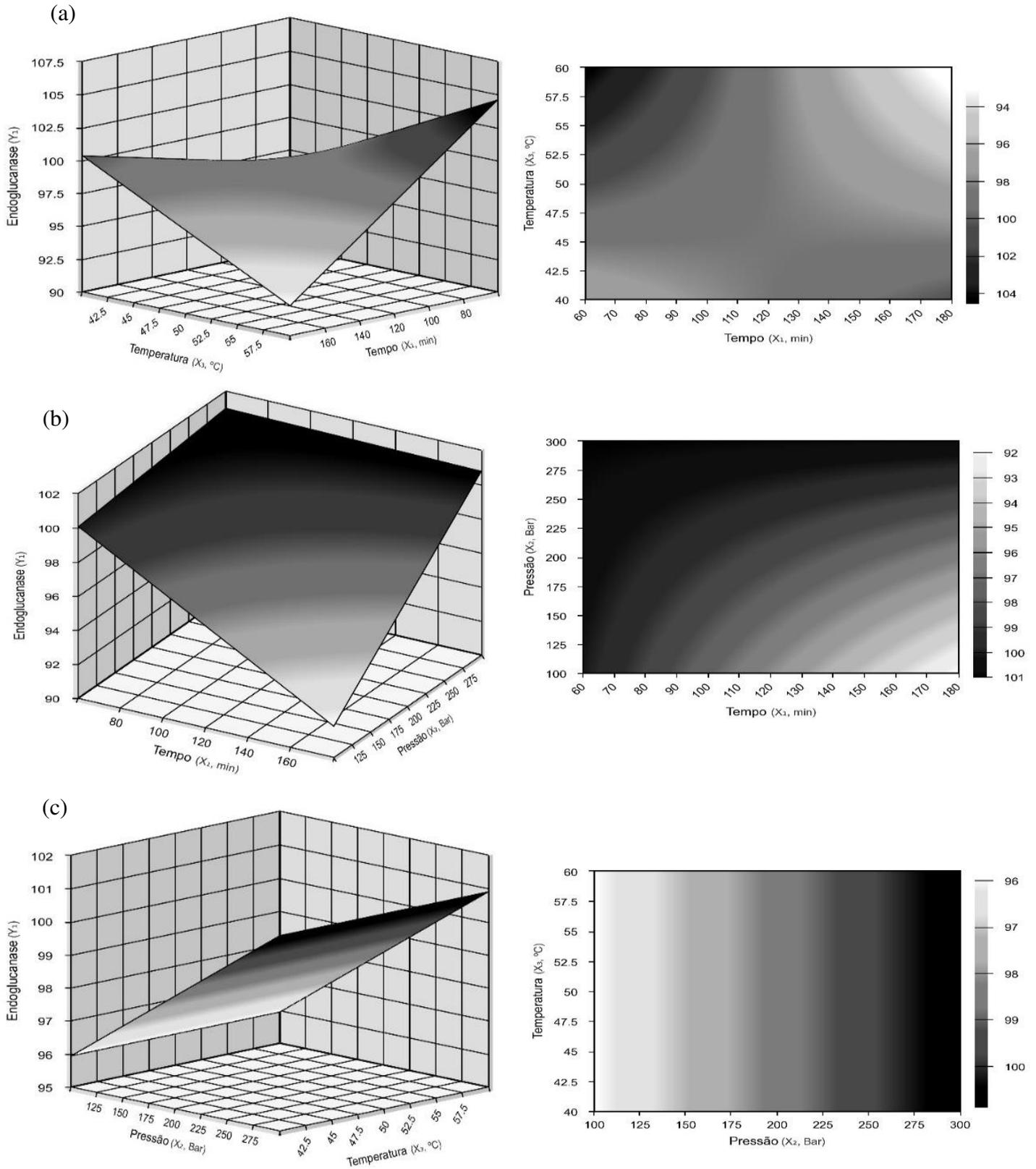
$F_{\text{tabelado}}(0,1;3;7)=3,070$, $F_{\text{tabelado}}(0,1;7;3)=5,266$

Excluindo os termos não significativos, a ANOVA para os ensaios do DCC para a CMCase apresentou $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e desta forma foi possível a construção de um modelo preditivo codificado além de superfícies de resposta. A Equação 3-7 apresenta o modelo para a atividade relativa de endoglucanase em função do tempo (X_1), pressão (X_2) e temperatura (X_3), e a Figura 3-4 apresenta as superfícies de resposta.

$$\text{Atividade relativa de CMCase (\%)} = 98,65 - 2,86 X_1 + 3,22 X_2 - 3,30 X_1 X_3 \quad (\text{Eq. 3-7})$$

O tempo e a interação tempo-temperatura tem efeitos negativos para a atividade enzimática de CMCase, porém a pressão tem efeito positivo. Senyay-Oncel e Yesil-Celiktas, (2015) avaliaram a caracterização, imobilização e incremento da atividade de celulase tratada com CO₂ supercrítico em temperaturas de 28° a 80°C, pressões de 60 a 300 bar e tempos de 60 a 180 min. Estudando as variáveis de forma isolada, observaram que incremento de atividade era alcançado com o aumento da pressão quando o meio reacional estava a 54°C por 120 min. Além de Muratov e Kim (2002) que reportaram que, sob aplicação de SC-CO₂, o complexo celulolítico de *Trichoderma viride* alcançou 90% de eficiência catalítica com pressão de 120 bar, durante testes com 80 e 200 bar.

Figura 3-4. Superfícies de resposta do DCC para atividade enzimática de endoglucanases em função de (a) Tempo e temperatura (b) Tempo e pressão (c) Pressão e Temperatura de tratamento do SC-CO₂ para Cellic CTec2



De acordo com os resultados obtidos por Park et al. (2001) a atividade da celulase era mantida a uma pressão de 160 atm, entretanto decrescia com um aumento até 200 atm. Em condições de pressão ambiente, a temperatura ótima para a atividade enzimática de celulase é 50°C, e de acordo com Park et al. (2001), nenhuma mudança na atividade enzimática foi observada no tratamento da enzima a 50°C por 90 min a 120 atm.

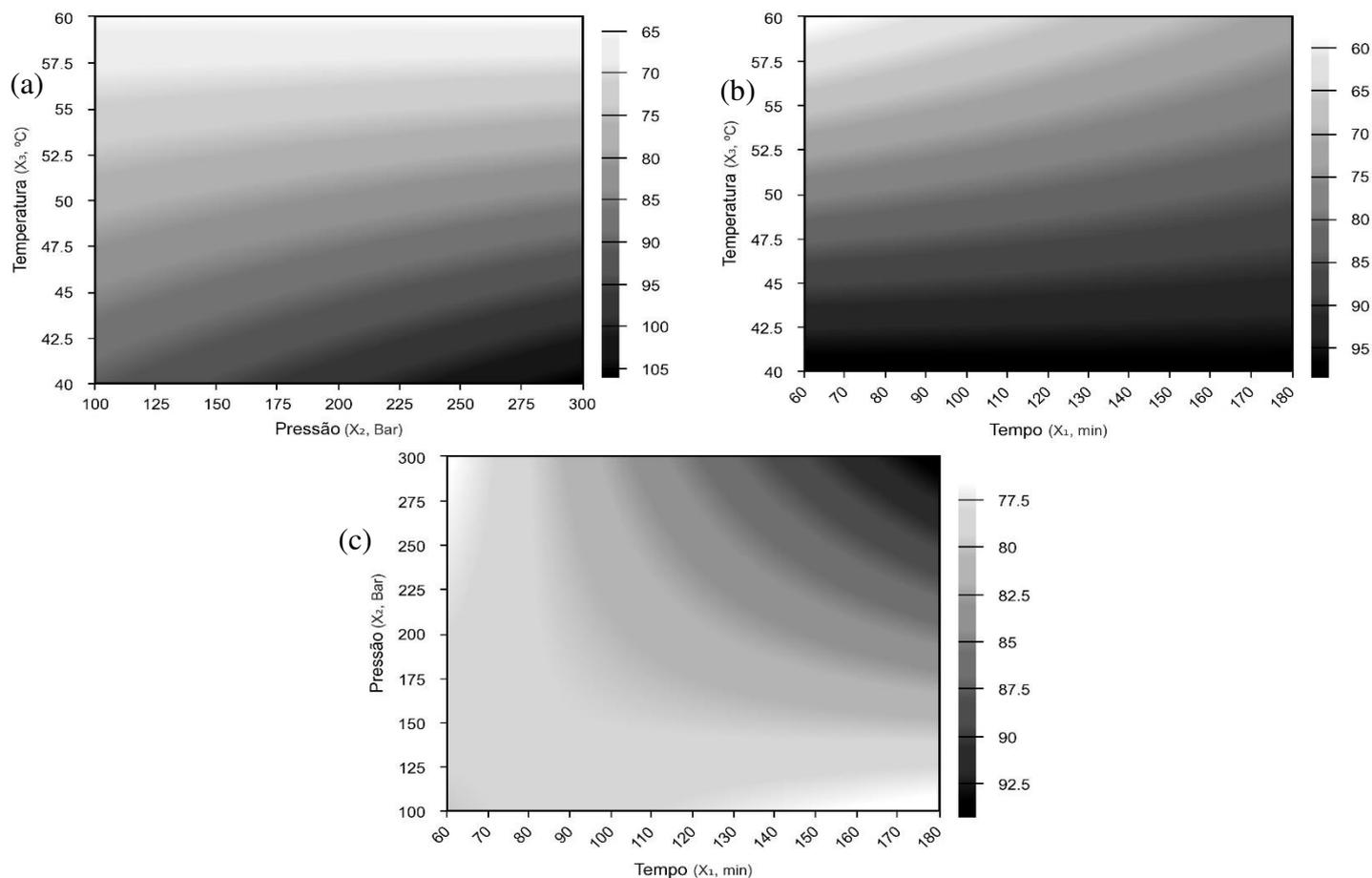
Para a atividade de celulases totais (FPase) todos os parâmetros foram considerados significativos ($p < 0,1$). A Equação 3-8 apresenta o modelo para a atividade relativa de FPase em função do tempo (X_1), pressão (X_2) e temperatura (X_3), e a Figura 3-5 apresenta as curvas de contorno.

A temperatura apresenta efeito negativo, indicando que o aumento de 40° a 60°C causa um decréscimo na atividade enzimática. O mesmo comportamento foi observado para a enzima Celluclast 1,5L no presente trabalho e em outros da literatura (MURATOV; KIM, 2002; SENYAY-ONCEL; YESIL-CELIKTAS, 2015). Uma vez que essa atividade enzimática quantifica a eficiência catalítica da enzima frente a substratos insolúveis (FPase), evidencia-se uma possível alteração na estrutura ou sítio ativo da enzima em temperaturas elevadas. Ainda em comparação com a celulase comercial Celluclast 1,5L, a média das atividades para essa enzima foram superiores, indicando maior capacidade do coquetel enzimático Cellic CTec2 de degradar o substrato insolúvel (papel filtro) e liberar açúcares simples.

$$\text{Atividade relativa de FPase (\%)} = 77,09 + 3,49X_1 + 3,79X_2 - 16,75X_3 + 5,49X_1 \cdot X_2 + 3,80X_1 \cdot X_3 - 4,03 X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 3-8})$$

Em relação aos ensaios descritos pela literatura, onde foram realizados testes de variáveis de isoladamente, as condições encontradas para aumento da endoglucanase (CMCase) nesse trabalho concluem que em tempos menores e pressões maiores também é possível alcançar pequeno aumento na atividade enzimática (Ensaio 7 – 60 min, 300 bar, 60°C e Ensaio 4 – 60 min, 300 bar e 40°C) ou manter a atividade enzimática, de acordo com os resultados dos pontos centrais nas condições de 50°C, 120 min e 200 bar.

Figura 3-5. Curvas de contorno para as respostas de FPase em função de (a) Temperatura e Pressão, (b) Tempo e Temperatura e (c) Pressão e Tempo para os tratamentos de SC-CO₂ para Cellic CTec2



Os decréscimos nas atividades enzimáticas são atribuídos às mudanças na estrutura da enzima - pressão na superfície da enzima – e redução do pH no meio reacional devido à grande quantidade de CO₂ aplicado ao sistema para atingir a alta pressão requerida (MURATOV; KIM, 2002; SENYAY-ONCEL; YESIL-CELIK TAS, 2015).

3.3.2 Efeito do Tratamento com CO₂ Supercrítico sobre a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar

Após a identificação dos efeitos causados pelo tratamento com SC-CO₂ nas enzimas comerciais, a capacidade de aumentar o grau de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado. O sistema composto por bagaço de cana-de-açúcar (2 % m.v⁻¹) e enzima (*loading* de 10 FPU.g_{celulose}⁻¹) foi submetido aos ensaios propostos pelo DCC (Tabela 3-2) para tratamento com SC-CO₂. A Tabela 3-4 apresenta os resultados de açúcares redutores para as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 após tratamento com CO₂ supercrítico.

Tabela 3-4. Resultados experimentais para ambos planejamentos DCC com as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 e bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio				Celluclast 1,5L®	Cellic CTec2®
	X1 (min)	X2 (bar)	X3 (°C)	Açúcar Redutores (%)	Açúcar Redutores (%)
1	-1 (60)	-1 (100)	-1 (40)	147,89	96,10
2	+1 (180)	-1 (100)	-1 (40)	136,41	101,35
3	-1 (60)	+1 (300)	-1 (40)	159,93	98,78
4	+1 (180)	+1 (300)	-1 (40)	173,63	111,81
5	-1 (60)	-1 (100)	+1 (60)	46,84	67,95
6	+1 (180)	-1 (100)	+1 (60)	36,88	68,22
7	-1 (60)	+1 (300)	+1 (60)	53,81	93,28
8	+1 (180)	+1 (300)	+1 (60)	59,99	80,00
9	0 (120)	0 (200)	0 (50)	143,28	127,73
10	0 (120)	0 (200)	0 (50)	145,00	132,49
11	0 (120)	0 (200)	0 (50)	144,29	130,8

De maneira geral, os pontos centrais (Ensaio 9 a 11) apresentam pouca variação, indicando boa repetibilidade do planejamento experimental. A concentração de açúcares redutores variou de 36,88% (Ensaio 6) a 173,63% (Ensaio 4): para a celulase comercial Celluclast 1,5L, enquanto que para o coquetel enzimático Cellic CTec2 variou de 67,95% (Ensaio 5) a 132,49% (Ensaio 10): Também é importante mencionar que foram realizados os mesmos 11 ensaios para o bagaço de cana-de-açúcar com tratamento supercrítico, porém na ausência das enzimas. No entanto, não houve liberação de açúcares redutores, indicando que os dados apresentados resultam da hidrólise enzimática.

A Tabela 3-5 apresenta os coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e os valores de F calculados pela ANOVA para ambas as enzimas estudadas. Por observação dos resultados é possível notar que na temperatura de 60°C são encontradas as menores concentrações de açúcares redutores liberados tanto para Celluclast quanto para Cellic CTec2. E de acordo com os efeitos calculados, a temperatura apresentou efeito negativo para ambas enzimas estudadas.

Analisando os resultados da Tabela 3-5 para a enzima Celluclast 1,5L, além da curvatura, a pressão, temperatura e interações tempo-pressão e pressão-temperatura foram considerados estatisticamente significativos, com coeficiente de correlação elevado após a reparametrização. A Equação 3-9 apresenta o modelo preditivo codificado para a concentração

de açúcares redutores liberados pela enzima Celluclast sob tratamento com CO₂ supercrítico, e a Figura 3-6 mostra a relação entre temperatura, pressão e tempo de tratamento com CO₂ supercrítico e liberação de açúcares redutores para a enzima Celluclast 1,5L.

Tabela 3-5. Coeficientes de regressão, p-valores, coeficientes de correlação e Fcalculado por ANOVA para a concentração de açúcares redutores de ambos planejamentos experimentais (Celluclast e Cellic CTec2) quando empregado SC-CO₂.

Fatores	Celluclast 1,5L		Cellic CTec2	
	Coeficiente de Regressão	p - valor	Coeficiente de Regressão	p - valor
Média	101,92	0,000	89,69	0,000
Curvatura	42,27	0,000	40,65	0,001
(1) Tempo	-0,19	0,798	0,66	0,723
(2) Pressão	9,92	0,001	6,28	0,034
(3) Temperatura	-52,54	0,000	-12,32	0,005
(1)·(2)	5,17	0,005	-0,72	0,698
(1)·(3)	-0,75	0,362	-3,91	0,104
(2)·(3)	-2,40	0,041	3,00	0,104
R ²	99,95%		98,59%	
F _{calculado}	1636,8		70,01	
F _{tabelado}	3,45		3,45	

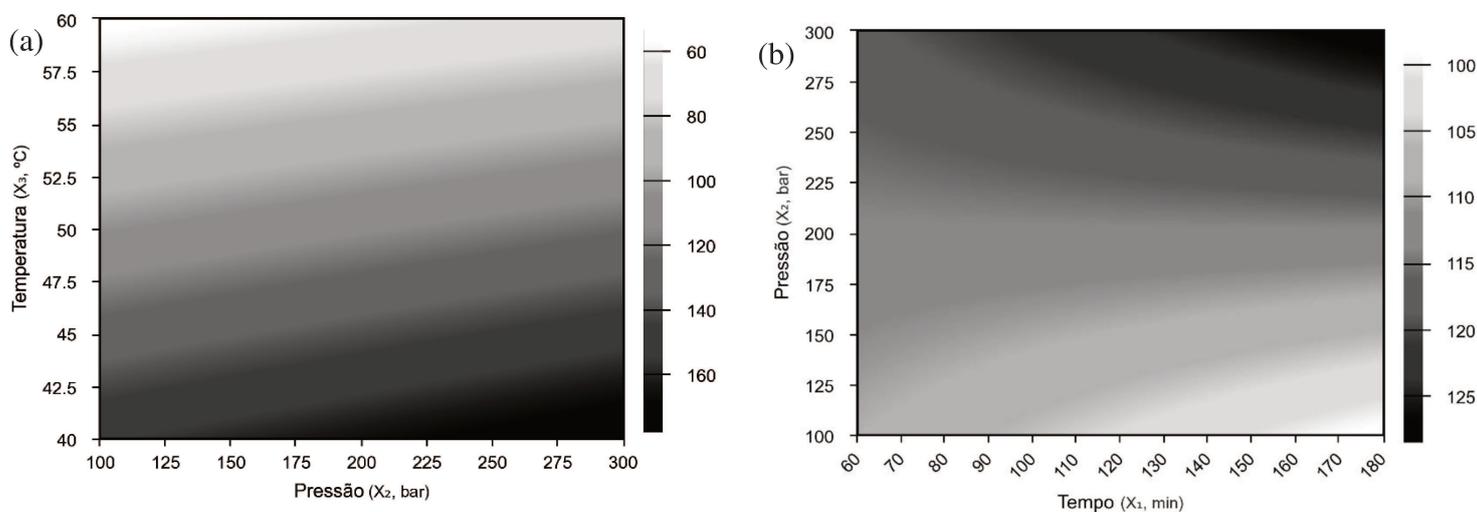
Em negrito, fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

F_{tabelado} (0,1;5;5)=3,45

$$\text{Concentração Relativa de Açúcares Redutores (\%)} = 101,92 + 9,92X_2 - 52,54X_3 + 5,165 X_1 \cdot X_2 - 2,39X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 3-9})$$

Para a enzima Cellic CTec2, de acordo com a Tabela 3-5, além da curvatura, a pressão, temperatura e as interações tempo-temperatura e pressão-temperatura foram considerados estatisticamente significativos, com coeficiente de correlação elevado após a reparametrização. A Equação 3-10 apresenta o modelo preditivo codificado para a concentração de açúcares redutores liberados pela enzima Cellic CTec2 sob tratamento com CO₂ supercrítico, e a Figura 3-7 mostra a relação entre temperatura, pressão e tempo de tratamento com CO₂ supercrítico e liberação de açúcares redutores.

Figura 3-6. Concentração de açúcares redutores em função da (a) temperatura e pressão e (b) pressão e tempo para Celluclast 1,5L sob tratamento com SC-CO₂.

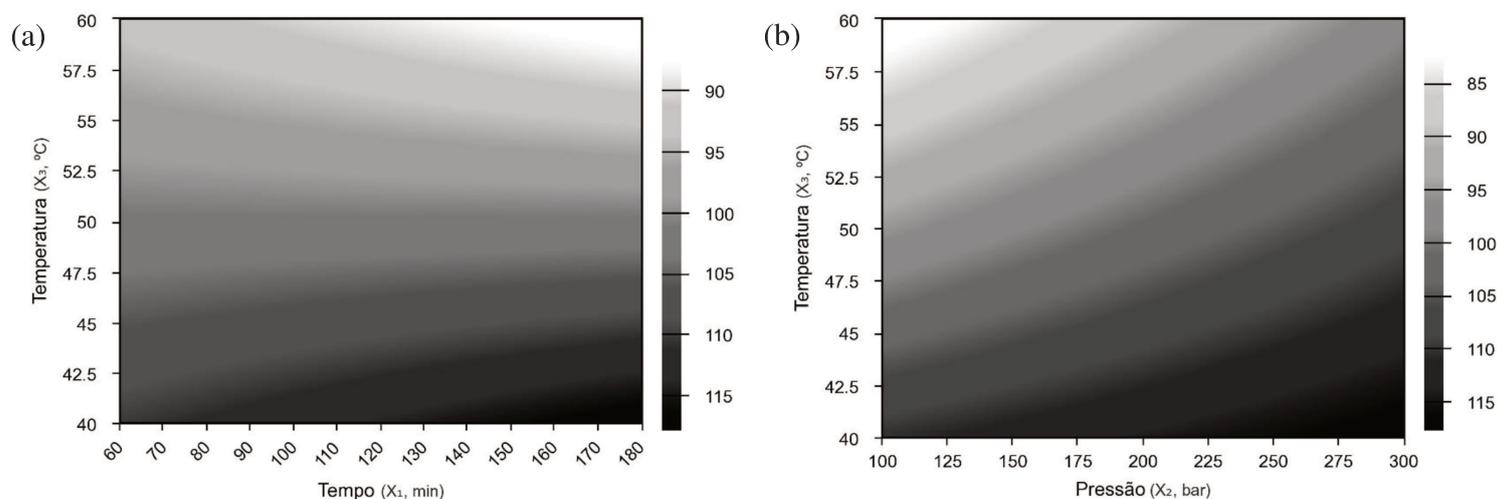


Pela análise da Figura 3-6 é possível inferir que altas pressões aliadas a maiores tempos de exposição ao fluido supercrítico e a baixas temperaturas levam a maiores liberações de açúcares redutores por parte da enzima Celluclast 1,5L. Mesmo comportamento é apresentado para a enzima Cellic CTec2, de acordo com a Figura 3-7.

$$\text{Concentração Relativa de Açúcares Redutores (\%)} = 89,68 + 6,28X_2 - 12,32X_3 - 3,91X_1X_3 + 2,99X_2X_3 \quad (\text{Eq. 3-10})$$

Figura 3-7

. Concentração de açúcares redutores em função da (a) temperatura e tempo e (b) pressão e temperatura para Cellic



Dessa maneira, os melhores resultados obtidos para aumento do grau de hidrólise do substrato lignocelulósico para a enzima Celluclast e Cellic CTec2 foram nos ensaios 4 e 10, respectivamente. A condição de 300 bar, em tempo de 180 min a 40°C para a enzima Celluclast 1,5L apresentou aumento de 73,63% na concentração de açúcares redutores (concentração de 1,176 g.L⁻¹), com rendimento teórico de hidrólise de celulose de 17,56%. Já para a enzima Cellic CTec2, o ensaio do ponto central de 120 min e 200 bar de pressão, a 50°C resultou em 2,340 g.L⁻¹ de concentração de açúcares redutores liberados, (correspondente a um aumento de 32,49%) e rendimento de hidrólise de celulose de 32,4%.

A aplicação de fluidos supercríticos em bagaço de cana-de-açúcar com a finalidade de pré-tratamento tem sido investigada. Por exemplo, Benazzi et al., (2013) estudaram a aplicação do SC-CO₂ combinado com ultrassom para aumentar a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, alcançando uma eficiência de hidrólise de 74,2%.

Muratov e Kim (2002) estudaram a hidrólise enzimática de fibras de algodão em CO₂ supercrítico utilizando enzimas celulolíticas de *Trichoderma viride*; Os experimentos resultaram em condição ótima de hidrólise das fibras em 120 atm de pressão a 50°C por 48 h e produtividade de glicose liberada em CO₂ supercrítico 1,2 vezes maior do que obtida a pressão atmosférica. O tempo maior de aplicação do tratamento nesse trabalho não causou desnaturação enzimática. Em comparação ao presente trabalho, onde foram constatadas que pressões maiores podem aumentar o grau de hidrólise do substrato, é evidente que a interação entre tempo e pressão exercem influência no resultado.

Park et al., (2001) estudaram a hidrólise enzimática de AVICEL[®] em meio reacional com dióxido de carbono supercrítico sob condições tais que a celulase foi estável e manteve sua atividade (120 atm de pressão, tempo de 90 min e temperatura de 50°C). A celulose microcristalina (AVICEL[®]) em uma concentração de 20 g.L⁻¹ foi completamente hidrolisada, resultado em rendimento de 100% sob pressões de 120 e 160 atm. Entretanto, em pressão mais elevada (200 atm) o rendimento de glicose foi reduzido a 65% apesar da celulase ter se mantido estável com atividade enzimática mais baixa.

O efeito da pressão na superfície enzimática causa deformação estrutural nas enzimas resultando em decréscimo da atividade enzimática, conseqüentemente diminuição da concentração de açúcares redutores liberados O efeito do pH também deve ser considerado, uma vez que o aumento da pressão aumenta a quantidade de CO₂ ingressando no meio reacional e pode ocasionar a redução do pH e conseqüente diminuição da eficiência catalítica das celulasas (PARK et al., 2001).

As eficiências de hidrólise máximas alcançada no presente trabalho foram de 17,56% e 32,40% para Celluclast e Cellic CTec2, respectivamente, podem indicar que houve redução da resistência da transferência de massa, enquanto a atividade enzimática é mantida durante a hidrólise. De acordo com Park et al. (2001), em condições de meio reacional com dióxido de carbono supercrítico o aumento da taxa de hidrólise ocorre pelo aumento da transferência de massa entre o substrato e a enzima em um sistema heterogêneo sólido-líquido, que auxilia também na redução na inibição pelo produto formado nas reações enzimáticas, principalmente, glicose. A acessibilidade do sítio ativo das enzimas também pode ter sofrido modificações, e essas mudanças estruturais na superfície enzimática suportam o aumento da concentração de açúcares liberados.

Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que o estudo das relações entre as variáveis é importante e podem resultar em condições apropriadas de aumento de atividade enzimática aliado ao aumento da hidrólise enzimática do substrato lignocelulósico.

3.4 CONCLUSÃO

Em relação a enzima comercial Celluclast 1,5L, a condição ótima para a CMCase e FPase foi definida como pressão de 300 bar, tempo de 180 min em uma temperatura de 40°C, levando a um incremento na atividade de 14,31% para FPase. Já em relação ao coquetel Cellic CTec2, um pequeno incremento (3,60%) na atividade enzimática de CMCase foi obtido na condição de tempo de 60 min, pressão de 300 bar e 40°C de temperatura.

A hidrólise enzimática com as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 sob condições supercríticas resultou em maiores concentrações de açúcares redutores liberados em relação à hidrólise controle realizada em pressão atmosférica ambiente. Os melhores resultados obtidos foram acréscimo de 73,63% e 32,49% na concentração de açúcares redutores para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2, respectivamente. Para a Celluclast, a condição otimizada foi de 300 bar, tempo de 180 min e 40°C, enquanto que para Cellic CTec2 a condição ótima foi encontrada no ponto central (120 min, 200 bar, 50°C).

A utilização de condições supercríticas do dióxido de carbono como meio reacional para o incremento da atividade enzimática de celulasas e aumento da hidrólise de substratos lignocelulósicos leva a resultados favoráveis, indicando que a combinação de condições adequadas propicia o melhor desempenho enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, O. A. M.S. Tese, The University of Akron, Akron, OH. 1997

BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4, p. 247–250, 2013.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GOUVEIA, E. C. et al. Validação de metodologia para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**. v. 32, n.6, p. 1500-1503, 2009.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139–144, 2001.

KNEZ; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ HRNČIČ, M.; ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 2014.

LEITGEB, M.; ČOLNIK, M.; PRIMOŽIČ, M.; ZALAR, P.; CIMERMAN, N. G.; KNEZ, Ž. Activity of cellulase and α -amylase from *Hortaea werneckii* after cell treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 78, p. 143–148, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Biological chemistry**, p. 193 - 265, 1951.

MANDELS, M.; STERNBERG, D.; Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

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

MURATOV, G.; KIM, C. Enzymatic Hydrolysis of Cotton Fibers in Supercritical CO₂. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. p. 85–88, 2002.

MURATOV, G.; SEO, K.-W.; KIM, C. Application of Supercritical Carbon dioxide to bioconversion of cotton Fibers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Vol.11, No.1, 42-46, 2005

PARK, C. Y.; RYU, Y. W.; KIM, C.; UNIVEZZITY, A. Kinetics and Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide. **Korean Journal of Chemical Engineering**.v. 18, n. 4, p. 475–478, 2001.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251–256, 2012.

REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 272–280, 2007.

RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 70–77, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Design of Experiments and Process Optimization**. 1st. ed. Campinas, CRC Press, (2014).

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIK TAS, O. Activity and stability enhancement of α -amylase treated with sub- and supercritical carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 435–440, 2011.

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIK TAS, O. Characterization, immobilization, and activity enhancement of cellulase treated with supercritical CO₂. **Cellulose**, v. 22, n. 6, p. 3619–3631, 2015.

WIMMER, Z.; ZAREVÚCKA, M. A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 233–253, 2010.

4. CAPÍTULO 4

Discussão Geral

Nesse trabalho foi possível o estudo da aplicação de ultrassom nas preparações comerciais de celulasas resultando em condições apropriadas de tempo de aplicação e intensidade de ultrassom e temperatura do meio reacional para o aumento da atividade enzimática ou sob sistema com bagaço de cana-de-açúcar para incremento da hidrólise.

A melhor condição para incremento da atividade relativa de CMCase, FPase e β -glicosidase sob ultrassom foi de intensidade de 240W, tempo de 170s e temperatura de 30°C para a enzima Celluclast 1,5L e para o coquetel enzimático Cellic CTec2 as condições validadas foram tempo de 170s, temperatura de 37,5°C e intensidade de 320W. Alguns relatos da literatura reportam que intensidades altas podem degradar a estrutura proteica da enzima, entretanto tendo em vista a interação entre variáveis, estudadas no presente trabalho, nota-se que é possível o aumento da eficiência catalítica das celulasas comerciais.

As diferenças entre os trabalhos para a mesma enzima comercial podem estar relacionadas à influência da temperatura, uma vez que a interação entre variáveis pode ser significativa de acordo com os planejamentos experimentais do presente estudo, e que não é avaliada nos outros estudos.

Quando utilizadas as enzimas comerciais para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com tratamento ultrassônico, foram alcançados aumentos expressivos de liberação de açúcares redutores. As condições validadas para a enzima Celluclast 1,5L foram intensidade de 200W a 25°C por 330s para a liberação dos açúcares prontamente assimiláveis, com rendimento teórico de hidrólise em celulose de 45%. Já em relação ao coquetel enzimático Cellic CTec2 a condição de validação testada foi 75s, 200W e 30°C e o resultado obtido foi de 191,81% de concentração de açúcares redutores relativos ao ensaio controle. Nessas condições, o rendimento teórico em celulose foi de 66,31% e de xilose 7,01%.

Em relação ao tratamento com ondas ultrassônicas na enzima, é possível identificar condições diferentes para as melhores condições de tratamento. Isso se deve ao fato de que o ultrassom pode ter afetado a conformação do substrato além da enzima, tornando a conformação espacial da reação mais favorável à sua eficiência catalítica. De maneira geral foi possível observar que o tratamento com ultrassom por sonda ultrassônica, nas condições apropriadas, leva a resultados favoráveis de aumento de atividade enzimática além de propiciar aumento no grau de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

No presente trabalho também foi possível obter condições de aumento da atividade enzimática de celulasas comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) sob aplicação de CO₂ supercrítico bem como otimizar as condições de processo para aumentar o grau de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Para ambas as enzimas (Celluclast 1,5L e Cellic

CTec2) quando submetidas ao tratamento com SC-CO₂ destaca-se o efeito negativo do aumento da temperatura. A temperatura de 60°C teve impacto negativo tanto nas atividades enzimáticas quanto na liberação de açúcares redutores.

A melhor condição para o incremento da atividade enzimática de CMCase e FPase para a enzima Celluclast 1,5L quando submetida a tratamento com CO₂ supercrítico foi a que era aplicada 300 bar de pressão durante 180 min a uma temperatura de 40°C. Para o coquetel enzimático Cellic CTec2 sob pressão de 300bar, na temperatura de 40°C e tempo de 60 min, apenas um pequeno incremento foi alcançado.

Quando aplicadas condições supercríticas à hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, as eficiências de hidrólise máximas alcançada no presente trabalho foram de 17,56% e 32,40% para Celluclast e Cellic CTec2, respectivamente. Esses resultados indicam que pode ter ocorrido redução da resistência da transferência de massa, enquanto a atividade enzimática é mantida durante a hidrólise. A acessibilidade do sítio ativo das enzimas também pode ter sofrido modificações, e essas mudanças estruturais na superfície enzimática suportam o aumento da concentração de açúcares liberados. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que o estudo das relações entre as variáveis é importante e podem resultar em condições apropriadas de aumento de atividade enzimática aliado ao aumento da hidrólise enzimática do substrato lignocelulósico.

De maneira geral, ambos tratamentos – ultrassom e CO₂ supercrítico – foram capazes de aumentar a atividade enzimática das preparações comerciais, além de causarem um aumento no grau de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, quando aplicadas condições adequadas.

5. CAPÍTULO 5

Conclusões Gerais

Em relação ao tratamento com ultrassom, foi possível determinar condições favoráveis de aplicação para o aumento da atividade enzimática das enzimas comerciais Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 através da estratégia de planejamentos experimentais.

A atividade enzimática das endoglucanases (CMCase) foi incrementada sob o tratamento com ultrassom nas condições de 350W, 170 s e 37,5°C para a enzima Celluclast 1,5L, enquanto que a melhor condição foi de 312 W, 265 s e 45°C. O aumento da intensidade teve efeito positivo na atividade das CMCases. A atividade de celulases totais (FPase) foi reduzida com o aumento da temperatura quando empregado ultrassom para ambas as enzimas e atividade média dos ensaios foi maior para o coquetel enzimático Cellic CTec2 (97,34%) do que para a celulase comercial Celluclast (52,87%) e as condições mais adequadas para as enzimas foram de 100 a 250s e de 250 a 320W. Já para a atividade enzimática de β -glicosidases tanto no coquetel enzimático (Cellic CTec2) quanto na enzima comercial (Celluclast 1,5L) condições drásticas de temperatura e intensidade levaram a redução da atividade enzimática.

Nos ensaios de validação para aplicação de ultrassom foi constatado aumento de 13,0%, 57,0% e 2,0% para endoglucanases (CMCase), celulases totais (FPase) e β -glicosidases, respectivamente nas atividades enzimáticas da celulase comercial Celluclast 1,5L quando empregado tempo de 170s, intensidade de 240 W (30%) e 30°C de temperatura. A condição otimizada para Cellic CTec2 foi no mesmo tempo de processo da Celluclast (170s), no entanto com maior intensidade (320 W) e temperatura (37,5°C), o que propiciou um aumento de 7% para CMCase e 12% para β -glicosidase. No entanto, após 48h a atividade enzimática foi reduzida, indicando perda na estabilidade da enzima.

Na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar assistida com ultrassom a liberação de açúcares foi maior nos ensaios com a enzima Cellic CTec2 do que com a enzima comercial Celluclast 1,5L. A condição ótima para a celulase Celluclast 1,5L foi no tempo de 330s, intensidade de 200 W e temperatura de 25°C e para o coquetel Cellic CTec2 foi nas mesmas condições de intensidade e temperatura (200 W e 25°C), entretanto com tempo inferior (75 s).

Para os ensaios com aplicação de dióxido de carbono supercrítico foi possível obter condições otimizadas que incrementaram a atividade enzimática de celulases comerciais (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2), bem como resultaram em aumento do grau de hidrólise do substrato lignocelulósico.

As atividades enzimáticas de endoglucanase (CMCase) não apresentaram nenhum parâmetro significativo, bem como β -glicosidase, para a celulase comercial Celluclast 1,5L. Apesar de a CMCase e β -glicosidase apresentarem uma pequena variação das suas atividades

relativas na faixa das condições estudadas, tanto para a enzima Celluclast quanto para a Cellic CTec2 a média, para ambas as atividades é perto dos 100% indicando que a atividade foi mantida constante nessas condições. Entretanto, um modelo preditivo e superfície de respostas foram obtidas para a atividade enzimática de celulasas totais (FPase), e indicaram que o aumento da temperatura causa a redução da atividade enzimática. A condição ótima para a CMCase e FPase foi definida como pressão de 300 bar, tempo de 180 min em uma temperatura de 40°C, levando a um incremento na atividade de 14,31% para FPase.

Também é importante destacar que para ambas as enzimas (Celluclast 1,5L e Cellic CTec2) quando submetidas ao tratamento com SC-CO₂ houve efeito negativo do aumento da temperatura. A temperatura de 60°C teve efeito negativo tanto na liberação de açúcares redutores quanto nas atividades enzimáticas.

A hidrólise enzimática com as enzimas Celluclast 1,5L e Cellic CTec2 sob condições supercríticas resultou em maiores concentrações de açúcares redutores liberados em relação à hidrólise controle realizada em pressão atmosférica ambiente. Os melhores resultados obtidos foram acréscimo de 73,63% e 32,49% na concentração de açúcares redutores para Celluclast 1,5L e Cellic CTec2, respectivamente. Para a Celluclast 1,5L, a condição foi de 300 bar, tempo de 180 min e 40°C e para Cellic CTec2 a condição ótima foi registrada no ponto central (120 min, 200 bar, 50°C).

Quando comparados os dois tratamentos aos quais as enzimas comerciais foram submetidas, ambos propiciaram aumento na atividade enzimática quando aplicadas condições adequadas. O tratamento com fluido supercrítico levou a maiores conversões do substrato lignocelulósico a açúcares fermentescíveis, porém as atividades enzimáticas apresentaram maiores incrementos quando tratadas com ondas ultrassônicas. Sendo assim, ambos tratamentos físicos são capazes de maximizar as atividades enzimáticas celulolíticas além de incrementarem o grau de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e constituírem uma combinação de hidrólise enzimática com tratamento da matéria-prima, dispensando tratamentos mais severos para liberação de açúcares prontamente disponíveis.

6. CAPÍTULO 6

Referências Bibliográficas

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>>.

AGHAJANZADEH, S.; ZIAIFAR, A. M.; KASHANINEJAD, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; ESMAILZADEH, E. Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 185, p. 72–77, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877416301194>>. Acesso em: 27 out. 2017.

AJMAL, M.; FIEG, G.; KEIL, F. Analysis of process intensification in enzyme catalyzed reactions using ultrasound. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 110, p. 106–113, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2016.10.002>>.

ÁLVAREZ, C.; REYES-SOSA, F. M.; DÍEZ, B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 149–156, 2016.

ANTHON, G. E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; BARRETT, D. M. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6153–6159, 2002.

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; AZLAN, J.; AZIFA, A.; FAIK, M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. v. 10, n. March, p. 52–61, 2017.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.

BENZAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4, p. 247–250, 2013.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. S. Production of Cellulolytic Enzymes. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**, p. 105–132, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9781118845394.ch5>>.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

BUSSEMAKER, M. J.; ZHANG, D. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 10, p. 3563–3580, 2013.

CANTONE, S.; HANEFELD, U.; BASSO, A. Biocatalysis in non-conventional media-ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 954–971, 2007. Disponível em: <<http://www.rsc.org/publishing/journals/GC/article.asp?doi=b618893a>>.

CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**, v. 39, n. 7, p. 4222–4234, 1 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301421511003193>>. Acesso em: 2 out. 2017.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 1 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417710002385?via%3Dihub#f0010>>. Acesso em: 27 out. 2017.

CHEN, H.; FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468–478, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>>.

DAI, C.; XIONG, F.; HE, R.; ZHANG, W.; MA, H. Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 191–197, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.035>>.

DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, n. July, p. 80–87, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.029>>.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.004>>.

DOS SANTOS, P.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 170–178, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.08.011>>.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. [s.l.] Springer, 2011.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; FOLETTI, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 480–485, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.006>>.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60–72, 2009.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C.; PEREIRA, G.; MAUGERI FILHO, F. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 53, p. 11595–11603, 2012.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C.; RAMOS, M.; PEREIRA, G.; MAUGERI FILHO, F. Identification and characterization of cellulases produced by *Acremonium strictum* isolated from Brazilian biome 1*. **International Research Journal of Microbiology (IRJM)**, v. 4, n. 6, p. 2141–5463, 2013a. Disponível em: <<http://www.interestjournals.org/IRJM>>.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. **Cellulase**

production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates *Bioresource Technology*. [s.l: s.n.].

GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S.-H.; GECKELER, K. E. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 118–123, 2009.

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

HUANG, G.; CHEN, S.; DAI, C.; SUN, L.; SUN, W.; TANG, Y.; XIONG, F.; HE, R.; MA, H. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 144–149, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>>.

HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225–245, 2011.

HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SCHOEN, P.; LUKAS, J.; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D.; DUDGEON, D. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. **Renewable Energy**, v. 303, n. May, p. 147, 2011. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/47764.pdf>>.

ISLAM, M. N.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. The Inactivation of Enzymes by Ultrasound-A Review of Potential Mechanisms. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 1–21, 2014.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 2, p. 164–174, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/bbb.1634>>.

JOSHI, B.; RAJ, M.; DINITA, B.; JARINA, S.; RAJANI, J. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. November, p. 172–182, 2011.

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

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. **The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference**, v. 1, p. 1689–1699, 2011.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139–144, 2001.

KNEZ; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ HRNČIČ, M.; ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 2014.

KUHAD, R. C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K. K.; KAUR, A.; PLETSCHKE, B. I.; SINGH, A.; KARP, M. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 1 mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>>. Acesso em: 23 out. 2017.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications.

Enzyme research, v. 2011, p. 280696, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3168787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KUPSKI, L.; DE CARVALHO SILVELLO, M. A.; FONTES, M. R. V.; LIMA, T. S.; TREICHEL, H.; BADIALE FURLONG, E. R. Oryzae cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129–138, 2015.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; BUFFON, J. G.; FURLONG, E. B. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458–468, 2014.

LEAES, E. X.; LIMA, D.; MIKLASEVICIUS, L.; RAMON, A. P.; DAL PRÁ, V.; BASSACO, M. M.; TERRA, L. M.; MAZUTTI, M. A. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2013.

LEITGEB, M.; ČOLNIK, M.; PRIMOŽIČ, M.; ZALAR, P.; CIMERMAN, N. G.; KNEZ, Ž. Activity of cellulase and α -amylase from *Hortaea werneckii* after cell treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 78, p. 143–148, 2013.

LIAO, J. C.; MI, L.; PONTRELLI, S.; LUO, S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 288–304, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro.2016.32>>.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LYND, L. R.; LIANG, X.; BIDDY, M. J.; ALLEE, A.; CAI, H.; FOUST, T.; HIMMEL, M. E.; LASER, M. S.; WANG, M.; WYMAN, C. E. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202–211, jun. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917300058>>. Acesso em: 29 out. 2017.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 3, p. 506–77, table of contents, 1 set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209002>>. Acesso em: 21 out. 2017.

MESIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A. J. Supercritical Biocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 2, p. 623–633, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848995>>.

MOHANTY, B.; ABDULLAHI, I. I. Bioethanol Production from Lignocellulosic Waste-A Review. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, n. 2, p. 1153–1161, 2016.

MURATOV, G.; KIM, C. Enzymatic Hydrolysis of Cotton Fibers in Supercritical CO₂. p. 85–88, 2002.

MURATOV, G.; SEO, K.-W.; KIM, C. **2005_Application of Supercritical Carbondioxide to bioconversion of cotton Fibers.pdf**, 2005. .

NGUYEN, T. T. T.; LE, V. V. M. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 557–563, 2013.

- PALMQVIST, B.; WIMAN, M.; LIDÉN, G. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 10, 2011. Disponível em: <<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-4-10>>.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 1 ago. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085249900142X>>. Acesso em: 1 out. 2017.
- PARK, C. Y.; RYU, Y. W.; KIM, C.; UNIVEZZITY, A. Kinetics and Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide. v. 18, n. 4, p. 475–478, 2001.
- PENG, Y.-K.; SUN, L.-L.; SHI, W.; LONG, J.-J. Investigation of enzymatic activity, stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide. **Journal of Cleaner Production**, v. 125, p. 331–340, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.058>>.
- PRAJAPAT, A. L.; SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 84–92, 2016.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. **Protein Expression and Purification**, v. 58, n. 1, p. 162–167, 2008.
- QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251–256, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.070>>.
- RAMSEY, E.; SUN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; GOU, W. Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 6, p. 720–726, jan. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S100107420862330X>>. Acesso em: 9 set. 2016.
- RECZEY, K.; SZENGYEL, Z.; EKLUND, R.; ZACCHI, G. Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 25–30, 1 jul. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852496000387?via%3Dihub#!>>. Acesso em: 16 out. 2017.
- REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 272–280, 2007.
- ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 48–56, 2017.
- RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 70–77, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915300211>>. Acesso em: 11 abr.

2017.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298–306, 2009.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>>.

SALLES-FILHO, S. L. M.; FELÍCIO, P.; CASTRO, D. De; BIN, A.; EDQUIST, C.; FLÁVIA, A.; FERRO, P.; CORDER, S. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector : The innovation driver. **Energy Policy**, v. 108, n. May, p. 70–77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2017.05.037>>.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, V. E. N.; ELY, R. N.; SZKLO, A. S.; MAGRINI, A. Chemicals , electricity and fuels from biorefineries processing Brazil's sugarcane bagasse : Production recipes and minimum selling prices. v. 53, p. 1443–1458, 2016.

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIK TAS, O. Activity and stability enhancement of α -amylase treated with sub- and supercritical carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 435–440, 2011.

SENYAY-ONCEL, D.; YESIL-CELIK TAS, O. Characterization, immobilization, and activity enhancement of cellulase treated with supercritical CO₂. **Cellulose**, v. 22, n. 6, p. 3619–3631, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10570-015-0780-2>>.

SERNA, L. V. D.; ALZATE, C. E. O.; ALZATE, C. A. C. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 113–120, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.078>>.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; SOARES, M. B. A.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, D.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Enzymatic hydrolysis of non-treated sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas with and without ultrasound assistance. **Renewable Energy**, v. 83, p. 674–679, 2015.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>>.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products ??? An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203–215, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148116301586>>. Acesso em: 1 out. 2017.

SINGH, S.; BHARADWAJA, S. T. P.; YADAV, P. K.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Mechanistic Investigation in Ultrasound-Assisted (Alkaline) Delignification of Parthenium hysterophorus Biomass. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 37, p. 14241–14252, 2014.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; SILVA BON, E. P. da; MORAES, L. M. P. de;

ARAÚJO, J. de A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 108–114, 2014.

SULAIMAN, A. Z.; AJIT, A.; YUNUS, R. M.; CHISTI, Y. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 141–150, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.006>>.

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

SZABÓ, O. E.; CSISZÁR, E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1483–1489, 2013.

TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 166–171, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.006>>.

VALDIVIA, M.; GALAN, J. L.; LAFFARGA, J.; RAMOS, J. L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585–594, 2016.

WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. **Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review** *Progress in Energy and Combustion Science* Pergamon, , 1 set. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128517300266#bib0082>>. Acesso em: 4 out. 2017.

WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 222–227, 2012.

WIMMER, Z.; ZAREVÚCKA, M. A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 233–253, 2010.

YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>>.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>>.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources : Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. January, p. 475–501, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>>.

ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, p. 131–146, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118642047.ch8>>.