

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE CELULASES FÚNGICAS OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR**

TALES PRADO ALVES

TOLEDO – PR
Fevereiro de 2017

TALES PRADO ALVES

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE CELULASES FÚNGICAS OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Processos Químicos e Bioquímicos**.

Orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

TOLEDO – PR
Fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou saúde e força para perseverar.

Aos meus pais, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo amor, dedicação e incentivo na continuação dos meus estudos.

A minha noiva Daiane Dourado pelo amor, companheirismo, apoio e paciência nessa jornada.

Ao Professor Dr. Salah D. M. Hasan pela orientação, compreensão, paciência e correções durante todas as atividades e trabalhos desenvolvidos.

A todos os professores que me ajudaram desde a graduação até este momento, esclareceram muitas dúvidas, além das instruções as quais me deram uma nova visão e perspectiva do futuro.

Aos meus amigos, que me ajudaram e contribuíram diretamente para que esse sonho concretiza-se, em especial Felipe, Tércio, Claudia, Pablo, Franciane, Fred, Jéssica e Cláudio, esclareceram muitas duvidas além da mão amiga e bons momentos.

Aos meus amigos de laboratório Kléber e Paola que auxiliaram nesta pesquisa.

À Usina Santa Terezinha Ltda. – USAÇÚCAR da unidade de Goioerê – PR, por ceder o bagaço de cana.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela apoio financeiro.

A Unioeste (Toledo), em sua totalidade pela vivência e conhecimentos transmitidos.

Por fim, a todos que estimularam, por pensamentos, atos e palavras à concretização deste trabalho.

*Vencedores não são aqueles que nunca falham,
mas os que nunca desistem*
(Edwin Louis Cole)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURA.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivo Geral.....	13
1.2 Objetivos Específicos	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Biomassa Lignocelulósica	15
2.2 Celulose	16
2.3 Hemicelulose	18
2.4 Lignina	19
2.5 Bagaço da Cana-de-açúcar	20
2.6 Bioconversão de Resíduos Lignocelulósicos	24
2.7 Pré-tratamento.....	25
2.8 Micro-organismos Lignocelulósicos	27
2.9 Enzimas Celulolíticas.....	28
2.10 Fermentação em Estado Sólido (FES)	30
2.11 Extração Enzimática	31
2.12 Hidrólise Enzimática	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Micro-organismo	35
3.2 Preparo do Inóculo.....	35
3.3 Resíduo Lignocelulósico Utilizado	35
3.3.1 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar	36

3.4	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	36
3.5	Extração Enzimática	37
3.6	Otimização das Condições de Extração	39
3.7	Hidrólise Enzimática	40
3.8	Caracterização parcial da FPase.....	40
3.9	Métodos Analíticos	41
3.9.1	Determinação da Atividade Enzimática FPase	41
3.9.2	Determinação da Atividade Enzimática CMCase	42
3.9.3	Determinação da Atividade Enzimática da β -glicosidase	42
3.9.4	Determinação do Conteúdo de Açúcares Redutores (AR).....	42
3.9.5	Determinação do Teor de Proteína	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	Avaliação do Efeito da Utilização do Ultrassom na Extração das Enzimas	46
4.2	Planejamento Box-Behnken na Extração das Enzimas	50
4.2.1	Avaliação da FPase	51
4.2.2	Avaliação da β -glicosidase.....	55
4.2.3	Avaliação da CMCase.....	57
4.2.4	Otimização Multirresposta	61
4.3	Hidrólise Enzimática do Bagaço da Cana-de-açúcar	63
4.4	Determinação Termoestabilidade e Estabilidade ao pH da FPase	71
5	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO I.....	100
	ANEXO II.....	102
	ANEXO III.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Principais componentes estruturais da parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de Sorek <i>et al.</i> (2014).	15
Figura 2.2: Representação esquemática da molécula de celulose. Fonte: Adaptado de Santos <i>et al.</i> 2012.....	17
Figura 2.3: Representação da estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas. Fonte: Embrapa, 2011.....	17
Figura 2.4: Representação das estruturas pentoses, hexoses e ácidos da hemicelulose. Fonte: Morais <i>et al.</i> 2005.	18
Figura 2.5: Representação das estruturas precursoras que compõem a lignina. Fonte: Adaptado: Bevilaqua, 2010.	19
Figura 2.6: Mecanismo de hidrólise de celulose pelas celulasas. Fonte: Gupta <i>et al.</i> 2016.....	29
Figura 3.1: Distribuição espacial de pontos experimentais em um projeto Doehlert de dois fatores.	38
Figura 3.2: Curva padrão de glicose faixa de sensibilidade de 0,1 a 1,0 g.L ⁻¹	43
Figura 3.3: Curva padrão de proteína faixa de sensibilidade de 2 a 20 µg.100 µL ⁻¹ e/ou 0,02 a 0,2 mg.mL ⁻¹	44
Figura 4.1: Variação da AE da FPase, β-glicosidase e CMCase em função do tempo na FES com <i>Aspergillus niger</i> . Fonte: Boico (2016).	45
Figura 4.2: Superfície de resposta para AE FPase em função da temperatura e pH na extração enzimática.....	53
Figura 4.3: Superfície de resposta para AE FPase em função da tempo e pH na extração enzimática.	54
Figura 4.4: Superfície de resposta para AE FPase em função da temperatura e tempo na extração enzimática.....	54

Figura 4.5: Superfície de resposta para AE β-glicosidase em função da temperatura e pH na extração enzimática.....	57
Figura 4.6: Superfície de resposta para AE CMCase em função do tempo e da temperatura na extração enzimática.	59
Figura 4.7: Superfície de resposta para AE CMCase em função do tempo e pH na extração enzimática.	60
Figura 4.8: Superfície de resposta para AE CMCase em função do temperatura e pH na extração enzimática.....	60
Figura 4.9: Gráfico dos perfis para valores preditos e a desejabilidade para tempo, temperatura e pH na extração multienzimática.....	62
Figura 4.10: Superfícies de resposta para desejabilidade global em função das variáveis tempo, temperatura e pH.....	63
Figura 4.11: Gráfico de Interação entre as variáveis da hidrólise.....	66
Figura 4.12: Gráfico de efeitos para as variáveis da hidrólise.	67
Figura 4.13: Gráficos dos resíduos.	68
Figura 4.14: Termoestabilidade da celulase.	72
Figura 4.15: Estabilidade da celulase à diferentes pHs na temperatura de 50°C.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Geração mundial de resíduos lignocelulósicos.....	21
Tabela 2.2: Composição do bagaço da cana-de-açúcar <i>in natura</i>	22
Tabela 2.3: Resíduos lignocelulósicos utilizados em FES na produção de enzimas	31
Tabela 3.1: Composição da solução nutriente.	37
Tabela 3.2: Níveis e valores reais das variáveis avaliadas no planejamento Doehlert de duas variáveis.....	39
Tabela 3.3: Parâmetros experimentais e os níveis codificados para o planejamento Box-Behnken.	39
Tabela 4.1: Matriz de dados do planejamento Doehlert com os resultados obtidos para AE (U mL ⁻¹) das enzimas.....	46
Tabela 4.2: p-valor das AEs da FPase, CMCase e β -glicosidase para a Matriz de Doehlert ($\alpha = 0,05$).....	47
Tabela 4.3: Matriz do planejamento Box-Behnken com os resultados obtidos para AE (U mL ⁻¹) da FPase, β -glicosidase e CMCase.....	50
Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos para a AE da FPase para o planejamento Box-Behnken ($\alpha = 0,05$).....	51
Tabela 4.5: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste aos dados do PBB.....	52
Tabela 4.6: Estimativa dos efeitos para a AE da β -glicosidase para o PBB.	55
Tabela 4.7: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste aos dados do PBB.....	56
Tabela 4.8: Estimativa dos efeitos para AE da CMCase para o PBB.	58
Tabela 4.9: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos dados do PBB.....	58

Tabela 4.10:: Resultados de açúcar redutor (AR) obtidos na hidrólise do bagaço da cana submetido a diferentes RSL e com ou sem ultrassom. ..	64
Tabela 4.11: Matriz da ANOVA para a hidrólise do bagaço da cana submetido a diferentes RSL (Blocos) e com ou sem ultrassom (tratamentos).	64
Tabela 4.12: ANOVA para a hidrólise enzimática do bagaço da cana.	65
Tabela 4.13: Comparação de médias, teste de Tukey.....	69
Tabela 4.14: Comparação de médias considerando apenas o Bloco (RSL).	69
Tabela 4.15: Comparação entre medias considerando os tratamentos (hidrólise).....	69

NOMENCLATURA

AE – Atividade enzimática (U.mL^{-1})

AR – Açúcares redutores

C_{esp} – Concentração de esporos (esporos.mL^{-1})

CMC – Carboximetilcelulose

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

DCCR – Rotational central composite design

F_{calc} – F calculado (teste “F”)

FES – Fermentação em estado sólido

F_{Sm} – Fermentação submersa

F_{tab} – F tabelado (teste “F”)

GL – Graus de liberdade

MQ – Média quadrática

P – Proporção sólido-líquido utilizado nas FES (m/v)

PBB – Planejamento Box-Behnken

PDA – Potato dextrose ágar

SQ – Soma quadrática

T – Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

t - Tempo de extração (min ou h)

Ultra - Ultrassom (W.mL^{-1})

ALVES, Tales P. Otimização da extração e caracterização parcial de celulasas fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido do bagaço da cana-de-açúcar. 109 p. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial da cana-de-açúcar, este produto é destinado em sua maioria para produção de açúcar e álcool combustível, dando origem a um grande volume de resíduos sólidos. O bagaço da cana é um resíduo lignocelulósico que tem sido utilizado principalmente na geração de energia. Na busca por fins mais nobres, o bagaço da cana pode ser utilizado em processos de fermentação em estado sólido (FES), destinada à produção de enzimas capazes de hidrolisar a celulose. A extração das enzimas obtidas na FES com fungos é uma etapa importante que pode influenciar no rendimento e custo durante o processo de obtenção dos extratos enzimáticos, que serão usados nos processos de hidrólise da celulose presente no bagaço da cana, para fins de geração dos açúcares fermentescíveis, que servirão de matéria prima em fermentações posteriores na obtenção de bioetanol. O objetivo deste trabalho foi avaliar as melhores condições de extração de enzimas celulasas (FPases, CMCases e β -glicosidase) obtidas por FES de bagaço da cana-de-açúcar com o fungo *Aspergillus niger* e sua caracterização parcial. Foi investigada a otimização do processo de extração das enzimas celulolíticas por planejamentos experimentais em busca da condição ótima para extração multienzimática, associando ao método de extração o uso do ultrassom (Ultra) e variação dos parâmetros tempo (min), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH envolvidos no processo. Os resultados obtidos a partir da Matriz de Doehlert demonstraram que não há influência significativa ($p < 0,05$) da utilização do Ultra na extração complexo enzimática. Com base no planejamento Box-Behnken tomando como variáveis t, T e pH, a análise estatística demonstrou efeitos significativos dos termos quadráticos (Q) T, t e pH para FPase. Para a CMCase foram significativos os termos t (Q), linear da T (L) e a interação dos termos T (L) e pH (L), para β -glicosidase o termo da T (Q) e pH (L). Os modelos obtidos descrevem de forma satisfatória o processo de extração das enzimas, afirmado pelos valores de R^2 e teste F. A otimização da extração foi estimada com desejabilidade global de 0,80, nas condições operacionais: t = 35,83 min, T = 38,33 $^{\circ}\text{C}$ e pH = 6,4. Na etapa de hidrólise do bagaço da cana utilizando o complexo enzimático, a ANOVA e o teste Tukey demonstraram que o melhor tratamento foi a hidrólise assistida por ultrassom, com valor médio de 0,8186 g.L^{-1} na maior razão sólido-líquido de 33,3 g.L^{-1} estudada. A caracterização parcial da celulase quanto a temperatura e pH, demonstrou que a celulase é termoestável nas temperaturas de 50 $^{\circ}\text{C}$ e 60 $^{\circ}\text{C}$ e estabilidade ao pH 6,0.

Palavras-chave: Celulasas, fermentação em estado sólido, extração enzimática, planejamento experimental, hidrólise enzimática, caracterização.

ALVES, Tales P. Optimization of extraction and partial characterization of fungal cellulases obtained by solid-state fermentation of sugarcane bagasse. 109 p. 2017. Master Dissertation in Chemical Engineering). West Paraná State University.

SUMMARY

Brazil is the world's largest producer of sugarcane, this product is mostly destined for the production of sugar and fuel alcohol, giving rise to a large volume of solid waste. Sugarcane bagasse is a lignocellulosic residue that has been used mainly in energy generation. In the search for more noble purposes, sugarcane bagasse can be used in solid state fermentation processes (FES), intended for the production of enzymes capable of hydrolyzing cellulose. The extraction of the enzymes obtained in FES with fungi is an important step that can influence the yield and cost during the process of obtaining the enzymatic extracts, which will be used in the hydrolysis processes of the cellulose present in sugarcane bagasse, for the purpose of production fermentable sugars, which will serve as raw material in subsequent fermentations to obtain bioethanol. The objective of this work was to evaluate the best conditions for the extraction of cellulase enzymes (FPases, CMCases and β -glycosidase) obtained by FES from sugarcane bagasse with the *Aspergillus niger* fungus and its partial characterization. The optimization of the extraction process of the cellulolytic enzymes by experimental designs in search of the optimal condition for multienzymatic extraction was investigated, using ultrasound (Ultra) and temperature ($^{\circ}\text{C}$) and time (min) and pH involved in the process. The results obtained from the Doehlert Matrix showed that there is no significant influence ($p < 0.05$) on the use of Ultra in the enzymatic complex extraction. Based on the Box-Behnken design, taking as variables t, T and pH, the statistical analysis showed significant effects of quadratic terms (Q) T, t and pH for FPase. For the CMCCase the terms t (Q), linear of the T (L) and the interaction of the terms T (L) and pH (L) were significant, for β -glycosidase the term of T (Q) and pH (L). The obtained models describe in a satisfactory way the process of extraction of the enzymes, affirmed by the values of R^2 and test F. The optimization of the extraction was estimated with global desirability of 0.80, under the operating conditions: $t = 35.833$ min, $T = 38.333$ $^{\circ}\text{C}$ and $\text{pH} = 6.466$. In hydrolysis of sugarcane bagasse using the enzymatic complex, the ANOVA and the Tukey test demonstrated that the best treatment was the ultrasonic assisted hydrolysis, with a mean value of 0.8186 gL^{-1} in the highest solid-liquid ratio of 33, 3 gL^{-1} studied. Partial characterization of cellulase in temperature and pH showed that cellulase is thermostable at temperatures of 50°C and 60°C and stability at pH 6.0.

Keywords: Cellulases, solid-state fermentation, enzymatic extraction, experimental design, enzymatic hydrolysis, characterization

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola brasileira é favorecida pela alta qualidade do seu solo e clima favorável, fatores estes que contribuem com o setor agroindustrial, garantindo desta forma um grande volume na produção e rentabilidade, tornando-se uma das principais atividades econômicas brasileiras. Se por um lado a grande produção é de interesse para suprir as demandas internas, por outro, ocorre um grande aumento na geração de resíduos, o que resulta na contaminação e/ou poluição do meio ambiente acarretando a perda de materiais valiosos passíveis de reaproveitamento.

Os resíduos da agroindústria, em especial aqueles da sucroalcooleira, recebem atenção singular pelo montante gerado todos os anos, o que demanda a busca por soluções capazes de transformar esses materiais em produtos e/ou insumo para a indústria de bioprocessos. A utilização desses resíduos na produção de produtos químicos, etanol celulósico e enzimas celulases são alternativas promissoras, sustentáveis e ambientalmente corretas para solucionar o dilema da poluição e degradação ambiental (DEVENDRA *et al.* 2016; PAYNE *et al.* 2015; BENOLIEL *et al.* 2013).

Entre os principais países produtores de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) está o Brasil, que se destaca como o maior produtor mundial. Foram produzidas mais de 665 milhões de toneladas na safra de 2015/2016, um número recorde nos últimos anos (CONAB, 2016). Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são produzidas entre 250 a 290 kg de bagaço e aproximadamente 200 kg de palha e pontas. A indústria sucroalcooleira utiliza aproximadamente de 60% a 90% do bagaço para a geração de vapor, suprimindo sua demanda energética para operação, além de comercializar o excedente de energia com as concessionárias da rede elétrica (ÚNICA, 2012; CONAB, 2011; CARDONA *et al.* 2010).

Os resíduos sólidos gerados pela indústria sucroalcooleira despontam como um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes e disponíveis para utilização biotecnológica. Atualmente, o excedente dessa biomassa já é empregado na produção e geração de eletricidade, produção de papel e

celulose, adsorventes orgânicos, entre outros produtos obtidos a partir da fermentação e de elevada importância industrial, tais como enzimas, ácidos orgânicos, alcalóides, meios tecnológicos para alimentação animal, antibióticos, além da produção de bioetanol o que tem estimulado grandes investimentos na indústria de biocombustíveis (SINDHU *et al.* 2016b; ZHAO *et al.* 2015; XI *et al.* 2013; BANSAL *et al.* 2009). Esses investimentos são um reflexo da preocupação com a redução na disponibilidade de combustíveis fósseis e a crescente necessidade da busca por fontes energéticas renováveis, seguras e mais limpas.

O bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo fibroso que contém aproximadamente 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina. A presença de lignina e hemicelulose na parede celular conferem resistência a ação enzimática e acesso das enzimas celulases, tornando o processo de bioconversão lento, entretanto, a biomassa pode passar por uma série de pré-tratamento físico-químicos, que facilitam a ação das enzimas celulases na etapa de hidrólise, favorecendo o processo de bioconversão, tornando-o mais rápido e reduzindo os custos (AGUIAR, 2010).

As celulases são produzidas por micro-organismos específicos que são capazes de utilizar a biomassa vegetal como fonte de energia em seu desenvolvimento. Em geral, as enzimas celulases são produzidas por fungos filamentosos, destaque para *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, classificados como potenciais produtores e frequentemente utilizados para produção de enzimas (SERRA *et al.* 2015; FUJI, 2010). Entre as técnicas existentes para a produção em escala industrial, a Fermentação em Estado Sólido (FES), se desponta em relação à Fermentação Submersa (FSm), com vantagens na utilização dos resíduos agroindustriais como substrato, redução nos custos de investimentos e operação (PIROTA, 2014; SINGHANIA *et al.* 2009). No processo de FES o fungo, na presença da celulose pré-tratada, tende a produzir exocelulases (betaglicosidase e xilanase) e endocelulases (CMAases).

No processo de obtenção das enzimas celulolíticas, diversas investigações tem sido desenvolvidas para melhorar a produção, entre elas estão o controle dos parâmetros de produção associados à fermentação, a seleção e melhoramento genético dos micro-organismos, além dos avanços na

elaboração de complexos celulósicos mais eficazes (SOUSA *et al.* 2014; PIROTA, 2014).

A etapa de extração sólido-líquido das enzimas fúngicas produzidas na FES, necessita de uma atenção especial, afinal os extratos enzimáticos obtidos serão utilizados em diversos processos industriais e irão refletir diretamente no rendimento final. Entre os processo que utilizam-se desses extratos está a etapa de hidrólise para produção de açúcares fermentescíveis, obtidos a partir da celulose presente no bagaço da cana-de-açúcar, os quais posteriormente servirão como matéria prima em fermentações na obtenção de bioetanol. Contudo, não se tem relatos da otimização da etapa de extração do complexo multienzimático de celulasas (FPase, CMCase e β -glicosidase), processo esse que proporciona a obtenção sinérgica das enzimas em uma mesma condição de extração, esse complexo é responsável pela quebra das cadeias da matriz celulósica.

Com a presente proposta de trabalho, espera-se contribuir com o tema, fornecendo dados para o desenvolvimento de pesquisas e novas tecnologias. Além de cooperar para a obtenção e aplicabilidade de enzimas do complexo celulolítico, tornando-a mais viável do ponto de vista econômico, favorecendo sua utilização e comercialização, além da incorporação das enzimas celulósicas na produção do bioetanol..

1.1 Objetivo Geral

Avaliar as melhores condições de extração de enzimas celulasas (FPases, CMCases e β -glicosidasas) obtidas por FES de bagaço da cana-de-açúcar com o fungo *Aspergillus niger*.

1.2 Objetivos Específicos

- Fermentar o bagaço da cana-de-açúcar com o fungo *A. niger* utilizando as condições otimizadas já estabelecidas deste processo em estudos preliminares para a produção das enzimas.

- Extração das enzimas por meio de planejamentos experimentais sequenciais visando otimizar o processo de extração através da metodologia de superfície de resposta (MSR).
- Caracterizar parcialmente as enzimas recuperadas quanto a sua estabilidade térmica e estabilidade ao pH.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

No geral a biomassa lignocelulósica é toda matéria orgânica oriunda de vegetais e/ou processos de transformação natural ou artificial da massa vegetal. A massa vegetal é formada principalmente pelas reações de fotossíntese que produzem fibras, polímeros naturais como celulose, hemicelulose e lignina. Essas fibras constituídas de celulose são mantidas numa matriz de lignina e hemicelulose, que atuam como um sistema de proteção mecânica, química e biológica das plantas, além de possuírem outros componentes em menores quantidades como lipídeos, proteínas, água, compostos inorgânicos e outros metabólitos secundários (DEMIRBAS *et al.* 2011; RABELO *et al.* 2011; AGUIAR, 2010; BETANCUR & PEREIRA JR, 2010; SÁNCHEZ, 2009; SILVA, 2010).

Esse sistema denominado complexo lignocelulósico (Figura 2.1) está presente em diversos resíduos da agroindústria, são eles bagaço, palhas, troncos, galhos, cascas, farelos e sementes.

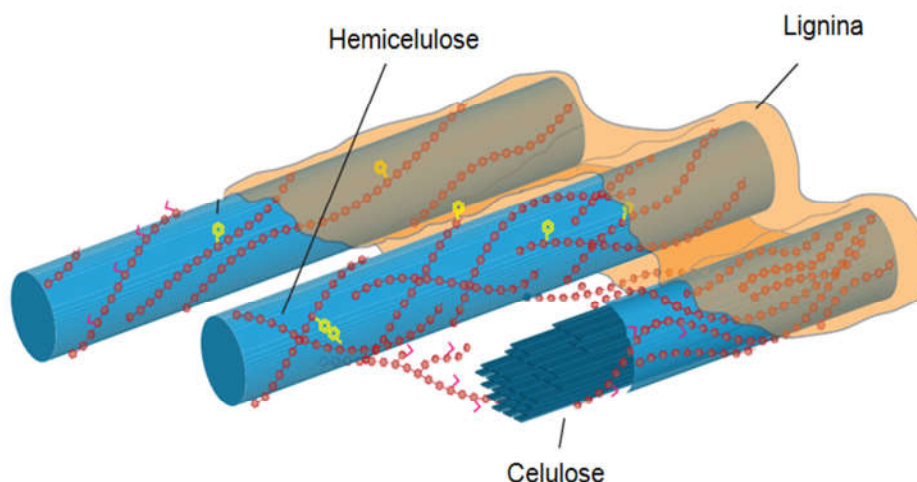


Figura 2.1: Principais componentes estruturais da parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de Sorek *et al.* (2014).

A composição da parede celular da biomassa lignocelulósica varia muito de acordo com as espécies e podem mudar dentro de um mesmo

elemento vegetal, conforme o tipo de célula, fatores e condições ambientais (SINDHU *et al.* 2016b; POPPER *et al.* 2011; KNOX, 2008). Entretanto, não se tem muito conhecimento sobre os mecanismos que regulam a quantidade e a composição da parede celular. Nesse contexto os processos que visam utilizar a biomassa lignocelulósica como substratos precisam ser robustos para sobressair às variações da biomassa (SOREK *et al.* 2014).

No campo de geração de energia, a biomassa vem se destacando como uma importante forma de utilização de recursos renováveis e redução na emissão de gases para atmosfera. A energia gerada a partir da biomassa é mais limpa, denominada energia verde ou bioenergia, onde a conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis já é uma realidade, e dentre os materiais mais aplicados para essa finalidade está o bagaço da cana-de-açúcar, considerado o mais promissor na produção de bioetanol, devido a sua grande disponibilidade e constituição (ANWAR *et al.* 2014; PEREIRA JR. *et al.* 2008).

2.2 Celulose

A celulose está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas, até fibras de sementes, gramíneas, algas, fungos, bactérias e organismos primitivos, seu conteúdo pode variar de 20 a 99% nessas espécies, em que se destaca como o principal componente da parede celular atuando como suporte de carga primária (NECHYPORCHUK *et al.* 2016; VARSHNEY & NAITHANI, 2011; RABELO, 2007)

A celulose apresenta um vasto potencial de utilização pelas indústrias, para a produção de diversos artigos desde os mais simples como plásticos, até produtos mais sofisticados como os cosméticos. A celulose é biopolímero natural, homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). Essa ligação promove a eliminação de uma molécula de água, dando origem a molécula de celobiose, dímero de glicose, unidade básica de repetição da cadeia de celulose conforme a Figura 2.2. A estrutura da celulose está envolvida numa série de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, que conferem estabilidade a molécula, resultando em regiões altamente ordenadas e regiões menos ordenadas ou

amorphas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (Figura 2.3) (UMMARTYOTIN & MANUSPIYA, 2015; FARINAS, 2011; EMBRAPA, 2011; ARANTES & SADDLER, 2010; SÁNCHEZ, 2009).

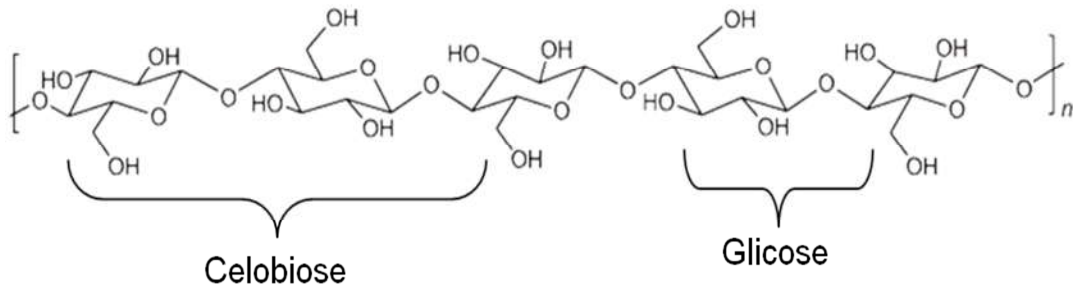


Figura 2.2: Representação esquemática da molécula de celulose. Fonte: Adaptado de Santos *et al.* 2012.

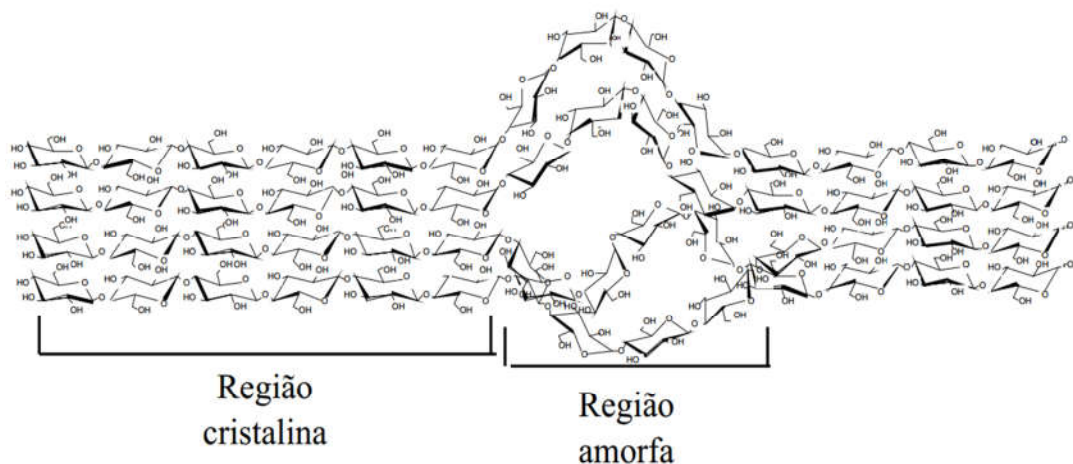


Figura 2.3: Representação da estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas. Fonte: Embrapa, 2011.

As regiões cristalinas da celulose são de difícil degradação, isso devido ao arranjo e o grau de empacotamento que conferem estabilidade e rigidez à molécula, já as regiões amorfas apresentam irregularidades, como orifícios e capilares, nesta conformação, a celulose encontra-se mais susceptível a degradação enzimática e maior acessibilidade para a água e micro-organismos (HALL, 2010; GARCIA, 2009). A celulose ainda pode ser encontrada na natureza associada a outras substâncias presentes na planta, associação está que pode ou não afetar a sua degradação por agentes biológicos e químicos.

2.3 Hemicelulose

A hemicelulose é uma macromolécula heteropolímero ou heteropolissacarídeo formado por cadeias de açúcares. As ligações entre pentoses e hexoses apresentam baixo grau de polimerização, as quais não produzem arranjos fibrosos. A cadeia principal é composta por pentoses (xilose e arabinose), hexose (manose, glicose, galactose), além das cadeias laterais ou ramificações constituídas de ácidos hexurônicos (β -D-glucurônico, D-4-Ometilglucurônico e β -D-galacturônico) e desoxi-hexoses (Figura 2.4) que são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água ou em álcalis (MENEZES & BARRETO, 2015). Há presença de diversas ligações e ramificações, além de unidades monoméricas aumentam a complexidade da molécula de hemicelulose e suas diferentes conformações (KOOTSTRA *et al.* 2009; PEREIRA JR *et al.* 2008).

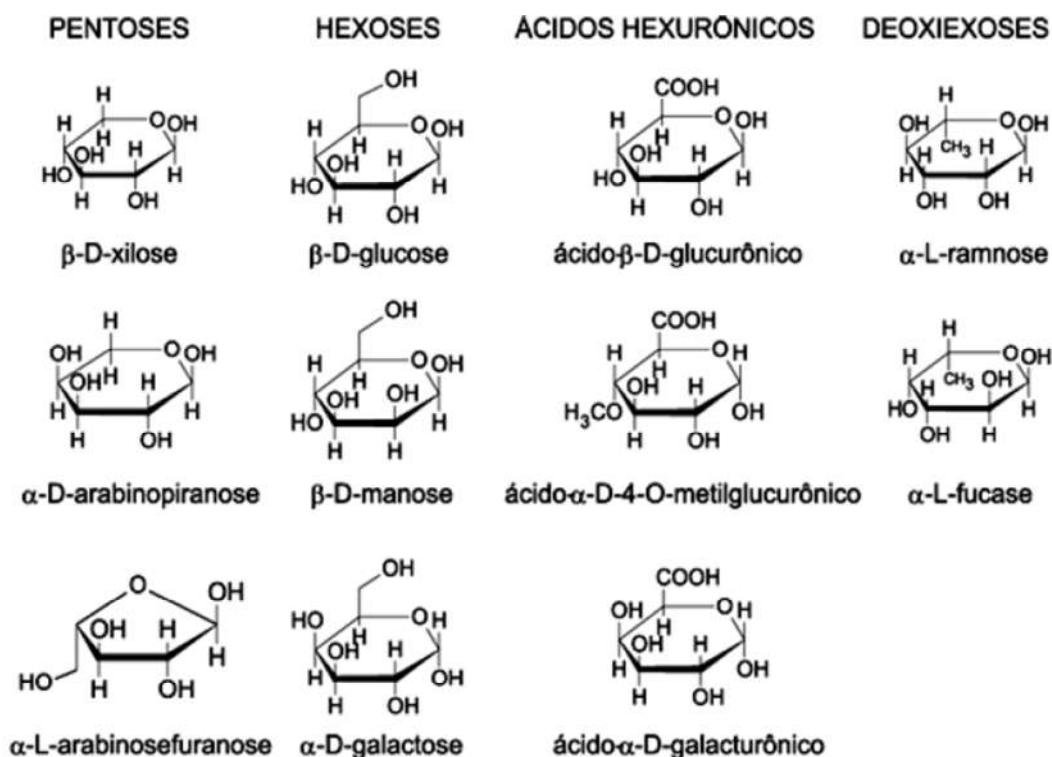


Figura 2.4: Representação das estruturas pentoses, hexoses e ácidos da hemicelulose. Fonte: Morais *et al.* 2005.

A hemicelulose apresenta conformação linear, semelhante à molécula de celulose, entretanto, com a diversidade de açúcares presentes nas

ramificações da hemicelulose ocorrem restrições na formação de grandes regiões cristalinas, portanto, apresenta apenas regiões amorfas, sendo mais suscetível a hidrólise do que a celulose, tanto a hidrólise química como a enzimática (MENDES, 2014; WERNER *et al.* 2014; JOVANOVIC *et al.* 2009).

No geral a quantidade de açúcares, tipos e suas estruturas presentes na molécula de hemicelulose não só variam de uma espécie para outra e de tecido para tecido, mas também são modificadas com o crescimento, desenvolvimento e maturação da planta, além da influência de fatores ambientais (SOREK *et al.* 2014; BASSO, 2010).

2.4 Lignina

A lignina depois da celulose é a substância mais abundante nas plantas, trata-se de uma macromolécula, um polímeros aromático complexo, que diferentemente das frações de celulose e hemicelulose, que se apresentam na forma de cadeias, ela se distribuí aleatoriamente e não possui açúcares em sua estrutura. Esse heteropolímero tridimensional amorfo é formado pela união de três diferentes unidades de monômeros o álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico (Figura 2.5) (BRENELLI *et al.* 2016; PEREIRA JR *et al.* 2008; RABELO, 2007).

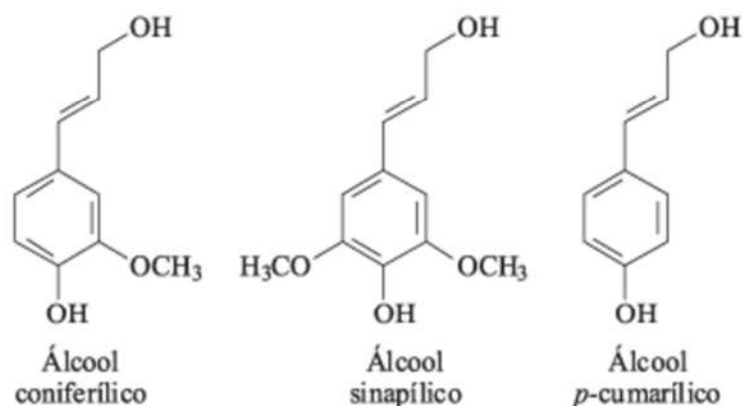


Figura 2.5: Representação das estruturas precursoras que compõem a lignina. Fonte: Adaptado: Bevilaqua, 2010.

A lignina esta associada à fração de celulose, formando ligações covalentes com as unidades monossacarídicas da hemicelulose, atuando como material de ligação entre os componentes da parede celular, onde desempenha

um importante papel biológico e contribui no suporte estrutural, conferindo rigidez e firmeza a matriz celulósica, impermeabilidade da parede celular em relação à água e proteção contra ataques microbianos (BASSO *et al.* 2010; SÁNCHEZ, 2009).

Estas características por sua vez conferem grande resistência à hidrólise da biomassa lignocelulósica, sendo um obstáculo a ação das enzimas celulases, responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose, o que reflete em um dos desafios à utilização e aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos para aplicação biotecnológica. (FERREIRA, 2010; ARANTES & SADDLER, 2010). Contudo, muito já se tem desenvolvido a respeito, processos tanto simples como avançados, físicos (fracionamento da biomassa), químicos (solventes e gases) e biológicos (enzimas e fungos) ou até combinação destes processos, desagregando a lignina da fração celulose/hemicelulose facilitando e viabilizando a utilização da biomassa lignocelulósica.

2.5 Bagaço da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene pertencente ao gênero *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia, cultivada principalmente em regiões de clima tropical e subtropicais (SINDHU *et al.* 2016b; SOCCOL *et al.* 2010). O Brasil se destaca como maior produtor mundial, com área cultivada estimada na safra de 2015/2016, em mais de 8,6 mil hectares e com uma estimativa para a safra de 2016/2017, com mais de 9 mil hectares com alta produtividade, superior a 76.9 mil toneladas por hectare. Os estados das regiões sul e sudeste despontam como os maiores produtores, concentrando mais de 65% da produção nacional, onde o estado de São Paulo é referência nessa cultura, possuindo a maior área cultivada com a maior produtividade de todo o país (CONAB, 2016). Portanto, a cultura da cana-de-açúcar é uma atividade econômica primordial para a e economia dos estados e do Brasil, tornando-se uma fonte geradora de renda e empregos.

No processamento convencional da cana-de-açúcar, onde são produzidos como produto principal etanol combustível e açúcar tem-se a geração de resíduos ou subprodutos como bagaço, palhas, efluentes líquidos, entre outros. O bagaço é um dos resíduos mais abundantes da agroindústria

brasileira e do mundo (Tabela 2.1), onde o montante gerado todos os anos vem se agravando com o crescimento e expansão da lavoura pelo Brasil (SINDHU *et al.* 2016b ; BENOLIEL *et al.* 2013).

Tabela 2.1: Geração mundial de resíduos lignocelulósicos.

Resíduos Lignocelulósicos	Ton. 10 ⁶ /ano (% m/m)
Bagaço da cana de açúcar	317 – 380
Palha de milho	159 – 191
Palha de arroz	157 – 188
Palha de trigo	154 – 185
Palha de soja	54 – 65
Fibra de algodão	17 – 20

Fonte: Adaptado – Sánchez, 2009.

A geração de bagaço da cana-de-açúcar vem aumentando com o passar dos anos. Esse aumento se deve a crescente expansão da lavoura, industrialização e mecanização da colheita, decorrente de investimentos públicos e privados, além da necessidade da busca por um substituto para os combustíveis fósseis. Pressupõe-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são produzidas em média 270 kg de bagaço, onde cerca de 60% desse montante é utilizado para produção de energia elétrica por combustão para suprir as demandas energéticas das instalações e em alguns casos fornecer energia elétrica para as concessionárias da rede elétrica (CONAB, 2011; CARDONA *et al.* 2010). O excedente do bagaço, aproximadamente 40%, desperta grande interesse da indústria e pesquisadores, em utilizar esse resíduo na elaboração de produtos, pois apresenta alta disponibilidade e baixo custo, viabilizando sua utilização.

Além da utilização do bagaço na co-geração de energia, vem se estudando e aplicando esse material na produção de etanol de segunda geração (bioetanol), produzido por meio de processos de hidrólise via química ou enzimática, onde a celulose e hemicelulose são transformadas em açúcares passíveis de fermentação, utilizando assim na íntegra a biomassa da cana-de-açúcar. Há inúmeras vantagens na utilização do bagaço na produção de biocombustíveis entre elas a redução da emissão de gases poluentes como

aqueles emitidos pela queima de combustíveis de origem fóssil (NO_x, SO_x, Hidrocarbonetos), além da redução da emissão de CO₂, que é considerada nula, pois a planta absorve esse gás no o processo de fotossíntese.

O bagaço gerado a partir da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico composto principalmente por três diferentes tipos de biopolímeros como celulose, hemicelulose e lignina, a distribuição desses componentes (Tabela 2.2) na cana-de-açúcar pode variar conforme o ano, condições climáticas, solo, disponibilidade de água, dentre outros aspectos (SINDHU *et al.* 2016b).

Tabela 2.2: Composição do bagaço da cana-de-açúcar *in natura*.

Componentes	Fração (% m/m)
Celulose	34,1 ± 1,2
Hemicelulose	29,6 ± 1,4
Lignina	19,4 ± 0,4
Cinzas	7,9 ± 1,1
Umidade	4,4 ± 0,1
Total	95,5 ± 4,3

Fonte: Maeda *et al.* 2011.

Esse resíduo possui vasta aplicação nos mais variados ramos da indústria, além de ser estudado por diversos pesquisadores no desenvolvimento de tecnologias que aumentem e viabilizem a aplicabilidade do bagaço da cana-de-açúcar na cultura industrial brasileira.

Nesse contexto podemos citar algumas utilizações do bagaço como por Batalha *et al.* (2015) que estudaram a produção de açúcares fermentáveis a partir do bagaço da cana via hidrólise enzimática, assim como Lunelli *et al.* (2014) que aplicaram o ultrassom na hidrólise do bagaço visando também a produção de açúcares fermentescíveis. Já Jain *et al.* (2016) trabalharam com a conversão bioquímica do bagaço da cana-de-açúcar na elaboração de bioprodutos como enzimas e compostos fenólicos. A produção de enzimas também foi estudada por Camassola & Dillon (2009) que utilizaram o bagaço da cana-de-açúcar na obtenção de celulasas e xilanases utilizando o fungo *Penicillium echinulatum* e Yoo *et al.* (2013) na produção simultânea de

celulases a partir da biomassa lignocelulósica do bagaço da cana de açúcar, assim como Cunha *et al.* (2014) que estudou a liquefação de bagaço da cana para a produção de enzimas celulases.

Outra rota de utilização foi investigada por Laopaiboom *et al.* (2010) que estudaram a aplicação do bagaço da cana-de-açúcar como um substrato para a produção de ácido láctico, além de investigarem as condições ótimas para hidrólise ácida do bagaço. Já Chen *et al.* (2016) relatam em seus estudos a utilização do bagaço da cana na produção de ácido succínico.

No contexto do bioetanol Neves *et al.* (2016) estudaram a produção de etanol celulósico a partir de bagaço da cana por explosão a vapor, assim como Kumar *et al.* (2015) que trabalharam na produção de etanol contínuo a partir de hidrolisado de bagaço da cana em altas temperaturas com reciclo celular e *in-situ* na recuperação de etanol. Outros autores como Dias *et al.* (2012) estudaram o uso do bagaço da cana-de-açúcar na produção biocombustível, salienta que é uma alternativa para redução da emissão de poluentes atmosféricos, além do ganho econômico. Singh *et al.* (2013) utilizaram o bagaço da cana-de-açúcar como substrato para produção de enzimas e o hidrolisado na produção de etanol.

Nunes *et al.* (2013), explorou o potencial de produção de etanol de segunda geração como forma de aproveitamento de resíduos agroindustriais ao comparar a disponibilidade e eficiência do bagaço e palha da cana-de-açúcar, palha de trigo, arroz, entre outras.

Além da aplicabilidade na produção de etanol combustível podemos citar Kong *et al.* (2016) trabalharam com a produção de biobutanol a partir do hidrolisado de bagaço da cana gerado com o auxílio de gama-valerolactona. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos na produção, melhoramento e utilização do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de etanol como: Silva *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da taxa de agitação, aeração e energia a necessária na produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana.

Entre outras aplicações inusitadas temos Mali *et al.* (2010) relatam em seus experimentos a produção de espumas biodegradáveis de amido de mandioca reforçadas com fibras do bagaço da cana, através do processo de extrusão, conferindo características peculiares à espuma. Portador *et al.* (2012)

trabalharam com a produção e caracterização de carvão ativado a partir da pirólise do bagaço da cana sul Africano.

Baêta *et al.* (2016) empregaram o bagaço da cana-de-açúcar na produção de metano a partir do hidrolisado de hemicelulose. Já Mesa *et al.* (2014) estudaram a reestruturação do processo de produção de furfural e xilose a partir do bagaço da cana em um conceito de biorrefinaria para produção de bioetanol.

Existem inúmeras aplicações e estudos para utilização do bagaço e seus compostos nos mais variados produtos e processos. Entretanto, a matéria prima em questão apresenta estrutura e composição complexa, devida suas características químicas e morfológicas, assim como os demais resíduos da agroindústria, limitando sua utilização. Portanto, a bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em produtos com maior valor agregado e outros de interesse comercial, necessitam em sua grande maioria passar por múltiplas etapas de transformação.

2.6 Bioconversão de Resíduos Lignocelulósicos

A Biotecnologia teve o seu início com os processos fermentativos, cuja utilização transcende eras de existência e se desponta no atual cenário mundial como uma das alternativas para o desenvolvimento de processos mais eficazes e limpos. A busca por processos como este, que consumam menor quantidade de recursos naturais com menor geração de resíduos, ainda é um desafio. Contudo, avanços já são demonstrados como os processos que utilizam resíduos como matéria prima na geração de novos produtos, além de serem aplicados na geração de energia e entre outros fins mais nobres, inibindo a perda de materiais valiosos e contribuindo para a conservação do meio ambiente.

Os processos de bioconversão da biomassa lignocelulósica em produtos úteis se destacam em relação aos processos químicos convencionais. Portanto, a utilização do bagaço da cana-de-açúcar em bioprocessos é uma alternativa viável para produção de insumos para as indústrias e com perspectiva promissoras em solucionar o problema da poluição ambiental. Entre os possíveis produtos derivados do bagaço da cana-de-açúcar estão às

enzimas do complexo celulósico, vista como uma alternativa para as indústrias obterem essas enzimas com menores custos, em relação às disponíveis no mercado.

O processo de obtenção de produtos a partir da biomassa lignocelulósica requer uma série de etapas: de pré-tratamento químico, físico ou biológico da biomassa; de hidrólise do complexo celulolítico a moléculas metabolizáveis; de fermentação das moléculas hidrolisadas e etapa acabamento para separação e purificação dos produtos obtidos no processo de bioconversão (SCHEUFELE, 2012).

A bioconversão de materiais lignocelulósicos é possível mediante o emprego de micro-organismos caracterizados como produtores de enzimas específicas capazes de hidrolisar a celulose, hemicelulose e lignina. Basicamente dois grupos de enzimas são responsáveis pela hidrólise lignocelulósica, as enzimas hidrolíticas e oxidativas. As enzimas hidrolíticas celulases, β -glicosidase, xilanase, entre outras, são responsáveis pela conversão da fração de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, açúcares simples para posterior fermentação (GOTTSCHALK *et al.* 2016). As enzimas oxidativas lactase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, possuem a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina, rompendo ligações liberando substâncias mais solúveis e expondo as cadeias celulósicas a ação das demais enzimas (BUSWELL *et al.* 1996). A lignina é um dos fatores que limitam a hidrólise da biomassa lignocelulósica, sua degradação e/ou biotransformação permite que as enzimas hidrolíticas entrem em ação atuando nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos (FERREIRA, 2009). Portanto, para fazer uso da biomassa lignocelulósica é preciso primeiramente um pré-tratamento para melhorar as características do material, desestabilizando a matriz lignocelulósica viabilizando sua utilização.

2.7 Pré-tratamento

Os processos de pré-tratamento tem como finalidade facilitar o processo de hidrólise, desestruturar matriz de lignina, reduzindo a cristalinidade da estrutura celulósica, aumentar a exposição das fibras de celulose

melhorando sua digestibilidade (RABELO *et al.* 2011; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

O pré-tratamento consiste em uma das etapas operacionais relevantes do processo e está relacionada diretamente com os custos e rendimento ao final do processamento. Geralmente, deve apresentar robustez para sobressair as variações da biomassa, simplicidade, segurança, baixo consumo de produtos químicos, não dar origem a novos resíduos químicos perigosos para meio ambiente, além de ser economicamente viável. Cada pré-tratamento apresenta um efeito singular e um mecanismo de ação diferente sobre a celulose, hemicelulose e lignina, capaz de causar modificações químicas e/ou físicas na rede intrincada de hemicelulose e lignina aumentando o acesso de enzimas hidrolíticas à celulose (MILAGRES *et al.* 2011; MENDES, 2010).

Nos últimos anos já foram desenvolvidos inúmeros trabalhos sobre o assunto, na busca pelo melhor método para o tratamento da biomassa lignocelulósica para os mais variados fins. Os pré-tratamentos podem ser divididos em químicos, físicos e biológicos ou uma possível sinergia ente esses processos que resultem em uma maior eficiência nas etapas posteriores de hidrólise, fermentação e acabamento (SARKAR *et al.* 2012, RABELO, 2007).

Entre os pré-tratamentos existentes, aqueles que associam princípios físicos e químicos geralmente apresentam melhor resultados no fracionamento da biomassa lignocelulósica. A literatura reporta estudos realizados empregando esses princípios como pré-tratamento, temos: ácidos orgânicos (TRZCINSKI & STUCKEY, 2015; LEE & JEFFRIES, 2011), pré-tratamento alcalino (BALI *et al.* 2015; JANU *et al.* 2011; YOO *et al.* 2011), pré-tratamento hidrotérmico (CANTERO *et al.* 2015; ABDULLAH *et al.* 2014; JACQUET *et al.* 2012), pré-tratamento físico (CHEN *et al.* 2014; HAGHIGHI *et al.* 2013; SILVA *et al.* 2010), pré-tratamento biológicos (DIONISI *et al.* 2015; KHARE *et al.* 2015; RABEMANOLONTSOA *et al.* 2015; PLÁCIDO & CAPAREDA, 2015). Contudo, a associação de um ou mais pré-tratamentos, podem contribuir mais com os processos de hidrólise e fermentação, maximizando os rendimentos e reduzindo desperdício de matéria-prima e reagentes (SHIRKAVANDA *et al.* 2016; HAMIDREZA *et al.* 2015).

Entre os vários estudos realizados a respeito, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio ainda é um dos mais empregados e promissores, pois é

bastante seletivo na degradação da lignina, aumenta consideravelmente a digestibilidade enzimática e reduz a cristalinidade da celulose, além da vantagem do tratamento ser realizado a temperatura ambiente e pressão atmosférica, contribuindo para economia de energia, não deixa resquícios dos reagentes na biomassa e não gera inibidores para as etapas posteriores de hidrólise/fermentação (RABELO *et al.* 2014; RABELO *et al.* 2011; CHENG *et al.* 2008).

2.8 Micro-organismos Lignocelulósicos

Há uma grande variedade de micro-organismos na natureza envolvidos na produção de celulases por meio da degradação da celulose incluindo fungos, bactérias e leveduras (SINGHANIA *et al.* 2010). A maioria das celulases investigadas para aplicações industriais são de fungos filamentosos. Dentre os fungos temos os causadores de podridão branca (*white-rot fungi*), que possuem um sistema enzimático único de produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas e tendem a degradar principalmente a lignina e hemicelulose, em contraste temos os fungos da podridão parda (*Brown-rot fungi*) que degradam polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e causam modificações leves na molécula de lignina, sem degradá-la, contudo os fungos podridão mole (*Soft rot fungi*) se sobressaem aos demais, pois degradam simultaneamente a lignina e os demais polissacarídeos. (SHIRKAVANDA *et al.* 2016; SINDHU *et al.* 2016a; MONRROY *et al.* 2011).

Com o intuito de melhorar os níveis de produção de enzimas vários trabalhos têm sido desenvolvidos na seleção de micro-organismo celulolíticos produtores de celulases, incluindo técnicas de melhoramento genético, mutação clássica (seleção natural), expressão gênica (metageneses) e também a produção de micro-organismos geneticamente modificados (CHANDEL *et al.* 2012; CASTRO & PEREIRA JR, 2010; FARINAS *et al.* 2008; DILLON *et al.* 2006).

Os micro-organismos que utilizam a biomassa lignocelulósica como fonte de carbono/energia, atuam principalmente nas cadeias poliméricas, degradando e dando origem a cadeias menores. Dentre os micro-organismos que são alvos de estudos e vem sendo aplicados na degradação da biomassa

lignocelulósica e caracterizados como produtores de celulases estão: *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus niger*, *Humicola grisea*, *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma reesei*, *Pleurotus ostreatus*, *Penicillium citrinum*, *Cellulomonas ANS-NS2*, *Cellulomonas biazotea*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* CBTTK, entre outros (KUHADA *et al.* 2016; SCHEUFELE, 2012; RABELO, 2007).

A celulase comercial é comumente produzida a partir de duas linhagens de fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (SINGHANIA *et al.* 2010). Estes fungos possuem boa eficiência na geração de enzimas celulolíticas facilitando a conversão enzimática da celulose, contudo, o *Aspergillus niger* destaca-se, pois está presente normalmente no meio ambiente, em frutas e outros alimentos na forma de bolor negro, e geralmente suas enzimas são destinadas ao uso alimentício. Algumas espécies de *Aspergillus* são classificadas como GRAS (*Geralmente Reconhecido Como Seguro*), pela *Food and Drug Administration (FDA)*. Entre as enzimas produzidas pelas espécies *Aspergillus* temos aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease e xilanase (ALCANO *et al.* 2014; ORLANDELLI *et al.* 2012; SILVA *et al.* 2009; CUI *et al.* 1998).

2.9 Enzimas Celulolíticas

É um conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose, que atuam como biocatalizadores em sinergia, mesmo que as enzimas pertençam a diferentes espécies, apresentaram um sistema de degradação da celulose similar. (RABELO, 2010)

As enzimas do complexo celulósico pertencem as O-Glicosil hidrolase (EC 3.2.1-), enzimas as quais hidrolisam ligações glicosídicas, entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidrato e um não carboidrato. Os três maiores grupos de celulases responsáveis pela hidrólise são endoglucanases (EG); exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases. Essas enzimas atuam na despolimerização eficaz das cadeias de celulose no substrato lignocelulósico para produzir unidades de açúcares menores que consistam de

celobiose e glicose (GUPTA *et al.* 2016; BEHERA & RAY, 2016; YOON *et al.* 2014; RABELO, 2010).

Geralmente a cooperação simultânea entre as enzimas decorre primeiramente pela ação da Endoglucanases, que clivam as ligações internas (glicosídicas) de forma aleatória nas fibras de celulose, originando novas extremidades livres, sendo a principal responsável pela redução do grau de polimerização. Essas extremidades são alvo de atuação da exoglucanases ou celobiohidrolases que interagem clivando as unidades de celulose em glicose ou celobiose (dímero de glicose), e por fim hidrolisada pela β -glicosidases formando moléculas de glicose (Figura 2.6). (GUPTA *et al.* 2016; BEHERA & RAY, 2016; YOON *et al.* 2014; RABELO, 2010; BASSO *et al.* 2010; CASTRO & PEREIRA JR. 2010).

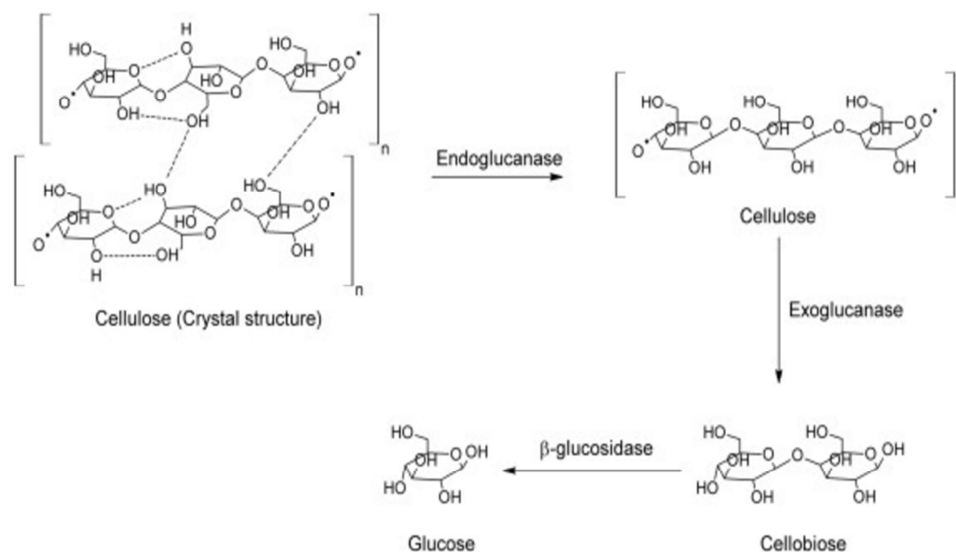


Figura 2.6: Mecanismo de hidrólise de celulose pelas celulasas. Fonte: Gupta *et al.* 2016.

As celulasas desempenham um importante papel na conversão da biomassa lignocelulósica e a classe de enzimas de maior comercialização e produção e sua grande procura é um reflexo da sua aplicabilidade no setor de papel e celulose, alimentos, bebidas e ração animal. O montante comercializado e produzido deve ser incrementado devido às novas aplicações e principalmente devido a produção de bioetanol (YOON *et al.* 2014; CHANDEL *et al.* 2012; SINGHANIA *et al.* 2010).

O mercado global de enzimas movimentou aproximadamente R\$ 16,8 milhões em 2015, o mercado brasileiro de enzimas faturou cerca de 6% desse montante. As pesquisas que envolvem a otimização do processo e a produção de enzimas com potencial industrial podem contribuir com a diversificação do comércio mundial (NOVOZYMES, 2015; MENDES *et al.* 2011).

2.10 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O processo de fermentação é fundamentada basicamente de dois tipos, Fermentação submersa (FSm) e Fermentação em estado sólido (FES), e se diferenciam apenas na quantidade de água livre presente no meio.

A FES tem sido definido como um bioprocessamento que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre. Entretanto, o substrato ou matriz sólida deve possuir a umidade necessária para suportar o crescimento e atividade metabólica do microrganismo, ainda deve ser fonte de carbono e outros nutrientes, proporcionando condições próximas a da natureza (THOMAS *et al.* 2013).

É um processo que vem ganhando atenção nos últimos anos no desenvolvimento e aplicação em bioprocessos industriais, sobressaindo sobre a FSm, principalmente devido à menor necessidade de energia, rendimentos e concentrações mais elevadas de metabólitos secundários ou enzimas, condições de cultivo próximas ao meio natural, menor inibição pelo substrato, menor volume de águas residuais, utilização de resíduos sólidos agroindustriais e menor risco de contaminação bacteriana. Contudo, o substrato ou matriz geralmente necessita de pré-tratamento, e dependendo da intensidade pode provocar modificações na estrutura do substrato, conseqüentemente altera o controle dos parâmetros do processo, tais como pH, umidade e temperatura, o que em larga escala são de difícil automação (FARINAS, 2015; HANSEN *et al.* 2015; THOMAS *et al.* 2013; GONZALEZ, 2012).

A Tabela 2.3 lista alguns resíduos que tem sido estudado na FES, apresentando um grande potencial, principalmente na bioconversão de resíduos da agroindústria na produção de enzimas (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Resíduos lignocelulósicos utilizados em FES na produção de enzimas .

Resíduo	Micro-organismo	Enzima	Referencia
Casca de laranja	<i>T. viride</i>	β -glicosidases	Irshad <i>et al.</i> 2012
Casca de laranja	<i>T. viride</i>	Endoglucanase	Irshad <i>et al.</i> 2013
Palha de trigo	<i>P.chrysosporium</i>	Lignin peroxidase Manganese peroxidase	Asgher <i>et al.</i> 2011
Espiga de milho	<i>A. niger</i>	Protease	Ahmed <i>et al.</i> 2011
Bagaço da cana	<i>T. viride</i>	Celulases	Irshad <i>et al.</i> 2013

A produção de enzimas fúngicas em escala industrial tem sido realizado na sua grande maioria por fungos em meio líquido (FSm), pois o controle do processo e tecnologicamente mais fácil e apresenta rendimento de produção satisfatórios, mas muitos avanços tecnológicos têm sido incorporados aos processos de fermentação em substrato sólido (FES), favorecendo o aumento dos rendimentos na produção de enzimas (BORTOLAZZO, 2011).

2.11 Extração Enzimática

Diversas pesquisas têm sido realizadas na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas ou pelo melhoramento genético de espécies de micro-organismos. A extração sólido-líquido das enzimas obtidas por FES com fungos é uma etapa crucial na obtenção dos extratos enzimáticos que serão usados nos processos de hidrólise de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço da cana-de-açúcar, para fins de geração de açúcares fermentescíveis que servirão de matéria prima em uma fermentação posterior com leveduras pra obtenção de bioetanol.

No processo de obtenção dos extratos enzimáticos o principal método de extração, consiste na homogeneização do fermentado, obtido a partir FES, com um líquido extrator, geralmente uma solução tampão, mantida sob agitação, temperatura e pH controlados.

Singhania *et al.* (2015), na produção de celulase através de FES (farelo de trigo + Avicel) por *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8, extraíram as enzimas

com 50 mL de tampão de citrato 0,05 M pH 4,8 com 0,1% de Tween, sendo a mistura homogeneizada em um agitador a 180 rpm durante 1 h.

Gasparotto *et al.* (2014), extraíram as enzimas FPase, xilanase, exocelulases e endocelulases a partir do fermentado (FES) do bagaço da cana, com 100 mL de tampão 50 mM de acetato de sódio / ácido acético (pH 4,8) em um agitador orbital a 120 rpm e 28°C durante 1 hora.

Lima *et al.* (2014), extraíram fitase do fermentado sólido do farelo de arroz, adicionando 50 mL de água deionizada e mantendo a mistura sob agitação em shaker a 150 rpm e 30°C por 30 minutos.

Santos *et al.* (2015), obtiveram endoglucanase e celulasas totais a partir do fermentado sólido da palma forrageira por extração mecânica (filtração por pressão) com solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM.

Santos *et al.* (2015b), utilizaram para extração das enzimas pectinase e poligalactunorase obtidas a partir FES do coco verde e sabugo de milho, 50 mL de água gelada, sendo homogeneizado em incubador rotativo (shaker) à 30°C por um período de 30 min e filtrado em gaze.

Freire *et al.* (2015), extraíram as enzimas lactase, CMCase de dois fermentados sólidos, palha de milho verde suplementada com cana-de-açúcar e bagaço de coco verde suplementado com farinha de soja, adicionando 60 mL de solução tampão de acetato de sódio com pH 4,8 a 50 mM, a suspensão foi agitada manualmente durante 5 minutos, seguida de agitação a 120 rpm por 1 h em incubadora com agitação orbital.

Karp *et al.* (2012), na produção de lactase por FES do bagaço da cana-de-açúcar com o fungo *Pleurotus ostreatus*, utilizaram a extração sólido-líquido com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo o inibidor de protease (PMSF), a mistura foi homogeneizada em vortex durante 1 min e centrifugou-se para 7500 rpm, 4 °C, 45 min.

Santos *et al.* (2012b), obtiveram as CMCase, Fpase e xilanase do FES de casca de batata, usando o fungo *Aspergillus niger*, as enzima foram extraídas mecanicamente utilizando uma solução tampão de citrato de sódio com um pH de 4,8 a 50 mM.

Dhilon *et al.* (2012), utilizaram o bagaço de maçã com substrato na FES com fungo *Aspergillus niger* NRRL-567 para produção das enzimas FPase, CMCase, β -glicosidase e xilanase, a extração foi realizada a partir de 1

g fo fermentado misturado com 15 mL de tampão citrato 100 mM com pH 4,8, incubadas durante 30 minutos sob agitação a 200 rpm.

Narra *et al.* (2012), produziram celulasas por FES utilizando a palha de arroz como substrato com o fungo *Aspergillus terreus*, as enzimas foram extraída da matriz sólida duas vezes com tampão de acetato de sódio 0,05 M pH 4,8 e filtrada através de um pano molhado de dupla camada de musselina por espremedura completa.

Farinas *et al.* (2012), obtiveram celulase e xilanase por FES a partir do farelo de trigo utilizando *Aspergillus niger*, as enzimas foram extraídas com tampão acetato (0,2 mol.L⁻¹) pH 4,5, as amostras foram agitadas a 120 rpm durante 1 h e a solução enzimática foi recuperada por filtração.

A extração de compostos químicos é uma das áreas de pesquisa mais importantes para as indústrias químicas. As técnicas tradicionais utilizadas para a extração com solventes e outras soluções estão associadas diretamente a longos tempos de extração e geralmente rendimentos baixos, além de consumirem grandes quantidades de solventes/reagentes, resultando em muitos casos uma fraca eficiência de extração.

Com base no levantamento bibliográfico foi possível verificar que método sólido-líquido é o mais utilizado na extração de enzimas, entretanto apresenta diversas variações e até o momento não se tem relatos da otimização da extração simultânea de celulasas do tipo FPase, CMCase e β -glicosidase e/ou emprego de outros métodos e ferramentas na extração dessas enzimas.

2.12 Hidrólise Enzimática

O processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica consiste em uma reação química catalisada por enzimas, que promovem a clivagem ou sacarificação das moléculas de celulose e hemicelulose. Os produtos da hidrólise são frequentemente açúcares redutores, incluindo a glicose, que tem despertado um grande interesse por parte da indústria de biocombustível devido a possibilidade de sua conversão em etanol. As enzimas no processo de hidrólise atuam como biocatalisadores e apresentam alta especificidade, atuam em sinergia, agindo em vários pontos das moléculas de

celulose e hemicelulose simultaneamente, clivando ligações internas e extremas promovendo a liberação de açúcares redutores (KOSTYLEV & WILSON, 2012; BORTOLAZZO, 2011; SHAIKHA *et al.* 2011).

A rota enzimática vem sendo estudada e aplicada como uma das alternativas para a hidrólise de matérias lignocelulósicas na geração de etanol e outros produtos. Entretanto, a biomassa deve passar por inúmeras etapas de preparação, para eliminar ou desestruturar a lignina e expor mais a celulose e hemicelulose ao ataque das enzimas, reduzindo o tempo de processo de hidrólise e fermentação. Entre as vantagens do uso de enzimas como biocatalizadores são as condições mais brandas de operação, o que reduz a degradação do produto, formação de inibidores, eliminando etapas de purificação e remoção de subprodutos indesejados, além do menor custo de manutenção, se comparado com a hidrólise alcalina ou ácida (KOSTYLEV & WILSON, 2012; SOCCOL *et al.* 2010; ALVIRA *et al.* 2010; CASTRO & PEREIRA JR, 2010; BALAT *et al.* 2008).

As reações enzimáticas são amplamente afetadas por variações na temperatura, pH, porosidade, presença de indutores e inibidores, além das enzimas serem incapazes de catalisar uma rápida e completa hidrólise da celulose nativa em glicose, sendo que a taxa de conversão varia de acordo com o tipo de resíduo, concentração da enzima e tempo de hidrólise. Taxas aceitáveis de hidrólise enzimática vêm sendo obtidas somente após o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, tornando o substrato mais suscetível ao ataque das enzimas. (ALVIRA *et al.* 2010; BASSO, 2010). Contudo, alguns estudos têm demonstrado uma maior taxa de sacarificação da celulose pode ser obtida com o auxílio do efeito do ultrassom, o qual auxilia favorecendo o poder catalítico das enzimas contribuindo para uma maior eficiência na etapa de hidrólise (SZABÓ & CSISZÁR, 2013; BENAZZI *et al.* 2013; LEÃES *et al.* 2013; WANG *et al.* 2011). Neste contexto a hidrólise enzimática assistida por ultrassom do bagaço da cana-de-açúcar pode ser uma das alternativas viáveis para aumentar a atividade enzimática, contribuindo para redução do tempo de reação, tornando o processo mais eficiente e competitivo em relação ao processo de hidrólise química.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado na fermentação e produção das enzimas celulolíticas foi o fungo *Aspergillus niger*, cepa local e isolada do solo, cedido pelo laboratório de microbiologia do curso de Ciências Biológicas da Unioeste, Campus Cascavel-PR, sendo reativado em meio Potato Dextrose Agar (PDA) em estufa microbiológica (Quimis) a 30°C durante 7 dias.

3.2 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado preparando-se 700 mL de meio PDA em erlenmeyer de 1000 mL, sendo levado à estufa microbiológica a 30 °C durante um período de 7 dias. Em seguida, realizou-se a raspagem dos esporos em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um bastão de vidro adicionando-se aproximadamente 150 mL de água destilada estéril, 0,1 mL de Tween 80. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em algodão estéril e armazenada sob refrigeração em geladeira.

A contagem de esporos foi realizada em câmara de contagem (Neubauer) em microscópio ótico (Bioval) com aumento de 400 vezes. A contagem foi realizada em triplicata e calculou-se a média da concentração de solução de esporos.

3.3 Resíduo Lignocelulósico Utilizado

O substrato sólido utilizado no processo de fermentação e produção das enzimas foi o bagaço da cana-de-açúcar, o qual foi cedido por uma usina de açúcar e álcool da região noroeste do Paraná, sendo acondicionado sob refrigeração.

3.3.1 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar

O pré-tratamento utilizado foi o alcalino oxidativo, conforme a metodologia adaptada por Aguiar (2010). Inicialmente, o bagaço foi imerso em água destilada por um período de 6 horas, para remoção de conteúdo solúvel, em seguida foi levado em água corrente. O bagaço lavado foi disposto em bandejas metálicas e levado à estufa de secagem, mantendo uma espessura de sólido de 2 cm em temperatura de 50°C durante um período de 5 dias. Após a secagem o bagaço da cana de açúcar foi armazenado em sacos plásticos em freezer (-18°C), para conservar suas características.

O tratamento alcalino oxidativo foi realizado em frascos erlenmeyers de 200 mL no qual foram adicionados a massa do resíduo, foi adicionada uma solução de peróxido de hidrogênio 1% na proporção de 50:1 (mL/g). Ajustou-se o pH da solução com hidróxido de sódio (NaOH) até um valor de pH igual a 11.5. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas em incubadora *Shaker* (SL222/CFR) a 150 rpm. O conteúdo insolúvel obtido após a incubação foi filtrado e lavado em água potável, até que o filtrado atingisse pH neutro (pH = 7). O bagaço tratado foi disposto novamente em bandeja de metal e seco em estufa de secagem a uma temperatura de 50 °C durante 3 dias. O peróxido de hidrogênio utilizado nesta etapa foi padronizado por método titulométrico com permanganato de potássio segundo Voll (2008), citado por Scheufele (2012).

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada utilizando frascos erlenmeyers de 250 mL. Em cada frasco erlenmeyer foi inserido 1,0 g de substrato (bagaço da cana pré-tratado), em seguida foram autoclavados (Phoenix AV75) e esterilizados por 20 minutos a 121°C. Após, entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente foi adicionada a solução de esporos de *Aspergillus niger*, logo depois a solução nutriente, que foi preparada seguindo a composição apresentada na Tabela 3.1, sendo ambos os processos realizados em câmara de fluxo laminar. Os erlenmeyers foram dispostos em estufa bacteriológica (Quimis), retirados no tempo de 48 horas de fermentação (ponto

ótimo), conforme Boico (2016), os fermentados obtidos foram armazenados para posterior extração das enzimas.

Tabela 3.1: Composição da solução nutriente.

Nutriente	Quantidade
KH ₂ PO ₄	2,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	1,56 mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,40 m g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,70 mg.L ⁻¹
Peptona Carne	1,00 g.L ⁻¹
Permeado de soro de leite	100,0 g.L ⁻¹

BOICO, (2016)

3.5 Extração Enzimática

O processo de extração ocorreu conforme método descrito por Scheufele (2012), adicionando-se uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,0, na proporção de 1:17 (g de sólido/mL de solução tampão) em cada frasco contendo o material resultante da fermentação em estado sólido, em seguida foram inseridos em incubadora *Shaker* por 2h, a uma temperatura de 35°C com agitação de 150 rpm. O sólido foi removido por filtração a vácuo com papel filtro, filtrado e posteriormente centrifugado (centrífuga Parsec CT – 0603) por 20 min em rotação de 3000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi armazenado em freezer (-18°C) em frascos de polietileno de alta densidade (PEAD) até a posterior realização das análises.

3.5.1 Planejamentos experimentais

Com o objetivo de buscar a melhor resposta no processo de extração foram elaborados planejamentos experimentais buscando a melhor condição para extração multienzimática, associando ao método de extração o uso do

ultrassom e variação dos parâmetros tempo, temperatura, pH envolvidos no processo. As respostas obtidas e analisadas nos planejamentos foram as atividades enzimáticas da FPase, CMCase e β -glicosidase.

Para avaliação da extração sólido-líquido foram realizadas fermentações idênticas, seguindo os mesmo critérios de preparo. Primeiramente foi elaborado um planejamento a partir da Matriz de Doehlert (MD) tendo como variáveis o uso do ultrassom e pH. O uso do ultrassom (ULTRA) consistiu em sonicar a solução do meio fermentado com o liquido extrator (tampão) por 10 minutos, onde variou-se a intensidade (W/mL), foi utilizado um ultrassom de ponteiros (marca Ultranique, modelo QR500, 20 kHz). O pH dos extratos enzimáticos foram corrigido utilizando soluções de HCL e NaOH 1N.

Os níveis utilizados para a potência do ultrassom e o tempo de utilização foram definidos com base nos estudos realizados por Leite *et al.* (2016), Lemes et al. (2013), Nguyen & Le (2013), Wang *et al.* (2012), Ozbek & Ulgen (2000). A Figura 3.1 ilustra a distribuição espacial dos pontos experimentais e Tabela 3.2 apresenta os níveis considerados e as variáveis para a Matriz de Doehlert.

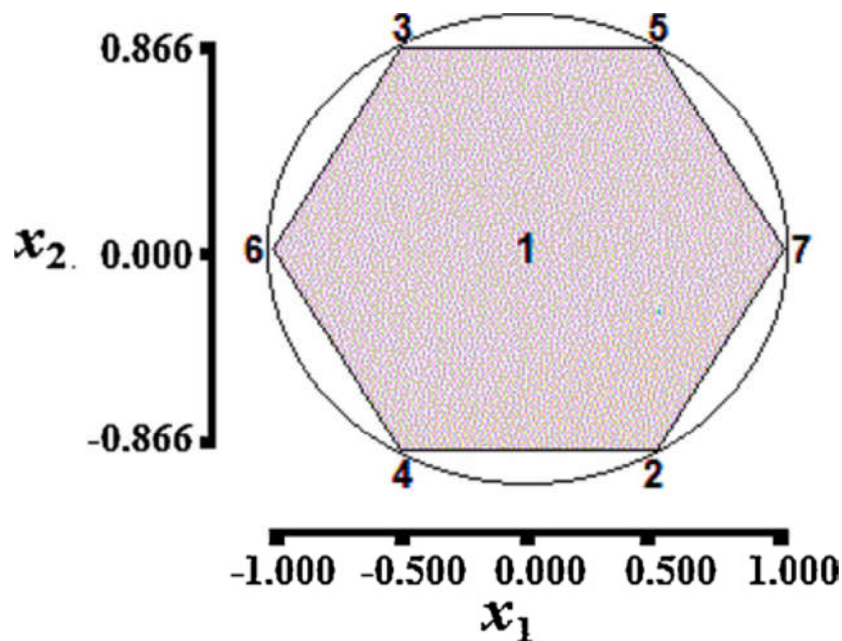


Figura 3.1: Distribuição espacial de pontos experimentais em um projeto Doehlert de dois fatores.

Tabela 3.2: Níveis e valores reais das variáveis avaliadas no planejamento Doehlert de duas variáveis

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1	-0.5	0	0.5	1
Potência Ultrassom (W.mL) – X1	0,8	1,0	1,2	1,6	2,0
pH – X2	Níveis				
	-0.866	0		0.866	
	5	7	9		

Posteriormente foi realizado um planejamento fatorial incompleto Box-Behnken de três variáveis. Foram realizadas novas fermentações, preparadas de forma idênticas conforme descrito anteriormente. O planejamento considera três níveis (-1, 0, +1), sendo usados três fatores como variáveis independentes: temperatura (°C), tempo (min) e pH. A Tabela 3.3 apresenta o planejamento experimental elaborado, com as variáveis e os níveis utilizados.

Tabela 3.3: Parâmetros experimentais e os níveis codificados para o planejamento Box-Behnken.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo (min)	10	35	60
Temperatura (°C)	25	35	45
pH	5	7	9

3.6 Otimização das Condições de Extração

Para o estudo da otimização da extração das enzimas celulolíticas utilizou-se o software computacional STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc). A partir do programa foi possível obter as Tabelas dos efeitos para avaliar a influência das variáveis e de suas interações sobre a resposta de atividade enzimática (AE), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi realizada a análise de variância (ANOVA), que permite avaliar a validade do

modelo matemático obtido, pelo teste F, coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a função desejabilidade (*desirability*) que permite obter as melhores condições das variáveis estudadas na extração multienzimático.

3.7 Hidrólise Enzimática

Foi utilizado um arranjo do tipo ANOVA tendo como variáveis o uso do ultrassom e a relação sólido:líquido (RSL), tomada como bloco. A partir da ANOVA foi possível avaliar os efeitos principais e de interação entre pré-tratamento e blocos.

A hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se tubos de ensaio, em cada tubo foi inserido o bagaço da cana (pré-tratado), em proporções previamente definidas, em seguida foi adicionado 1170 μ L tampão citrato 50 mM, pH 4.8. Os tubos foram dispostos em banho-maria ultratermostático por alguns minutos, para entrar em equilíbrio, logo após foi adicionado 330 μ L de extrato enzimático. A hidrólise foi conduzida parte em um banho ultratermostático e parte em um banho ultrassônico (marca Ultranique, modelo Q5.9/37, 37 kHz), ambos foram mantidos por 60 minutos a 50°C, sendo agitados em intervalos de 10 minutos (tubo por tubo). Após o término do tempo de incubação procedeu-se a análise de AR e calculou-se AE conforme o item 3.7, todos os ensaios e as análises foram realizados em triplicata.

3.8 Caracterização parcial da FPase

A estabilidade térmica da FPase foi estimada incubando-se 1 mL de extrato enzimático em tubos de ensaio, sendo dispostos em banho-maria ultratermostático em temperaturas ajustadas em 40, 50, 60 e 70°C por um período que variou de 0 a 200 minutos, tomando-se o cuidado de agitar os tubos em intervalos de 10 minutos. Foram retiradas alíquotas de 0,5 mL nos tempos 0, 25, 50, 100 e 200 minutos e imediatamente conduzidas ao ensaio de atividade enzimática da FPase, conforme o item 3.7. Os resultados foram expressos como atividade enzimática residual (%) em função do tempo de incubação para cada temperatura testada.

A avaliação da estabilidade ao pH para a FPase foi determinada por incubação durante 120 minutos retirando-se alíquotas da enzima nos tempos 0, 25, 50, 100 e 200 min de incubação nos pHs: 4,0; 5,0, 6,0 e 7,0 na temperaturas de 50°C. As alíquotas retiradas foram dosadas em termos de atividade enzimática residual da FPase em função do tempo de incubação para cada pH testado.

3.9 Métodos Analíticos

3.9.1 Determinação da Atividade Enzimática FPase

A determinação de atividade enzimática FPase, do complexo celulolítico foi realizado conforme o método de AE em papel filtro descrito por Ghose (1987). Em tubos de ensaio, inseriu-se uma tira de papel filtro qualitativo (J.Prolab) nas dimensões 1 x 6 cm, alcançando um peso de aproximadamente de 50 mg. Após, adicionou-se 1 mL de solução tampão citrato de sódio pH 4,8. Os tubos foram dispostos em banho-maria ultratermostático a uma temperatura de 50 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático, obtidos a partir das fermentações realizadas, e estes foram deixados no banho-maria por 60 minutos, agitando em intervalos de 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em paralelo realizou-se ensaios em branco substituindo-se o extrato enzimático por tampão citrato de sódio pH 4,8. Após o término do tempo de incubação em banho-maria, procedeu-se a determinação dos açúcares redutores (AR) e calculou-se a atividade enzimática (AE).

Para GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por min, ou seja, $U = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A partir da Equação 1, calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em $U \cdot \text{mL}^{-1}$.

$$AE(U \cdot \text{mL}^{-1}) = AR \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad (1)$$

onde: AR: açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (g.L^{-1}); V_T : volume total utilizado na hidrólise (tampão + extrato enzimático em mL); V_C : volume do caldo utilizado na hidrólise (mL); T_H : tempo de hidrólise (min) e 0,18 equivalente mássico de 1 μmol de glicose (mg).

3.9.2 Determinação da Atividade Enzimática CMCCase

A determinação de AE da CMCCase foi realizada conforme o método descrito por Garai & Kumar (2013). Em tubos de ensaio, inseriu-se 1mL de solução de substrato (1% p/v carboximetilcelulose), 0,9 mL de tampão 0,1 M de citrato de sódio pH 5,0. Os tubos foram dispostos em banho-maria ultratermostático à temperatura de 50 °C por alguns minutos. Em seguida, foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático em cada tubo, e estes foram deixados em banho-maria por 30 minutos, agitando em intervalos de 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em paralelo realizou-se ensaios em branco substituindo-se o extrato enzimático por tampão citrato de sódio pH 5,0. Após o término do tempo de incubação em banho-maria, procedeu-se a determinação dos açúcares redutores (AR) e calculou-se a atividade enzimática (AE) a partir da Equação 1, a qual foi expressa em U.mL^{-1} .

3.9.3 Determinação da Atividade Enzimática da β -glicosidase

O método para determinação da AE β -glicosidase é similar ao da CMCCase, com exceção ao substrato, sendo utilizado celobiose e similarmente a partir da Equação 1, calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em U.mL^{-1}

3.9.4 Determinação do Conteúdo de Açúcares Redutores (AR)

O método de determinação da concentração de açúcares redutores (AR) consiste em uma adaptação do método proposto por MILLER (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), que possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g.L^{-1} de açúcar redutor expresso como glicose.

A quantificação foi realizada misturando-se 0,2 mL do extrato enzimático, convenientemente diluído, com 0,2 mL do reagente DNS e levando ao banho aquecido a 100°C por 5 min. Resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 3,2 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro 12,3 g.L⁻¹. O branco foi preparado pela adição de 0,2 mL de água deionizada substituindo a amostra. A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800) em comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de glicose na faixa de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹ (Figura 3.1), foi construída nas mesmas condições da amostra, gerando um modelo de regressão linear e o coeficiente de determinação da concentração de glicose em função da absorbância medida.

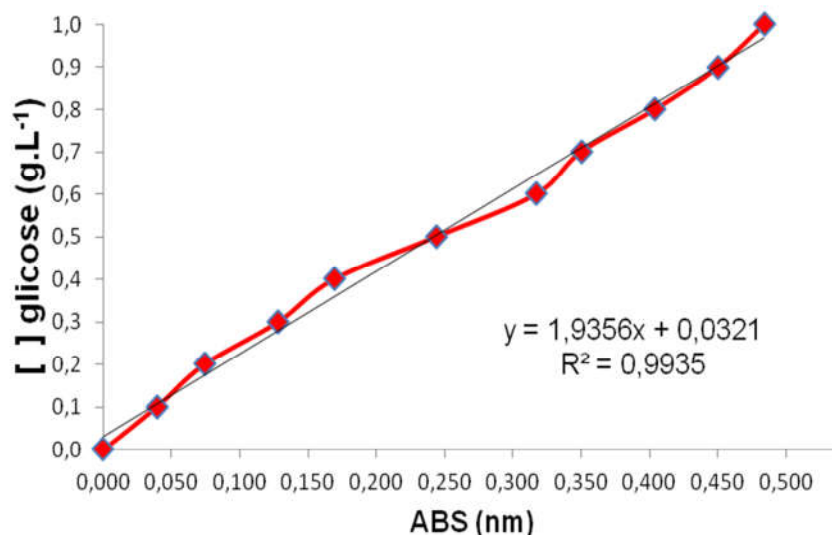


Figura 3.2: Curva padrão de glicose faixa de sensibilidade de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹.

3.9.5 Determinação do Teor de Proteína

A determinação da concentração de proteína se deu pelo método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na interação entre o corante *coomassie Brilliant Blue G 250* e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm.

Foram coletadas alíquotas de 100 μL de cada amostra e adicionadas em eppendorfs de 15 mL, juntamente com 1 mL do reagente de Bradford e homogeneizados com o auxílio de um vortex, tomou-se o cuidado de manter as amostras protegidas da luz. Após 5 minutos realizaram-se as leitura de absorbância, medida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800) em comprimento de onda de 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata e no preparo do branco utilizou-se água deionizada no lugar da amostra. O calculo da concentração de proteína foi feito a partir de uma curva padrão de proteína (Figura 3.2), utilizando como padrão albumina sérica bovina (BSA).

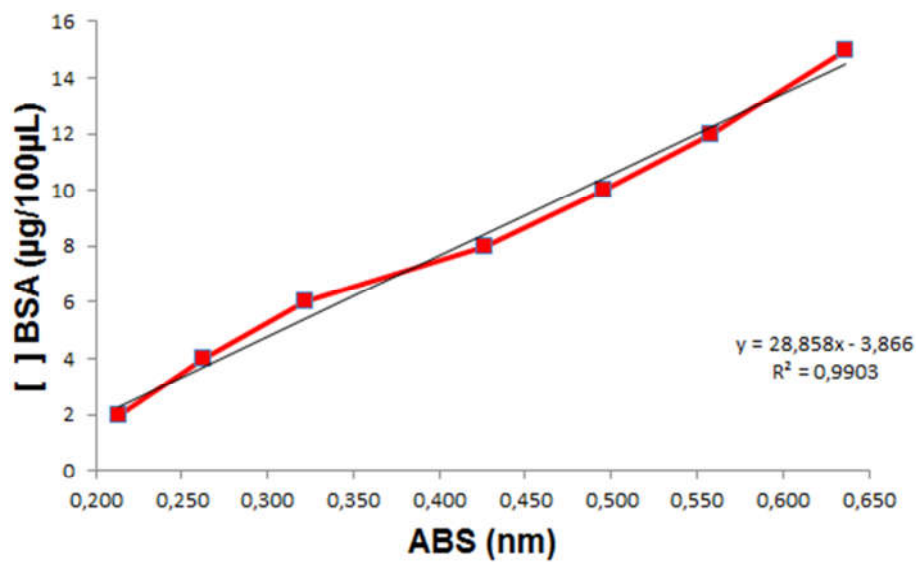


Figura 3.3: Curva padrão de proteína faixa de sensibilidade de 2 a 20 $\mu\text{g}.100 \mu\text{L}^{-1}$ e/ou 0,02 a 0,2 mg.mL^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada inicialmente a fermentação em estado sólido (FES) do bagaço da cana pré-tratado com o fungo *A. niger* com o intuito de se obter o material fermentado a ser usado nos testes de extração. As fermentações foram realizadas seguindo as condições ótimas determinadas por Boico (2016), na produção de celulases utilizando com substrato o bagaço da cana, cujo os resultados são apresentados na Figura 4.1.

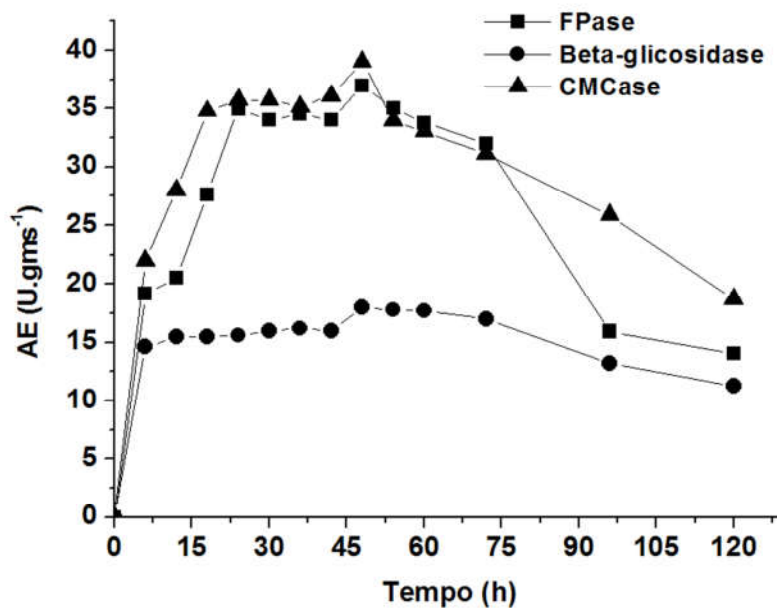


Figura 4.1: Variação da AE da FPase, β -glicosidase e CMCCase em função do tempo na FES com *Aspergillus niger*. Fonte: Boico (2016).

Segundo Boico (2016), avaliou a cinética de produção enzimática pelo fungo *Aspergillus niger* na FES do bagaço da cana e verificou que a atividade enzimática máxima no tempo de 48 h para as três enzimas avaliadas (FPase, β -glicosidase e CMCCase).

Assim, foram preparadas FES em frascos erlenmeyers, sendo um frasco para cada condição a ser testada no planejamento experimental descrito a seguir. As FES foram interrompidas no tempo de 48 h. Buscou-se avaliar pela matriz de Doehlert o efeito da utilização do ultrassom (Ultra) e pH no processo de extração das enzimas celulolíticas. Esse tipo de planejamento é uma alternativa muito útil e facilmente aplicado em processos de otimização, além

de oferecer vantagens em relação aos planejamentos DCCR (delineamento composto central rotacional) e PBB (planejamento de Box-Behnken), pois necessita de menos ensaios experimentais, pode se mover através de toda faixa (domínio) das variáveis e não há necessidade em se adotar o mesmo número de níveis para todas as variáveis (ARAÚJO *et al.*, 2012).

4.1 Avaliação do Efeito da Utilização do Ultrassom na Extração das Enzimas

Inicialmente foi elaborado um planejamento a partir da matriz de Doehlert para avaliar a influência do uso do ultrassom e pH na extração das enzimas FPase, CMCase e β -glicosidase. A extração foi realizada variando-se apenas o pH da solução de extração, logo após o término do tempo de incubação os frascos foram colocados sob os efeitos do ultrassom. A potência utilizada variou de 0,8 a 2,0 W para cada mL de líquido extrator utilizado, obedecendo a proporção fixa de 1:17 (g de sólido:mL de solução).

A Tabela 4.1 apresenta a matriz dos resultados do planejamento Doehlert com as variáveis codificadas e os resultados de AE ($U\ mL^{-1}$) obtidos para cada ensaio, considerando as enzimas FPase, CMCase e β -glicosidase.

Tabela 4.1: Matriz de dados do planejamento Doehlert com os resultados obtidos para AE ($U\ mL^{-1}$) das enzimas.

Ensaio	Ultrassom	pH	FPase	CMCase	β -glicosidase
1-a	0	0	0,354	0,311	1,586
1-b	0	0	0,349	0,322	1,291
1-c	0	0	0,362	0,338	1,287
1-d	0	0	0,342	0,314	1,485
2	0,5	-0,866	0,258	0,237	0,624
3	-0,5	0,866	0,248	0,221	0,764
4	-0,5	-0,866	0,266	0,246	0,646
5	0,5	0,866	0,265	0,244	0,985
6	-1	0	0,331	0,315	1,189
7	1	0	0,342	0,298	1,256

Observa-se na Tabela 4.1 que os melhores resultados de AE das enzimas ocorreram nos ensaios 1(a) até 1(d), que correspondem aos pontos centrais do planejamento, resultados muito próximos a esses são encontrados nos ensaios 6 e 7. Os valores máximos de AE observados para FPase, CMCase e β -glicosidase foram 0,362, 0,338 e 1,586 U mL⁻¹, respectivamente.

Na Tabela 4.2 são observados os resultados estatísticos da matriz de Doehlert, onde são apresentados para cada enzima apenas o p-valor de cada fator, incluindo a interação, onde (L) é referente ao termo linear e (Q) o termo quadrático do modelo. Os valores em negrito são referentes às variáveis significativas do modelo.

Tabela 4.2: p-valor das AEs da FPase, CMCase e β -glicosidase para a Matriz de Doehlert ($\alpha = 0,05$).

Fator	p-valor		
	FPase	CMCase	β -glicosidases
Intercepto.	0,000004	0,000015	0,000315
(1) ultrassom (L)	0,365893	0,665695	0,562742
ultrassom (Q)	0,127649	0,253770	0,235772
(2) pH (L)	0,560272	0,510741	0,204451
pH (Q)	0,000510	0,001976	0,007941
1L by 2L	0,234375	0,277626	0,472322

FPase: $R^2=0,9888$, $R^2_{AJ}=0,9749$; CMCase: $R^2=0,9634$, $R^2_{AJ}=0,9176$; β -glicosidase: $R^2=0,9342$, $R^2_{AJ}=0,8520$

O p-valor indica se o fator é significativo ou não para um nível de significância “ α ” estabelecido. Assim, os fatores avaliados são considerados significativos caso o p-valor fosse menor que o nível de significância $\alpha = 0,05$. Verificou-se que apenas o termo pH (Q) do modelo influenciou significativamente as AEs. No ANEXO II (Tabela 0.1) são apresentados os valores dos coeficientes obtidos para o modelo quadrático de cada enzima. Os valores de R^2 e R^2 ajustado mostraram-se elevados, bem como a inexistência de falta de ajuste na ANOVA, indicando que o modelo quadrático obtido é válido no nível de significância estabelecido. Portanto, o ultrassom não demonstrou nenhum efeito significativo na extração do conjunto das enzimas, isto de certo modo é favorável ao processo, uma vez que sua utilização

envolve custos, além de tornar o processo relativamente mais simples. As Figuras 2-A, 2-B e 2-C das superfícies de resposta para as enzimas são apresentadas nos ANEXOS II, onde se pode observar o formato de sela indicando que o pH na forma quadrática é significativo e o Ultrassom não.

Szabo *et al.* (2015), avaliaram o uso do ultrassom de baixa frequência em diferentes amplitudes para intensificar a extração de enzimas ligninolíticas e hidrolíticas, produzidas por *Apergillus oryzae* NBBL 3485 a partir de um fermentado sólido (FES). Os autores relataram que a sonicação teve um enorme efeito na extração de enzimas em relação ao método convencional e observaram um aumento de até 111,4%, 167,0% e 93,8% para FPase, poligalacturonase, lignina-peroxidase.

Resultados similares são reportados por Csiszar *et al.* (2015), na extração por ultrassom de enzimas hidrolíticas e oxidativas (endo-xilanase, 1,4-B-D-glucosidase, 1,4-B-D-endoglucanase, poligalacturonase, lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e lacases), produzidas por fermentação em estado sólido. Relatam que dependendo dos parâmetros de sonicação as atividades enzimáticas nos extratos obtidos podem ser aumentadas para 129 a 413% em relação às atividades obtidas nos extratos brutos recuperados por um agitador magnético comum (lixiviação).

Nguyen & Le (2013), estudaram o efeito do ultrassom sobre a atividade catalítica celulasas e observaram um aumento da atividade enzimática quando a intensidade ultra-sônica aumentou de 0 para 6 W mL⁻¹ em um tempo que variou de 0 a 80 segundo, o aumento conseguido foi de 18,7% quando utilizado uma solução de carboximetilcelulose (CMC) e 39,4% quando utilizado o papel filtro (Whatman) como substrato.

O ultrassom tem sido utilizado para melhorar a eficiência de diversos processos químicos, físicos e biotecnológicos. O efeito do ultrassom pode ser baseado em uma interação direta com espécies moleculares, bem como no fenômeno de cavitação. No desenvolvimento de processos biotecnológicos, o ultrassom baixa frequência vêm recebendo bastante atenção e tem-se intensificação em processos que utilizam enzimas, pois contribui aumentando as taxas de transferência de massa, devido a possível formação de microcavidades no sólido e aumento da pressão na interface sólido-líquido, mas também pode afetar de forma negativa, contribuindo para inativação das

enzimas, devido as mudanças promovidas na molécula enzimática (SUBHEDAR *et al.* 2017; LUNELLI *et al.* 2014; SOUZA *et al.* 2013). Para Gasparotto *et al.* (2015), a irradiação ultra-sônica mostrou ser uma tecnologia mais promissora para ser utilizada na reação enzimática devido aos seus efeitos positivos sobre o rendimento da hidrólise.

Entretanto, embora nos experimentos realizados o ultrassom não tenha demonstrado nenhum efeito significativo, não se pode negligenciar sua utilização e seus efeitos sobre a taxa de vários processos na indústria. Entre suas aplicações pode-se citar o sucesso em processos de emulsificação, homogeneização, extração, cristalização, desidratação, pasteurização baixa temperatura, desgaseificação, ativação e inativação de enzimas, redução de tamanho de partícula e alteração da viscosidade (PATIST & BATES, 2008). O ultrassom é considerado uma tecnologia chave para alcançar o objetivo da “química verde” e uma extração de forma sustentável (CHEMAT *et al.* 2017).

A partir das conclusões obtidas dos ensaios optou-se por trabalhar com o método convencional de extração por lixiviação (sólido-líquido), que consiste na dissolução ou remoção dos constituintes de uma matriz sólida por um fluido percolante. Os ajustes (R^2) obtidos a partir da Matriz de Doehlert, demonstram que um ajuste quadrático pode descrever com maior precisão o processo, possibilitando a obtenção das condições ótimas de extração multienzimática. Assim, foi elaborado um novo planejamento experimental fatorial de 3 níveis incompleto (-1, 0 e +1) do tipo Box-Behnken (PBB) para o ajuste de superfície de resposta.

Considerando as variáveis envolvidas no processo de extração temperatura, tempo, agitação, proporção sólido-líquido e o pH, o qual demonstrou forte influencia e significância na extração (Matriz de Doehlert), trabalharíamos com cinco variáveis, o que em termos de planejamento Box-Behnken (PBB) representaria realizar mais de 40 corridas experimentais. Mas, com a finalidade de simplificar o planejamento, foram fixadas a proporção sólido-líquido ($1:17 \text{ gs:mL}^{-1}$) e a agitação (150 rpm), assim o planejamento ficaria reduzido a apenas 3 variáveis. Desta forma, as variáveis independentes admitidas para o PBB foram o tempo, temperatura e pH.

O PBB proposto gera modelos quadráticos (segunda ordem) e para 3 variáveis, são gerados 12 ensaios e com um triplicata no ponto central, totalizando 15 corridas experimentais.

4.2 Planejamento Box-Behnken na Extração das Enzimas

Na Tabela 4.3, observa-se a matriz do planejamento Box-Behnken, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática da FPase, CMCCase e β -glicosidase, após o processo de extração.

Tabela 4.3: Matriz do planejamento Box-Behnken com os resultados obtidos para AE (U mL^{-1}) da FPase, β -glicosidase e CMCCase.

Ensaios	t (min)	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	FPase	CMCase	β -glicosidase
1	-1	-1	0	0,291	0,122	2,462
2	1	-1	0	0,286	0,134	2,422
3	-1	1	0	0,291	0,194	2,466
4	1	1	0	0,298	0,198	2,552
5	-1	0	-1	0,284	0,145	3,135
6	1	0	-1	0,306	0,131	3,052
7	-1	0	1	0,321	0,128	2,754
8	1	0	1	0,316	0,148	2,628
9	0	-1	-1	0,298	0,145	2,816
10	0	1	-1	0,312	0,303	2,743
11	0	-1	1	0,309	0,276	1,861
12	0	1	1	0,297	0,288	2,012
13	0	0	0	0,361	0,221	3,221
14	0	0	0	0,355	0,212	2,994
15	0	0	0	0,347	0,237	3,144

A análise da Tabela 4.3, mostra que os melhores resultados de AE obtidos para a FPase e a β -glicosidase ocorreram nos ensaios em triplicata 13, 14 e 15, que correspondem aos pontos centrais, enquanto que para a CMCCase, os melhores resultados de AE ocorreram nos ensaios 10, 11 e 12. Os valores

máximos alcançados para FPase, CMCase e β -glicosidase foram 0,361, 0,303 e 3,221 U mL⁻¹, respectivamente.

Resultados bem superiores foram descritos por Sales *et al.* (2010), na produção de celulases empregando *Aspergillus*, que alcançaram AE para FPase de 0,45, CMCase 0,60 U.mL⁻¹ e para Celobiase ou β -glicosidase de 6,42 U mL⁻¹. Os resultados superiores de AE descritos podem estar relacionados com a variação da espécie de *Aspergillus* utilizada e possíveis alterações na composição da matriz do substrato.

4.2.1 Avaliação da FPase

Na Tabela 4.4 são apresentadas as estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento para a FPase. Observa-se que apenas os termos quadráticos do tempo, temperatura e pH se mostraram significativos, enfatizando a plena curvatura da superfície de resposta (Figuras 4.2 à 4.4). Esses termos são positivos, indicando que um aumento nos mesmos acarreta um aumento na AE da FPase.

Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos para a AE da FPase para o planejamento Box-Behnken ($\alpha = 0,05$).

Fator	Coef.	Erro padrão coef.	p-valor	t(2)
Intercepto.	0,30075	0,00202	0,00004	148,329
(1)Tempo (L)	0,00237	0,00248	0,43980	0,95640
Tempo (Q)	0,01502	0,00182	0,01448	8,2187
(2)Temperatura (L)	0,00175	0,00248	0,55399	0,7047
Temperatura (Q)	0,01639	0,00182	0,01219	8,9710
(3)pH (L)	0,00750	0,00261	0,10328	2,8652
pH (Q)	0,00877	0,00182	0,04078	4,7990
1L X 3L	-0,00675	0,00351	0,19453	-1,9220
1Q X 3L	-0,00637	0,00248	0,12411	-2,5672
2L X 3L	-0,00650	0,00351	0,20540	-1,8509

$R^2 = 0,9795$; $R^2_{AJ} = 0,9427$

Com a finalidade de comparar os resultados experimentais obtidos nos ensaios com o modelo para a variável resposta AE-FPase, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para o PBB (Tabela 4.5).

A partir da análise de variância dos dados (Tabela 4.5), verificou-se a viabilidade do modelo pelo Teste F, que consiste na comparação dos valores de F calculado (F_{calc}) com F Tabelado (F_{tab}). Assim, é possível afirmar se o modelo proposto é válido e se os parâmetros da Equação se ajustam aos dados experimentais, desde que a relação $F_{calc} > F_{tab}$ seja satisfeita. Além disso, esse detalhe pode ser atestado pela inexistência de falta de ajuste do modelo (p -valor = 0,710989), pela significância da regressão (p -valor = 0,001068) e pelos elevados valores de R^2 e R^2 ajustado.

Tabela 4.5: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste aos dados do PBB..

Causa de variação	SQ	GL	MQ	F-calc	p-valor
(1)Tempo (L)	0,000045	1	0,000045	0,91470	0,439802
Tempo (Q)	0,003332	1	0,003332	67,54691	0,014484
(2)Temperatura (L)	0,000025	1	0,000025	0,49662	0,553998
Temperatura (Q)	0,003970	1	0,003970	80,47934	0,012199
(3)pH (L)	0,000405	1	0,000405	8,20946	0,103282
pH (Q)	0,001136	1	0,001136	23,03028	0,040783
1L X 3L	0,000182	1	0,000182	3,69426	0,194538
1Q X 3L	0,000325	1	0,000325	6,59037	0,124111
2L X 3L	0,000169	1	0,000169	3,42568	0,205404
Regressão	0,008396	9	0,0009329	26,5025	0,001068
Falta de ajuste	0,000077	3	0,000026	0,51774	0,710989
Erro puro	0,000099	2	0,000049		
Resíduo	0,000176	5	0,0000352		
Total SS	0,008572	14			

$R^2 = 0,9795$; $R^2_{AJ} = 0,9427$;

O valor obtido para $F_{calc} = 26,5$, e considerando os graus de liberdade da regressão e do resíduo com significância $p < 0,05$, buscou-se $F_{tab} (9; 5; 0,05) = 4,77$. Satisfeita a condição $F_{calc} > F_{tab}$, o modelo obtido é válido e se ajusta adequadamente aos dados experimentais e pode ser utilizado para

prever o comportamento da AE da FPase na extração em função do tempo, temperatura e pH.

Baseando-se na Tabela 4.4, foi possível estabelecer o modelo matemático (Equação 2) que descreve o comportamento AE FPase em função das variáveis significativas no processo.

$$AE_{FPase}(U.mL^{-1}) = 0,30075 + 0,01502 \times t^2 + 0,016396 T^2 + 0,00877 \times pH^2 \quad (2)$$

em que T está em °C e t em min.

A precisão do modelo é verificada pela razão F_{cal}/F_{tab} , se esta relação for maior que 4 o modelo ajusta bem os dados experimentais. Portanto há relação estabelecida $F_{cal}/F_{tab} = 26,5/4,77 = 5,55$, confirmando a expectativa.

A qualidade do ajuste observada na análise de variância (ANOVA) pode ser comprovada pelo comportamento dos resíduos (Figura 3-A e 3-B do ANEXO III) os quais não indicam anormalidades na distribuição dos resíduos para o modelo.

As superfícies de resposta, conforme as Figuras 4.2 á 4.4 representam o modelo obtido para AE FPase em função do tempo, temperatura e pH no processo de extração enzimática.

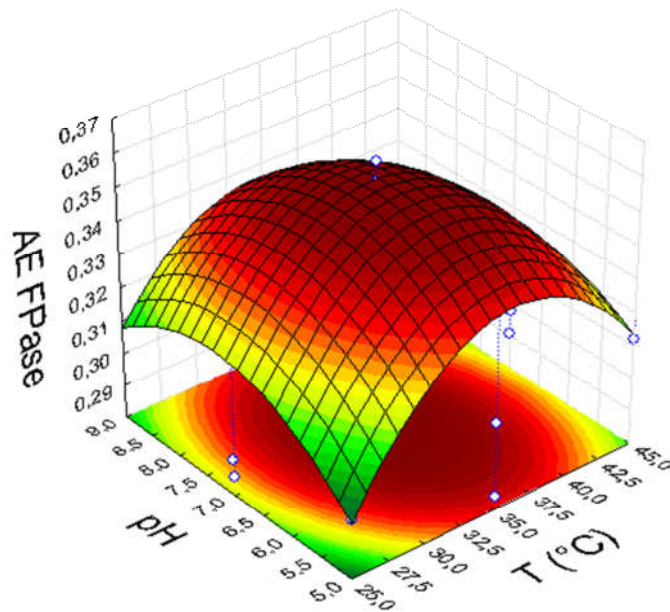


Figura 4.2: Superfície de resposta para AE FPase em função da temperatura e pH na extração enzimática.

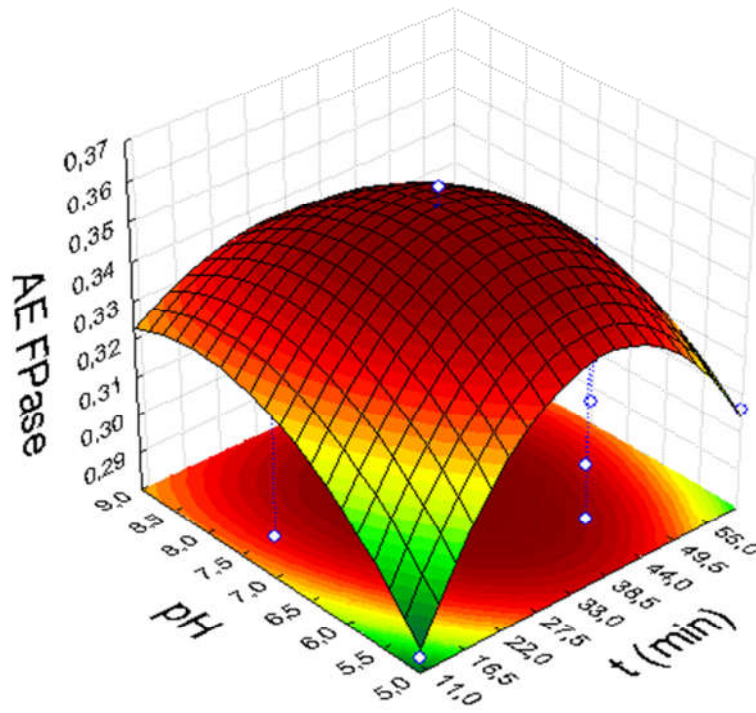


Figura 4.3: Superfície de resposta para AE FPase em função da tempo e pH na extração enzimática.

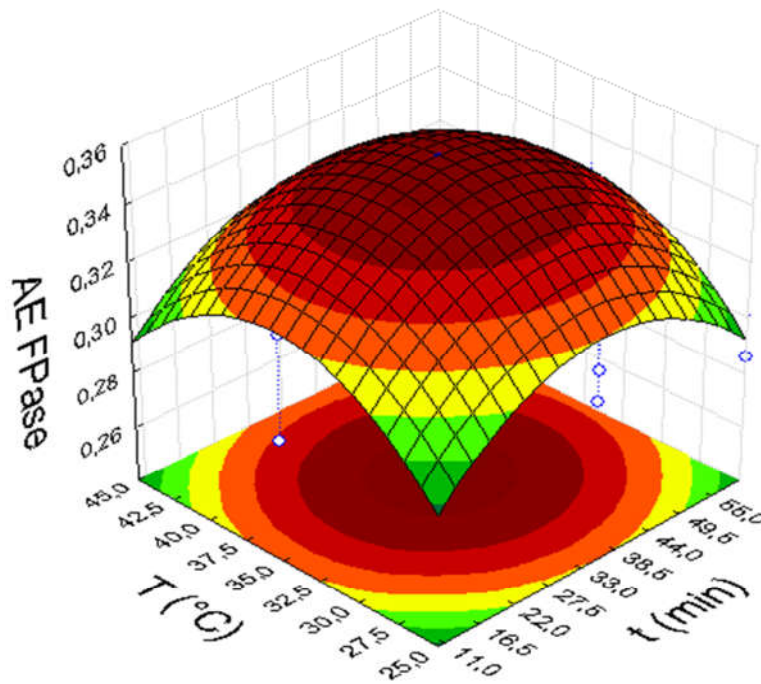


Figura 4.4: Superfície de resposta para AE FPase em função da temperatura e tempo na extração enzimática.

Observando-se as superfícies de respostas apresentadas, nota-se que a região com alta atividade enzimática para FPase está localizada na faixa entre 6,5 – 7,5 (pH), 32,5 – 37,5 (T °C) e 33 – 38,5 (t min).

4.2.2 Avaliação da β -glicosidase

A Tabela 4.6 apresenta as estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento para AE da β -glicosidase. Os valores em negrito representam as variáveis significativas do modelo.

Tabela 4.6: Estimativa dos efeitos para a AE da β -glicosidase para o PBB.

Fator	Coef.	Erro padrão coef.	p-valor	t(2)
Intercepto.	2,57525	0,03332	0,00016	77,2777
(1)Tempo (L)	-0,00975	0,04302	0,84176	-0,22661
Tempo (Q)	0,02747	0,03003	0,45686	0,91480
(2)Temperatura (L)	0,02650	0,04081	0,58275	0,64929
Temperatura (Q)	0,29460	0,03003	0,01023	9,80759
(3)pH (L)	-0,27466	0,04302	0,02366	-6,38435
pH (Q)	0,08622	0,03003	0,10295	2,87063
1L X 2Q	-0,03187	0,04081	0,51657	-0,78098
1Q X 3L	-0,11012	0,04081	0,11428	-2,69821
2L X 3L	0,05600	0,05772	0,43429	0,97020

$R^2 = 0,9862$; $R^2_{AJ} = 0,9613$

Observa-se que, para a β -glicosidase somente o termo quadrático da temperatura (Q) e o termo linear do pH (L) foram significativos no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O efeito negativo do pH é um indicativo de que em menores pHs maior é a resposta de AE para a β -glicosidase, assim como a resposta tende a aumentar com a elevação da temperatura, evidenciado pelo efeito positivo do coeficiente. A análise de variância (ANOVA) para a AE β -glicosidase é apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste aos dados do PBB.

Causa de variação	SQ	GL	MQ	F-calc	p-valor
(1)Tempo (L)	0,00068	1	0,00068	0,05136	0,84177
Tempo (min)(Q)	0,01115	1	0,01115	0,83686	0,45686
(2)Temperatura (°C)(L)	0,00561	1	0,00562	0,42157	0,58276
Temperatura (°C)(Q)	1,28184	1	1,28184	96,18890	0,01024
(3)pH (L)	0,54318	1	0,54318	40,75996	0,02367
pH (Q)	0,10982	1	0,10982	8,24054	0,10295
1L X 3L	0,00813	1	0,00813	0,60993	0,51658
1Q X 3L	0,09702	1	0,09702	7,28033	0,11428
2L X 3L	0,01254	1	0,01254	0,94129	0,43429
Regressão	2,24415	9	0,24935	39,60950	0,00040
Falta de ajuste	0,00482	3	0,00161	0,12064	0,94001
Erro puro	0,02665	2	0,01333		
Resíduo	0,03148	5	0,00629		
Total SS	2,27562	14			

$$R^2 = 0,9862; R^2_{AJ} = 0,9613$$

O baixo p-valor da regressão (0,0004) e o elevado p-valor da falta de ajuste (0,94001), além do baixo valor da média quadrática do resíduo (0,00629) indicam o bom ajuste do modelo, para 5 graus de liberdade do resíduo, no nível de significância de 5%. A elevada relação $F_{calc}/F_{tab} = 39,6/4,77 = 8,31$ e os valores elevados e próximos entre si de R^2 e R^2 ajustado atestam a excelente qualidade do modelo ajustado, o qual pode ser utilizado para descrever o comportamento da AE da β -glicosidase na extração em função da temperatura e pH. O modelo é descrito pela equação (3)

$$AE_{\beta\text{-Glicosidase}}(\text{U. mL}^{-1}) = 2,57525 + 0,29461 \times T^2 - 0,27467 \times \text{pH} \quad (3)$$

O gráfico dos valores resíduos versus valores preditos (Figura 3-C Anexo III) e o gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 3-D do Anexo III) não indicam anormalidades na distribuição dos resíduos para o modelo.

De forma ilustrativa a Figura 4.5 representa a superfície de resposta para o modelo que descreve a AE β -glicosidase função da temperatura e pH no processo de extração enzimática.

Analisando a superfície de resposta apresentada, pode-se estabelecer regiões com alta atividade enzimática para β -glicosidase, localizada na faixa entre 6,5 – 7,5 (pH) e 32,5 – 37,5 (T °C).

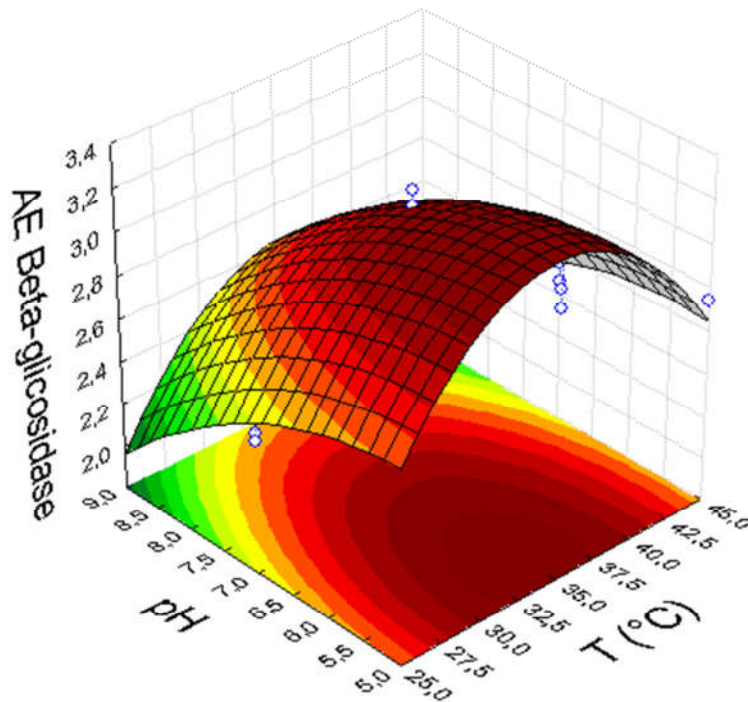


Figura 4.5: Superfície de resposta para AE β -glicosidase em função da temperatura e pH na extração enzimática.

4.2.3 Avaliação da CMCase

A Tabela 4.8 apresenta as estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento para a CMCase. Observou-se os efeitos significativos do termo quadrático do tempo (Q), termo linear da temperatura (L) e a interação entre termos lineares da temperatura (L) e pH (L) sobre AE da CMCase na extração enzimática. A análise de variância (ANOVA) para o AE CMCase e apresentada na Tabela 4.9.

Tabela 4.8: Estimativa dos efeitos para AE da CMCase para o PBB.

Fator	Coef.	Erro padrão coef.	p-valor	t(2)
Intercepto	0,18433	0,00365	0,00039	50,4293
(1)Tempo (L)	0,00275	0,00448	0,60160	0,6143
Tempo (min)(Q)	0,04408	0,00329	0,00554	13,3795
(2)Temperatura(°C)(L)	0,03825	0,00448	0,01342	8,5441
Temperatura (°C)(Q)	-0,01342	0,00329	0,05535	-4,0720
(3)pH (L)	0,00967	0,00472	0,17706	2,0485
pH (Q)	-0,00142	0,00329	0,70911	-0,4299
1L X 3L	0,00850	0,00633	0,31150	1,3426
1Q X 3L	0,01450	0,00448	0,08355	3,2389
2L X 3L	-0,03650	0,00633	0,02879	-5,7651

$$R^2 = 0,9909; R^2_{AJ} = 0,9746$$

Tabela 4.9: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos dados do PBB.

Causa de variação	SQ	GL	MQ	F-calc	p-valor
(1)Tempo (L)	0,00006	1	0,00006	0,3773	0,60151
Tempo (min)(Q)	0,02870	1	0,02870	179,0123	0,00554
(2)Temperatura (°C)(L)	0,01170	1	0,01170	73,0010	0,01342
Temperatura (°C)(Q)	0,00266	1	0,00266	16,5815	0,05535
(3)pH (L)	0,00067	1	0,00067	4,1963	0,17706
pH (Q)	0,00003	1	0,00003	0,1849	0,70911
1L X 3L	0,00029	1	0,00029	1,8025	0,31150
1Q X 3L	0,00168	1	0,00168	10,4906	0,08355
2L X 3L	0,00533	1	0,00533	33,2370	0,02879
Regressão	0,05384	9	0,00598	60,5898	0,00014
Falta de Ajuste	0,00017	3	0,00006	0,3597	0,79254
Erro puro	0,00032	2	0,00016		
Resíduo	0,00049	5	0,00010		
Total SS	0,05433	14			

$$R^2 = 0,9909; R^2_{AJ} = 0,9746$$

Da mesma forma que para a β -glicosidase, o baixo p-valor da regressão e o elevado p-valor da falta de ajuste, além do baixo valor da média quadrática do resíduo indicam o bom ajuste do modelo, para 5 graus de liberdade do resíduo, no nível de significância de 5%. A elevada relação

$F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}} = 60,59/4,77 = 12,7$ e os valores elevados e próximos entre si de R^2 e R^2 ajustado atestam a excelente qualidade do modelo ajustado, o qual pode ser utilizado para descrever o comportamento da AE da CMCase na extração em função da temperatura, tempo e pH. O modelo é descrito pela equação (4).

$$AE_{\text{CMCase}}(\text{U. mL}^{-1}) = 0,18433 + 0,04408 \times t^2 + 0,0382 \times T - 0,0365 \times T \times \text{pH} \quad (4)$$

A confiabilidade da análise de variância realizada também pode ser averiguada pelo comportamento observado no gráfico dos resíduos versus os valores preditos (Figura 3-E no Anexo III), onde os dados distribuem-se de forma aleatória em torno do zero, ou seja, não são tendenciosos, e pelo gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 3-F no Anexo III), onde se verifica a ausência de discrepâncias ou *outliers*.

As superfícies de resposta para AE CMCase em função do tempo, temperatura e pH no processo de extração enzimática, são apresentadas pelas Figuras 4.6 à 4.8.

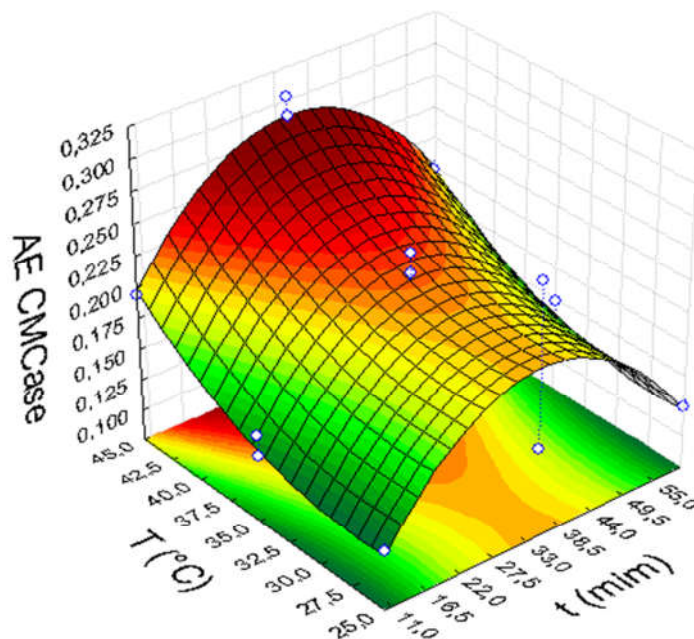


Figura 4.6: Superfície de resposta para AE CMCase em função do tempo e da temperatura na extração enzimática.

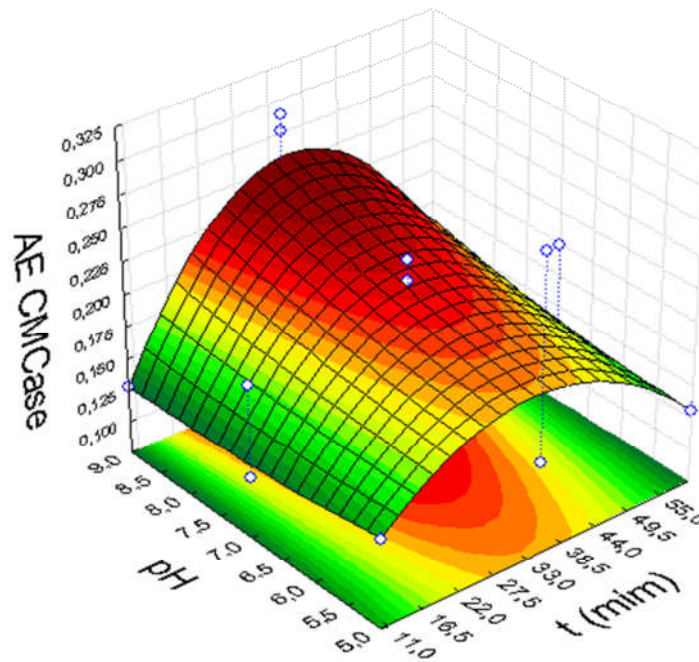


Figura 4.7: Superfície de resposta para AE CMCCase em função do tempo e pH na extração enzimática.

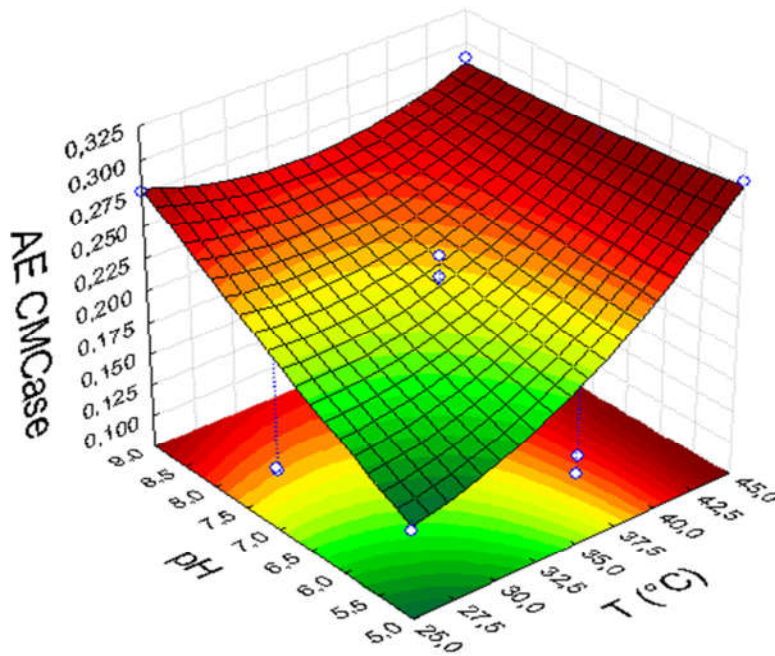


Figura 4.8: Superfície de resposta para AE CMCCase em função do temperatura e pH na extração enzimática.

As superfícies de resposta obtidas para AE CMCase, apresentam comportamento diferentes das obtidas para FPase e β -glicosidase. O comportamento das superfícies de resposta (Figura 4.6 e 4.7) é decorrente da presença de um ponto crítico que não é máximo ou mínimo com declividade nula. Esse ponto sobre a superfície de resposta representa a elevação máxima em uma direção e mínima na outra direção perpendicular, e geralmente é denominado ponto de sela.

A superfície representada na Figura 4.8 exibe um comportamento que tende a um plano, devido a interação dos efeitos lineares da temperatura e pH, demonstrando a tendência do aumento da resposta AE com a elevação das variáveis em questão.

Contudo, mesmo que as superfícies não apresentem claramente pontos de máximo ou mínimo, o modelo apresentou alto coeficiente de determinação $R^2 = 0,9909$ e elevado coeficiente de determinação ajustado de $R^2_{AJ} = 0,9746$, demonstrando que o modelo se ajusta muito bem aos dados experimentais.

4.2.4 Otimização Multiresposta

A partir da obtenção dos modelos matemáticos e construção das superfícies de resposta para as enzimas estudadas (FPase, β -glicosidase e CMCase) com ajuste satisfatórios, foi possível determinar as condições ótimas para a extração multienzimática, utilizando a função *Desirability* ou desejabilidade com o auxílio do software Statistica™ v.8.0. A Figura 4.9 apresenta a resposta da função desejabilidade.

Como pode-se observar a função desejabilidade, tem como proposta estabelecer uma única condição para o processo global, permite determinar qual a melhor combinação entre variáveis independentes, para gerar a variável de resposta mais apropriada (OLIVEIRA, 2010). A metodologia de superfícies de resposta e a função de desejabilidade têm sido estudadas com sucesso para a otimização de processos com múltiplas respostas (ZHANG *et al.* 2016; GIORDANO *et al.* 2013; ESPINOZA-ESCALANTE *et al.* 2008).

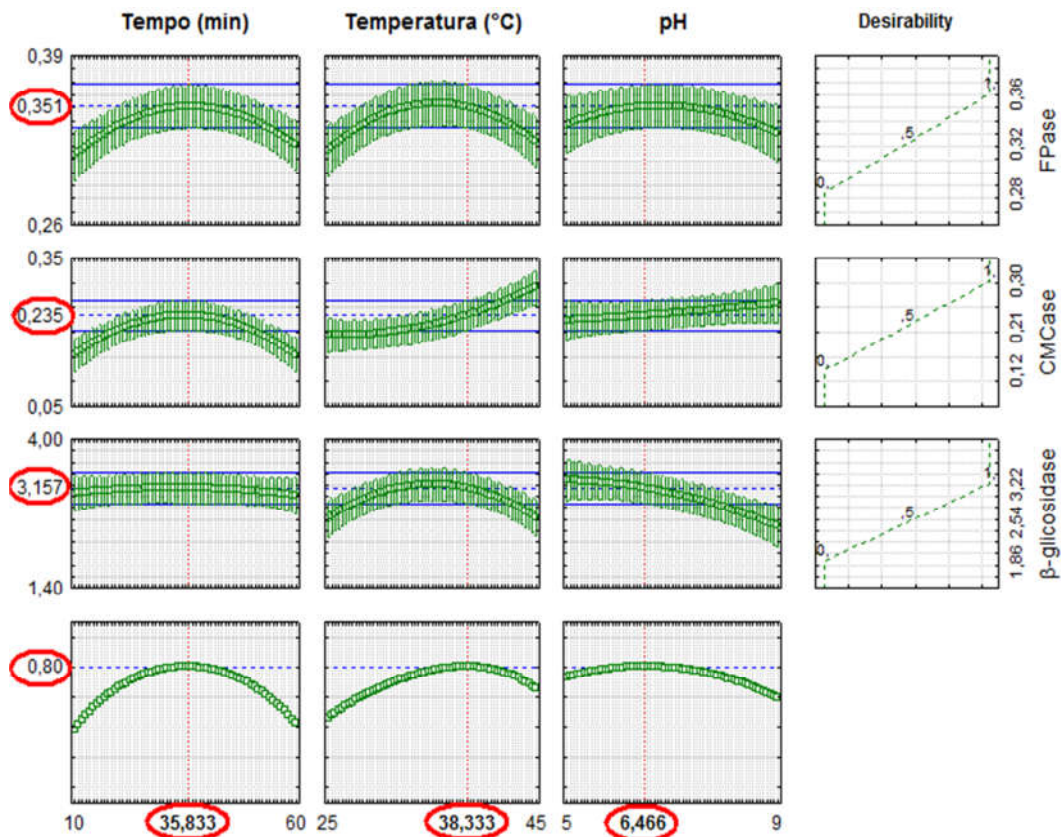


Figura 4.9: Gráfico dos perfis para valores preditos e a desejabilidade para tempo, temperatura e pH na extração multienzimática.

A desejabilidade global para resposta de AE no processo de extração enzimática foi de 0,80, nas condições operacionais: $t = 35,83$ min, $T = 38,33$ °C e $\text{pH} = 6,46$. O gráfico apresenta ainda os pontos ótimos das variáveis de reposta: AE FPase = $0,351 \text{ U.mL}^{-1}$, AE β -glicosidase = $3,157 \text{ U.mL}^{-1}$ e AE CMCase = $0,235 \text{ U.mL}^{-1}$. A Figura 4.10 apresenta as superfícies de resposta para função desejabilidade global em função das 3 variáveis do planejamento.

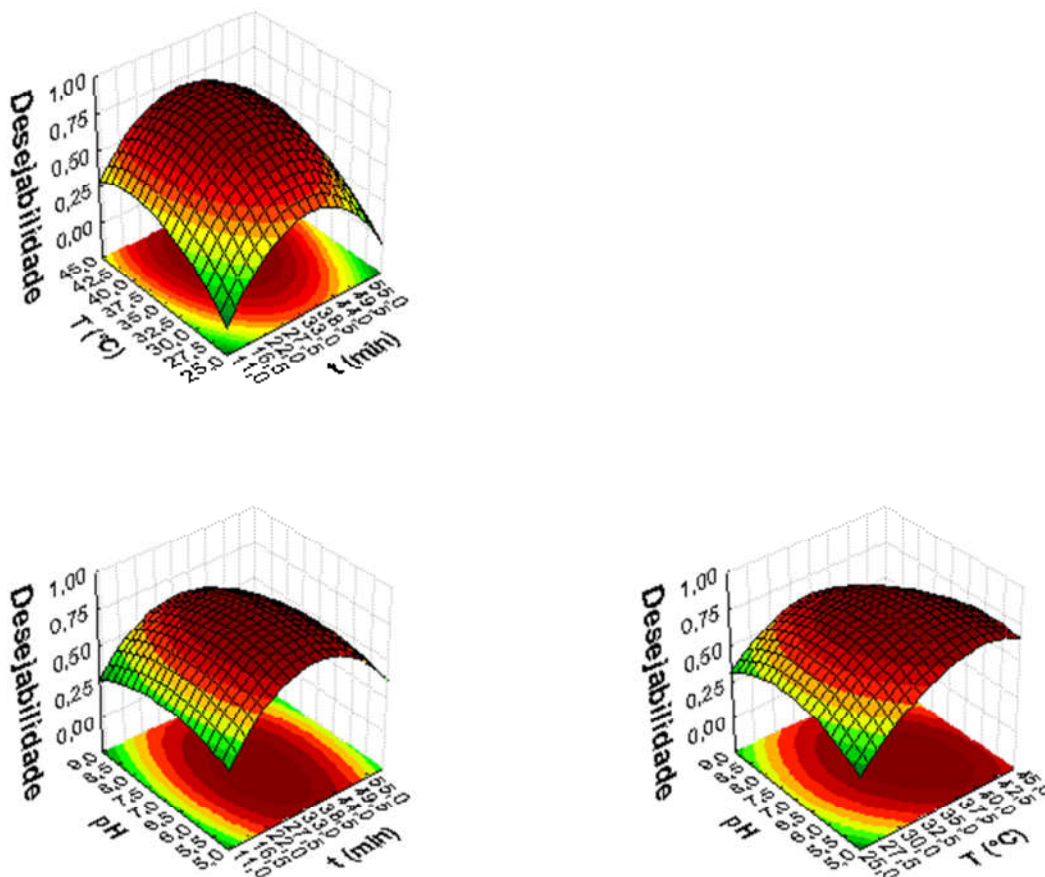


Figura 4.10: Superfícies de resposta para deseabilidade global em função das variáveis tempo, temperatura e pH.

4.3 Hidrólise Enzimática do Bagaço da Cana-de-açúcar

Após a determinação do ponto ótimo de extração multienzimática no PBB, uma amostra de bagaço da cana pré-tratado foi submetido a hidrólise enzimática, para liberação e quantificação de açúcar redutor, utilizando o extrato na melhor condição do PBB. Avaliou-se a capacidade do conjunto multienzimático na hidrólise convencional e também quando assistida por ultrassom (Ultra), também se investigou a influência da razão sólido-líquido (RSL) na hidrólise do bagaço da cana.

No processo de hidrólise enzimática foi utilizado o esquema da ANOVA com tratamentos e blocos, tendo como blocos a relação sólido:líquido (RSL) e como tratamento o uso ou não do ultrassom usada na hidrólise, conforme apresentado na Tabela 4.10, onde também se observam os resultados obtidos

de açúcares redutores liberados nas hidrólises realizadas em triplicata. Por sua vez, a Tabela 4.11 apresenta a matriz de dados inserida no programa estatístico para a análise da ANOVA.

Tabela 4.10:: Resultados de açúcar redutor (AR) obtidos na hidrólise do bagaço da cana submetido a diferentes RSL e com ou sem ultrassom.

Bloco RSL (g L ⁻¹)	Tratamento (uso do ultrassom)	
	I = S/ Ultra	II = C/ Ultra
A = 13,3	0,708	0,777
	0,719	0,752
	0,673	0,731
B = 23,3	0,768	0,789
	0,771	0,781
	0,721	0,795
C = 33,3	0,779	0,824
	0,793	0,791
	0,777	0,841

Tabela 4.11: Matriz da ANOVA para a hidrólise do bagaço da cana submetido a diferentes RSL (Blocos) e com ou sem ultrassom (tratamentos).

Bloco	Tratamento	Açúcar Redutor (AR) g L ⁻¹
A	I	0,708
A	I	0,719
A	I	0,673
A	II	0,777
A	II	0,752
A	II	0,731
B	I	0,768
B	I	0,771
B	I	0,721
B	II	0,789

Bloco	Tratamento	Açúcar Redutor (AR) g L⁻¹
B	II	0,781
B	II	0,795
C	I	0,779
C	I	0,793
C	I	0,777
C	II	0,824
C	II	0,791
C	II	0,841

Os resultados da ANOVA são apresentados na Tabela 4.12 onde se verifica que tanto o bloco (RSL) como o tratamento (uso do ultrassom) deram significativos (p -valor $< 0,05$) e influenciam a resposta (AR) obtida na hidrólise. Além disso, a influência de cada variável (bloco e tratamento) sobre a resposta independe do nível em que a outra variável se encontra, considerando que a interação entre ambas não é significativa (Bloco x Tratamento). Foi utilizado o software Action v.3.1.43, da Estatcamp para verificar se os tratamentos e os blocos tem efeito significativo na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar.

Tabela 4.12: ANOVA para a hidrólise enzimática do bagaço da cana.

Causa de Variação	SQ	GL	MQ	F-calc	p-valor
Ultrassom (1)	0,0077	1	0,0077	17,31	0,0013
RSL (2)	0,0167	2	0,0083	18,80	0,0002
1 X 2	0,0003	2	0,0002	0,37	0,7016
Resíduo	0,0053	12	0,0004		

GL = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; QM = quadrado médio; F = estatística F

A partir da análise de variância, verificou-se que as variáveis são significativas (p -valor $< 0,05$), porém não há interação significativas entre elas, conforme pode ser observado na Figura 4.11, que ilustra o gráfico de interação entre as variáveis.

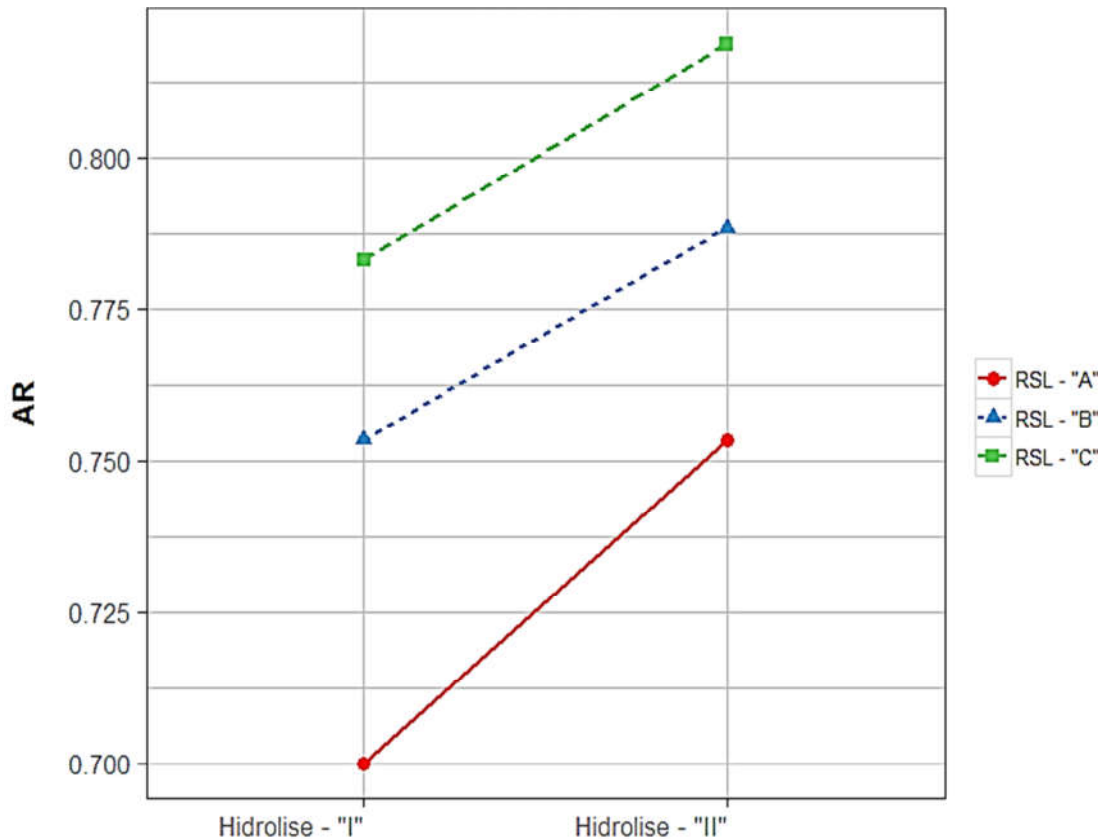


Figura 4.11: Gráfico de Interação entre as variáveis da hidrólise.

Existe um efeito principal quando diferentes níveis de um fator afetam a resposta de maneira diferente. O gráfico de efeitos principais traça a média da resposta para cada nível, onde os fatores são conectados por uma linha. A Figura 4.12 apresenta o gráfico dos efeitos, o qual permite examinar as diferenças entre médias e entre níveis para um ou mais fatores. Observa-se, que a RSL (C) apresentou taxa de hidrólise maior que RSL (A) e (B), conjuntamente a hidrólise assistida por ultrassom (II) apresentou uma taxa maior que a hidrólise convencional (I). A magnitude do efeito principal pode ser observada pelo grau de inclinação da linha, quanto mais inclinada maior a relevância do efeito.

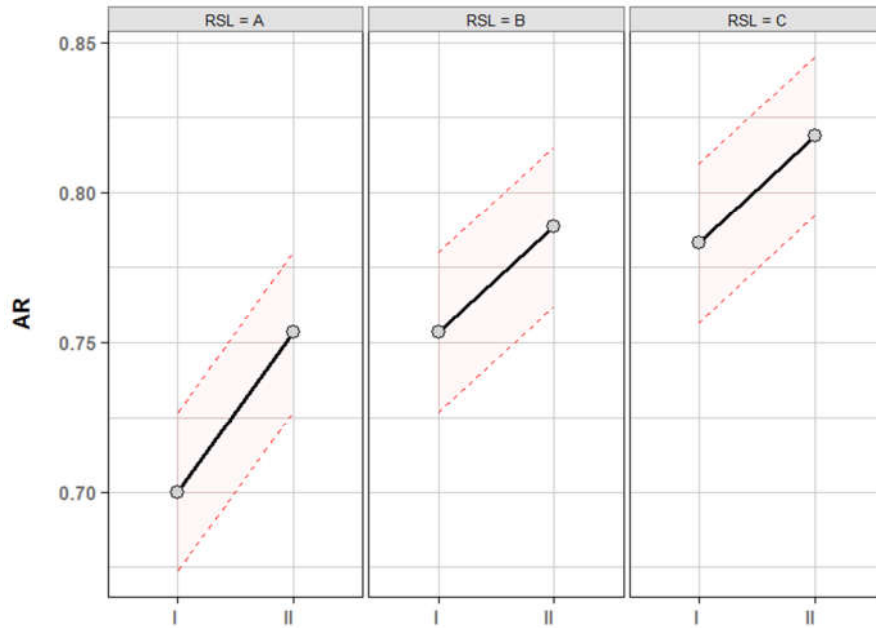


Figura 4.12: Gráfico de efeitos para as variáveis da hidrólise.

Nos gráficos de resíduos (Figura 4.13) se pode observar a distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero bem como a ordem de coleta dos ensaios. Verifica-se também que no gráfico da probabilidade normal dos resíduos (gráfico QQ-plot) não há a presença de *outliers* e que os resíduos aderem a uma distribuição normal, com p-valor > 0,05 determinado pelo teste de Anderson-Darling (AD). Essas observações quanto aos resíduos na ANOVA satisfazem a premissa da Estatística paramétrica e permite uma análise mais profundada dos dados.

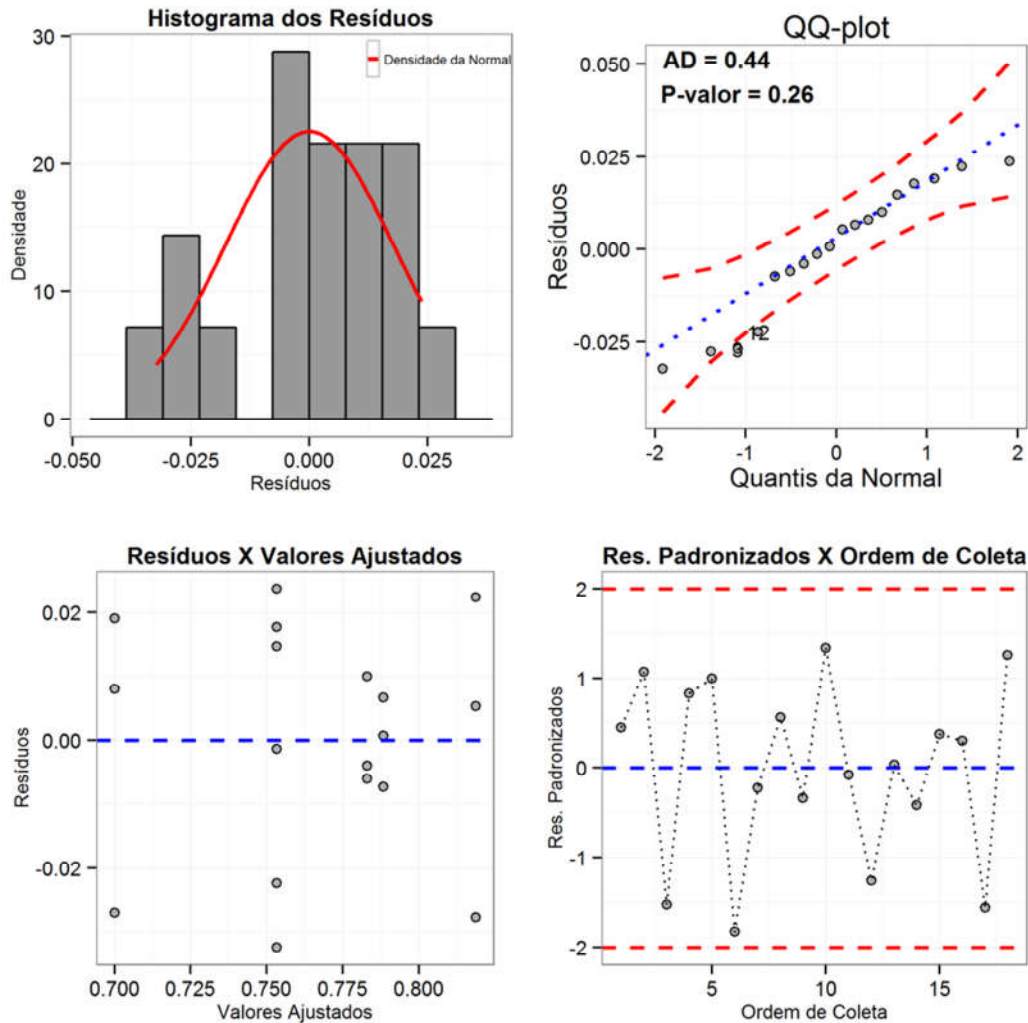


Figura 4.13: Gráficos dos resíduos.

Entretanto, a análise de variância e o Teste F (Tabela 4.11), não são suficientes para indicar qual o melhor tratamento, uma vez que o Teste F informa somente se há diferenças entre as médias dos tratamentos realizados. Assim, se faz necessário aplicar um teste, que permita a comparação entre as médias dos tratamentos, para determinar qual ensaio foi mais efetivo na hidrólise.

A Tabela 4.13, apresenta o teste de Tukey, que é considerado um teste rigoroso e de fácil aplicação, utilizado nesse caso como um complemento para o estudo da análise de variância, as medias foram comparadas duas a duas.

Tabela 4.13: Comparação de médias, teste de Tukey.

	Bloco	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	A	I		0,07706	0,00440	0,07706	0,00271	0,00031
2	B	I	0,07706		0,54271	1,00000	0,37917	0,02398
3	C	I	0,00440	0,54271		0,54271	0,99953	0,36091
4	A	II	0,07706	1,00000	0,54271		0,37917	0,02398
5	B	II	0,00271	0,37917	0,99953	0,37917		0,52096
6	C	II	0,00031	0,02398	0,36091	0,02398	0,52096	

A partir do teste de Tukey, considerando-se apenas a comparação de medias entre blocos, observa-se a dependência da hidrólise em função da RSL, conforme Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Comparação de médias considerando apenas o Bloco (RSL).

Fator	Médias	Grupos
A	0,7267	a
B	0,7708	ab
C	0,8008	b

As médias A e C são diferentes entre si, mas as medias A e B são iguais, assim como as medias B e C, indicando que a hidrólise é dependente RSL, neste caso a maior taxa de hidrólise é obtida na RSL (C) = 33,3 g.L⁻¹.

Por conseguinte, foi considerada a comparação de medias apenas entre os tratamentos, tendo a hidrólise em função do ultrassom ou não, conforme Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Comparação entre medias considerando os tratamentos (hidrólise).

Fator	Médias	Grupos
I	0,7454	a
II	0,7868	b

As medias A e B são diferentes entre si, onde se obteve como melhor tratamento a hidrólise assistida por ultrassom, apresentado o maior valor médio de hidrólise ($0,7868 \text{ g.L}^{-1}$).

Finalmente, pode se concluir que os melhores resultados obtidos foram para a hidrólise assistida por ultrassom com a maior RSL ($33,3 \text{ g L}^{-1}$) empregada nos ensaios, obtendo-se uma média de AR de $0,8186 \text{ g L}^{-1}$.

Lunelli *et al.* (2014), observaram uma maior produção de açúcares fermentáveis obtidos na presença de ultrassom, alcançando $0,26 \text{ g.g}^{-1}$ (AR por bagaço da cana seco), que era cerca de duas vezes o valor obtido sem o uso do ultrassom, à uma temperatura de 50°C .

Subhedar *et al.* (2015), investigaram os efeitos do ultrassom na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, via hidrólise enzimática. Obtiveram $27,6 \text{ g L}^{-1}$ de AR em um tempo de 6,5 horas de hidrólise, obtendo um aumento de 2,4 vezes em relação a hidrólise enzimática convencional e concluíram que existe um efeito sinérgico obtido a partir da combinação de ultrassom e enzimas. Para Subhedar & Gogate (2014), que investigaram o efeito da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade sobre a atividade da celulase, mencionam que o ultrassom teve um efeito positivo sobre a atividade da enzima celulase, alterando a estrutura molecular da enzima, proporcionando mais acesso aos sítios ativos.

Szabo & Csiszar (2013), relatam que a eficiência da enzima celulase na hidrólise da celulose é notavelmente mais elevada na solução sonicada, conduzindo a um aumento significativo na degradação da celulose em oligossacáridos e glicose com grupos terminais redutores. Após 65 min de hidrólise enzimática em celulose pura, em várias amplitudes o rendimento em açúcares redutores aumentou de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ (controle) em cerca de 50, 250 e 275% para $0,31$, $0,71$ e $0,75 \text{ g L}^{-1}$.

Gasparoto *et al.* (2015), estudaram a hidrólise enzimática de bagaço da cana-de-açúcar não tratado sob sonicação direta e indireta utilizando enzimas celulolíticas produzidas por fermentação em estado sólido. As hidrólises foram realizadas utilizando um sistema de ultrassons de alta intensidade de 300 W cm^{-2} e 24 kHz . O rendimento máximo na hidrólise foi de $31,3 \text{ g.kg}^{-1}$ e $60,6 \text{ g kg}^{-1}$ sob sonicação direta e indireta, respectivamente.

Subhedar *et al.* (2017), em seus estudos obtiveram-se rendimentos elevados de açúcares redutores no caso de hidrólise enzimática assistida por ultrassom com redução significativa no tempo requerido (quase 10 vezes) em comparação com a abordagem convencional. Similarmente estudos recentes vêm aplicando o ultrassom para melhorar a atividade catalítica de enzimas, hidrólise da biomassa lignocelulósica e com pré-tratamento (BENZAZZI *et al.* 2013; LEAES *et al.* 2013; SILVA *et al.* 2013; SZABÓ & CSISZÁR, 2013; SOUZA *et al.* 2013; KWIATKOWSKA *et al.* 2011; ALVIRA *et al.* 2010).

Os efeitos benéficos da utilização do ultrassom podem ser associados a várias razões como a redução na barreira limitante da difusão para a ligação da enzima com o substrato, melhora na transferência de massa no processo pelas turbulências locais criadas pela cavitação e possível ruptura da parede celular (substrato) devido a formação de microcavidades. Em geral, esses benefícios contribuem para um maior rendimento, maior taxa de reação, com menor exigência de enzimas, menor consumo de reagentes, possibilidade de operar o processo em temperaturas mais brandas em tempos menores, contribuindo com a economia de energia (SUBHEDAR *et al.* 2017).

4.4 Determinação Termoestabilidade e Estabilidade ao pH da FPase

A termoestabilidade de uma enzima é uma característica que está diretamente relacionada com a eficiência do complexo enzimático. As enzimas têm um ponto ou uma faixa de temperatura e pH ótimos, onde a sua atividade enzimática é máxima. Em uma condição superior ou inferior a esse ponto ótimo, pode resultar na redução da atividade enzimática, subjugando a máxima eficiência das enzimas, o que seria prejudicial considerando aplicações em escala industrial.

A Figura 4.14 mostra as curvas obtidas de AE residual da FPase nos testes de termoestabilidade considerando-se as temperaturas de incubação de 40, 50, 60 e 70°C do extrato enzimático. Ao final dos 200 min de incubação a enzima ainda apresenta 50,6, 90,8, 82,7 e 68,1% de atividade residual às temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C, respectivamente.

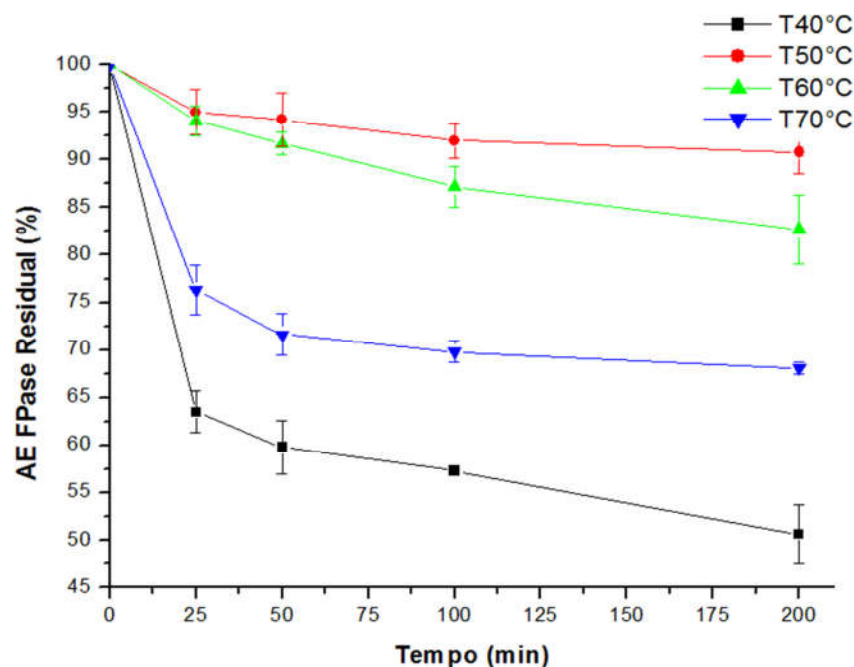


Figura 4.14: Termoestabilidade da celulase.

Estes resultados demonstram que a celulase é uma enzima termoestável nas temperaturas de 50 e 60°C. Essa característica permite que a etapa de hidrólise seja mais eficaz, pois enzimas termoestáveis apresentam atividade específica elevada o que demanda menor carga enzimática necessária na hidrólise, além de proporcionar maior estabilidade, flexibilidade e redução no tempo de processo, já que, em temperaturas mais elevadas a viscosidade da solução diminui, favorecendo a transferência de massa.

Termoestabilidades semelhantes foram observadas por Delabona *et al.* (2014), que obtiveram melhor desempenho da atividade da FPase para uma faixa de temperatura de 50 a 65°C, enquanto que na temperatura de 70°C verificaram a desativação térmica, chegando à redução da conversão máxima obtida. Outros autores também determinaram a termoestabilidade de enzimas celulasas obtidas por FES. Vasconcellos *et al.* (2014), produziram e caracterizaram celulasas de *Aspergillus niger* obtidos por diferentes sistemas de cultivo, onde a FPase obtida por FES apresentou estabilidade térmica à 50°C em um tempo de 1440 minutos de incubação, permanecendo com mais de 80% de sua atividade enzimática inicial.

Vinha *et al.* (2011), na caracterização de celulasas, observaram que as endoglucanases foram mais tolerantes a 50°C, mantendo mais de 80% da

atividade máxima mesmo após 2 h de incubação. Já Farinas *et al.* (2010), verificaram que os extratos enzimáticos obtidos por FES com o fungo *Aspergillus niger* eram altamente estável na faixa de temperaturas 35 e 50°C, e ressaltam que essa característica pode contribuir com a produção in situ e economia na etapa de conversão da biomassa em etanol. Cysneiros *et al.* (2013), caracterizaram um complexo enzimático de *Humicola grisea* (celulases, xilanase e β -glicosidase), os estudos demonstraram que a celulase e xilanase produzidas apresentaram maior atividade em uma temperatura de 50°C.

Yang *et al.* (2015), caracterizaram uma celulase ácida produzida por *Bacillus subtilis* BY-4, verificaram que a celulase purificada apresentou atividade máxima de 8,61 U.mL⁻¹ e que o valor ótimo temperatura na resposta de atividade da celulase era 60°C.

Entretanto, além da determinação da estabilidade térmica a avaliação da estabilidade ao pH também se faz necessária, uma vez que a estrutura tridimensional da enzima é fortemente afetada pelo pH. As mudanças causadas na estrutura da enzima afetam diretamente sua atividade catalítica, ou seja, em um pH específico (ponto ótimo) a enzima apresenta maior atividade e velocidade de reação, porém mudanças significativas no pH, podem acarretar a desnaturação da enzima e a perda das suas funções catalíticas.

A estabilidade da celulase do *A. niger* ao pH foi determinada pela incubação do extrato durante 200 min na ausência de substrato a 50°C, temperatura em que a enzima apresentou maior estabilidade. Os resultados referentes à incubação da enzima nos pHs 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 estão representados na Figura 4.15.

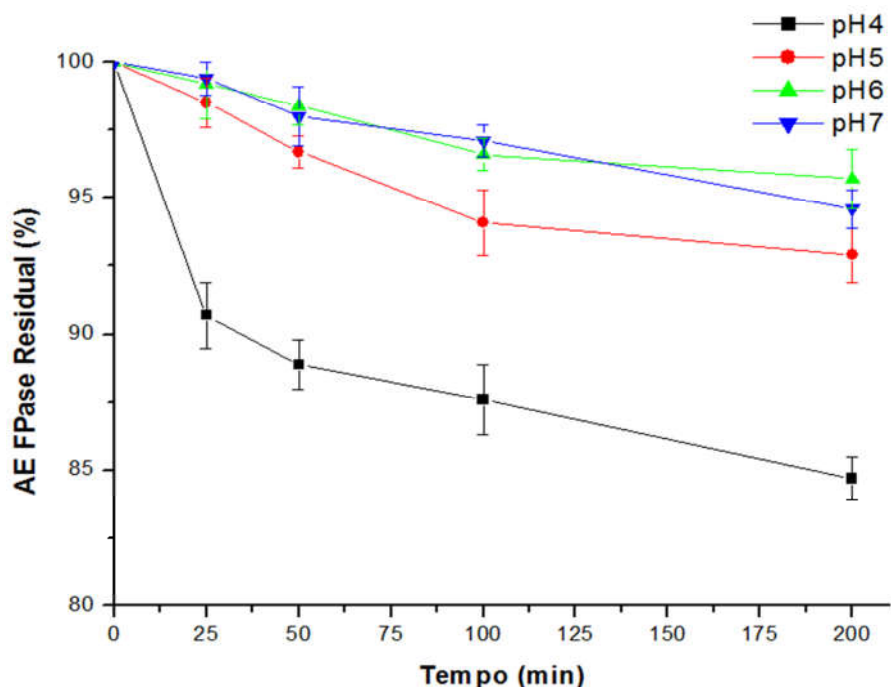


Figura 4.15: Estabilidade da celulase à diferentes pHs na temperatura de 50°C.

Até 25 min de incubação a 50°C, a FPase ainda apresentava atividade residual de 90,7, 98,5, 99,2 e 99,4% para os pHs 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 respectivamente, estes valores apresentaram queda mais branda para os pHs 6 e 7 e mais acentuada para os pHs 4 e 5 após este período de tempo. A enzima não se tornou inativa após 200 min de incubação em qualquer um dos pHs avaliados, apresentando 84,7, 92,9, 95,7 e 94,6% de atividade residual ao fim do tempo de incubação.

Os dados sugerem que o pH 6,0 é o ideal para FPase, nesse pH apresentou menor decaimento, entretanto o resultado obtido no pH 7,0 está muito próximo, um possível indicio que um pH intermediário em 6 e 7 possa ser o ideal, o qual favorecerá uma maior atividade enzimática residual.

Delabona *et al.* (2014), investigaram a influencia do pH sobre a atividade de diferentes celulases (FPases, betaglicosidases e endoglicanases) e concluíram que valores máximo de AE são obtidos com pHs na faixa de 3 à 6, indicando perfis de enzimas acidofílicas. A Fpase apresentou atividade máxima no pH 3,0 e valor baixo em pH 6,0. Os autores obtiveram a FPase por fermentação em estado sólido do bagaço da cana-de-açúcar com o fungo *Aspergillus niger*. Vasconcellos *et al.* (2014), obtiveram valores elevados de AE

de celulases (Endoglucanase) em pH 4,5, assim como Yang *et al.* (2015), obtiveram pH 4,5 como ponto ótimo para celulases ácida produzida por *Bacillus subtilis* BY-4.

Brito-Cunha *et al.* (2015), obtiveram celulases e hemicelulases utilizando farelo de trigo e *Streptomyces thermocerradoensis* termófila, onde a atividade ótima observada para FPase foi entre pH 4,0 e 5,0. Já Ang *et al.* (2013), realizaram a caracterização da FPase produzida por *Aspergillus fumigatus* SK1 em FES e obtiveram atividades enzimáticas elevadas em pH 5,0 e temperatura de 60°C.

Cysneiros *et al.* (2013), caracterizaram um complexo enzimático (celulases, xilanase e β -glicosidase), os estudos demonstraram que pH ótimo para celulases e xilanase foi 6,0. Quanto à β -glicosidase, a enzima revelou maior atividade em pH 6,5.

De uma maneira geral, a otimização da etapa de extração e caracterização das enzimas celulósicas obtidas por FES, são apenas duas etapas de um amplo processo, que necessita ser mais bem estudado e melhorado. Portanto, todo processo é passível de melhorias contínuas, tanto do ponto de vista econômico e industrial como social e ambiental, e a conciliação desses pontos, podem favorecer de forma plena a obtenção das enzimas celulásicas.

5 CONCLUSÃO

A partir das análises dos resultados da Matriz de Doehlert, sobre a extração do conjunto enzimático (FPase, CMCase e β -glicosidase), pode-se concluir que não há necessidade da utilização do ultrassom no processo de extração das enzimas celulolíticas, pois não demonstrou efeito significativo.

Os resultados obtidos através do planejamento Box-Behnken demonstraram que os termos quadráticos (Q) e lineares (L) dos parâmetros foram significativos na extração, mas de forma distinta entre as enzimas avaliadas. As variáveis significativas na extração da FPase foram T, t e pH quadráticos; CMCase foram t (Q), T (L) e a interação T (L) e pH (L); β -glicosidase foram os termos T (Q) e pH (L). As análises estatísticas demonstraram que os modelos obtidos descrevem de forma satisfatória o processo de extração das enzimas, afirmado pelos valores elevados do coeficiente de determinação R^2 e atestadas teste F.

A partir das superfícies de resposta e a função *desirability* foi possível determinar as condições ótimas de extração do conjunto de enzimático: t = 35,833 min, T = 38,333 °C e pH = 6,466, com desejabilidade global entre as enzimas de 0,80.

Através da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey foi possível determinar que a hidrólise é mais efetiva quando assistida por ultrassom, fato observado na maior razão sólido-líquido avaliada na hidrólise.

A caracterização parcial da celulase demonstrou termoestabilidade nas temperaturas de 50 e 60°C e uma estabilidade ao pH 6.

De modo, geral, a otimização do processo de extração das enzimas celulolíticas obtidas por FES, pode ser uma alternativa para a redução dos custos do processo, aumentando sua aplicabilidade e disponibilidade para fins biotecnológicos e fornecendo dados para a produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.; UEDA, K.; SAKA, S. **Hydrothermal decomposition of various crystalline celluloses as treated by semi-flow hot-compressed water.** *Journal of Wood Science*, v.60, n°4, p.278–286, 2014.
- AGUIAR, C. M.; **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *A. Niger*.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado).
- AHMED, I.; ZIA, M. A.; IFTIKHAR, T.; IQBAL, H. M. N. **Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes.** *BioResources*, v.6, p.4505–4522, 2011.
- ALCANO, M. J.; JAHN, R. C.; SCHERER, C. D.; WIGMANN, E. F.; SACCOMORI, F.; MORAES, V. M.; GARCIA, M. V.; COPETTI, M. V. **Suscetibilidade de *Aspergillus Spp.* A Ácidos Orgânicos Conforme O Ph.** In: XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene, 2014, São Paulo. *Proceedings*. Blucher Food Science Proceedings, 2014. V.1, n.1 p.91-92.
- ALVIRA, P.; TÓMAS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. **Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hidrolisis:** *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M.S. **Production of cellulases and xylanases by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation.** *Process Biochemistry*, v.48, n°9, p.1293-1302, 2013.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. **Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review.** *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v.7, n°2, p.163-173, 2014.

- ARANTES, V. & SADDLER, J.N. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** *Biotechnology for Biofuels*, v.3, n°4, p. 1-11, 2010.
- ARAUJO, P.; JANAGAPA, S.; HOLENA, E.; **Application of Doehlert uniform shell designs for selecting optimal amounts of internal standards in the analysis of prostaglandins and leukotrienes by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, n.°1260, p.102-110, 2012.
- ASGHER, M.; AHMED, N.; IQBAL, H. M.N. **Hyperproductivity of extracellular enzymes from indigenous white rot fungi (*P. chrysosporium* IBL-03) by utilizing agro-wastes.** *BioResources*, v.6, n°4, p.4454–4467, 2011.
- BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; ADAME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. **Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept.** *Bioresource Technology*, v.200, p.137-146, 2016.
- BALAT, M., BALAT, H., ÖZ. C. **Progresso in bioethanol processing.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v.34, n°5, p.551-573, 2008
- BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. **The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility.** *ChemSusChem*, v.8, n°2, p.275–279, 2015.
- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.** *Biotechnology Advances*, v.27, p.833–848, 2009.
- BARRIOS-GONZÁLES, J. **Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications.** *Process Biochemistry*, v.47, n°2, p.175-185, 2012.
- BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*.** Piracicaba: Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado).Superior

- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição.** *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.45, nº1, p.1282-1289, 2010.
- BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B. **Produção de açúcares fermentáveis a partir de bagaço de cana por hidrólise enzimática após auto-hidrólise e refino mecânico.** *Bioresource Technology*, v.180, p.97-105, 2015.
- BEHERA, S. S. & RAY, R. C. **Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v.86, p.656-669, 2016.
- BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V.; ROSA, C. D.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. **Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis.** *Enzyme Microbial Technology*, v.52, p.247-250, 2013.
- BENOLIEL, B.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. **A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura.** *Springer Plus*, v.2, p. 1–7, 2013.
- BETANCUR, G. J. V. & PEREIRA JR., N. **Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: Diluted acid pretreatment optimization.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 3, 2010.
- BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado).
- BOICO, D. G. **Utilização do permeado de soro de leite na produção de celulases por fermentação em estado sólido do bagaço de cana.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado).
- BORTOLAZZO, Nara G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** Piracicaba: Escola

- Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado).
- BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.
- BRENELLI, L. B.; MANDELLI, F.; MERCADANTE, A. Z.; ROCHA, G. J. M.; ROCCO, S. A.; CRAIEVICH, A. F.; GONÇALVES, A. R.; CENTENO, D. C.; NETO, M. O.; SQUINA, F. M. **Acidification treatment of lignin from sugarcane bagasse results in fractions of reduced polydispersity and high free-radical scavenging capacity**. *Industrial Crops and Products*, v.83, p.94-103, 2016.
- BRITO-CUNHA, C. C. Q.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S. A.; FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M. **Production of Cellulases from a Novel Thermophilic Streptomyces thermocerradoensis I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate**. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, v.4, n°1, p.90-99, 2015.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y.; YU, H. S. **Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.12, p.537-542, 1996.
- CAMASSOLA, M. & DILLON, A. J. P. **Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by Penicillium echinulatum**. *Industrial Crops and Products*, v.20, n°2-3, p.642-647, 2009.
- CANTERO, D. A.; MARTINEZ, C.; BERMEJO, M. D.; COCERO, M. J. **Simultaneous and selective recovery of cellulose and hemicellulose fractions from wheat bran by supercritical water hydrolysis**. *Green Chemistry*, v.17, n°1, p.610–618, 2015.
- CARDONA, C, A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I, C. **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspective**. *Bioresource Technology*, v.101, p.4754-4766, 2010.
- CASTRO, A. M. & PERREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. *Química Nova*, v.33, n°1, p.181-188, 2010.

- CHANDEL, A.K.; CHANDRASEKHAR. G.; SILVA, M. B.; SILVA, S. S. **The realm of cellulases in biorefinery development.** *Critical Reviews. Biotechnology*, v.32, n°3, p.187-202, 2012.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; TIXER, A. F.; ALBER-VIAN, M. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications.** A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.34, p.540-560, 2017.
- CHEN, P.; TAO, S.; ZHENG, P. **Efficient and repeated production of succinic acid by turning sugarcane bagasse into sugar and support.** *Bioresource Technology*, v.211, p.406-413, 2016.
- CHEN, X.; ZHANG, Y.; GU, Y.; LIU, Z.; SHEN, Z.; CHU, H.; ZHOU, X. **Enhancing methane production from rice straw by extrusion pretreatment.** *Applied Energy*, v.122, p.34–41, 2014.
- CHENG, K.; ZHANG, J.; PING, W.; GE, J.; ZHOU, Y.; LING, H.; XU, J. **Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process.** *Applied Biochemistry and Biotchnology*, v.151, p.43-50, 2008.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, **A geração termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil**, junho 2011. Brasília, 2011. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_15_45_40_geracao_termo_baixa_res.pdf>. Acessos 15 junho de 2016.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Indicadores da agropecuária/companhia nacional de abastecimento.** Brasília, n°.5, p.9, 2016.
- CSISZAR, E.; SZABO, O. E.; TOTH, K.;SZAKACS, G.;KOCZKA, B. **Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.22, p.249-256, 2015.
- CUI,Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. **Influence of fermentation contidions and scale on the submerged**

- fermentation of *Aspergillus awamori*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.157–167, 1998.
- CUNHA, F. M.; KREKE, T.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. **Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production.** *Bioresource Technology*, v.172, p.249-252, 2014.
- CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. **Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho.** *Ciência Animal Brasileira*, v.14, n°4, p.426-435, 2013.
- DELABONA, P. S.; FARINAS, S. C.; PIROTA A. B. **Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using enzyme extract and whole solid-state fermentation medium of two newly isolated strains of aspergillus A. *Oryzae*.** *Chemical Engineering Transactions*, v. 38, p.259-264, 2014.
- DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. **Biowastes-to-biofuels.** *Energy Conversion and Management*, v.52, n°4, p.1815-1828, 2011.
- DEVENDRA, L. P.; KUMAR, M. K.; PANDEY, A. **Evaluation of hydrotropic pretreatment on lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v.213, p.350–358, 2016.
- DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. **Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation.** *Industrial Crops and Products*, v.38, p.6-13, 2012.
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, D. F.; ROSSELI, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. **Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcaneenergy.** *Bioresource Technology*, v.103, n°1, p.152-161, 2012.
- DILLON, A. J. P.; ZORGI, C.; CAMASSOLA, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -**

- glucosidase activities.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.70, p.740–746, 2006.
- DIONISI, D.; ANDERSON, J. A.; AULENTA, F.; MCCUE, A.; PATON, G. **The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol.** *a review Journal Chemical Technology Biotechnology*, v.90, n°3, p.366–383, 2015.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – EMBRAPA, **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**, dezembro, 2011. São Paulo: EMBRAPA, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/919344/1/DOC542011.pdf>>. Acesso em: 17 de agosto de 2016.
- ESPINOZA-ESCALANTE, F. M.; PELAYO-ORTIZ, C.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.; ALCARAZ-GONZÁLEZ, V.; BORIES, A. **Multiple response optimization analysis for pretreatments of Tequila's stillages for VFAs and hydrogen production.** *Bioresource Technology*, v.99, p.5822–5829, 2008.
- FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação.** Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. p.13, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/919344/1/DOC542011.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2016.
- FARINAS, C. S. **Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.52, p.179–188, 2015
- FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; JUNIOR, A. B.; TARDIOLI, P. W.; NETO, V. B.; COURI, S. **Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature.** *New Biotechnology*, v.27, n°6, p.810-815, 2010.
- FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida.**

São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 15 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 22).

FERREIRA, V. **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração.** Rio de Janeiro: Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 132 p. Tese (Doutorado).

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2009. 134 p. Tese (Doutorado).

FREIRE, B.; COELHO, G. D.; CUNHA, L. R. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; CASEMIRO, P. M. S. ABREU R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação de fungo basidiomiceto. p.640-647. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015

FUJII, T.; MURAKAMI, K.; SAWAYANA, S. **Cellulase hyperproducing mutants derived from the fungus *Trichoderma Reesei* QM9414 produced large amounts of cellulase at the enzymatic and transcriptional levels.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.74, n°2, p.419-422, 2010.

GARAI, D. & KUMAR, V. **A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L.** *Industrial Crops and Products*, v.44, p.352-363, 2013.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** Campinas - Universidade Estadual De Campinas, 2009. 117 p. Dissertação (Mestrado).

- GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; FOLETTTO, 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.
- GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; MAZUTTI, M. A.; JAHN, S. L. Produção de enzimas celulíticas de *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na hidrólise enzimática de biomassa; p. 2458-2465. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities.** *Pure and Applied Chemistry*, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268,1987.
- GIORDANO, P. C.; BECCARIAB, A. J.; GOICOECHEAA, H. C.; OLIVIERI, A. C. **Optimization of the hydrolysis of lignocellulosic residues by using radial basis functions modeling and particle swarm optimization.** *Biochemical Engineering Journal*, v.80, p.1-9, 2013.
- GONZÁLEZ, J. B. **Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications.** *Process Biochemistry*, v.47, p.175-185, 2012.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; OLIVEIRA, E. M. M.; FÁVARO, L. C. L.; PENHA, E. M. Comparação da produção de enzimas celulíticas e hemicelulíticas por linhagens mutantes e parental do *Aspergillus niger* 3T5B8. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016.** Disponível em: <<https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4575-enzitec2016.pdf>>. Acesso em 10 de agosto de 2016.
- GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; OUTURIER3, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. **Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass.** *Trends in Biochemical Sciences*, v.41, n°7, p.633-645, 2016.

- HAGHIGHI, S. M.; HOSSEIN, A. G.; TABATABAEI, M.; SALEHI, G. J.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.27, p.77-93, 2013.
- HALL M.; BANSAL P.; LEE, J. H.; REALFF, M. J.; BOMMARIUS, A. S. **Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate.** *The FEBS Journal*, v.277, p.1571–1582, 2010.
- HAMIDREZA, S. G.; FAN, M.; MCVICAR, B. **Bioengineering for utilisation and bioconversion of straw biomass into bio-products.** *Industrial Crops and Products*, v. 77, p.262-274, 2015.
- HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. **Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation.** *Process Biochemistry*, v.50, n°9, p.1327–1341, 2015.
- HENDRIKS, A. T. W. M & ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v.100, n°1, p.10-18, 2009.
- IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H. I.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. **The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes.** *BioResources*, v.8,n°1, p.145–157, 2013.
- IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A. **Characterization of Exo 1,4-β glucanase produced from *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of orange peel waste.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.3, p.580–584, 2012.
- JACQUET, N.; VANDERGHEM, C.; DANTHINE, S.; QUIÉVY, N.; BLECKER, C.; DEVAUX, J.; PAQUOT, M. **Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers.** *Bioresource Technology*, v.121, p.221–227, 2012.

- JAIN, A.; WEI, Y.; TIETJE, A. **Biochemical conversion of sugarcane bagasse into bioproducts.** *Biomass and Bioenergy*, v.93, p. 227-242, 2016.
- JANU, K. U.; SINDHU, R.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. **Studies on physicochemical changes during alkali pretreatment and optimization of hydrolysis conditions to improve sugar yield from bagasse.** *Journal Scientific Industrial Research*, v.70, n°11, p.952–958, 2011.
- JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. **Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies.** *Cellulose*, v.16, p.687-697, 2009.
- KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROCO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse.** *Bioresource Technology*, v.114, p.735-739, 2012.
- KHARE, S. K.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass.** *Biochemical Engineering Journal*, v.102, p.38–44, 2015.
- KNOX, J. P. **Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls.** *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.308-313, 2008.
- KONG, X.; XU, H.; WU, H.; WANG, C.; AIYONG, E.; MA, J.; REM, X.; JIA, H.; WEI, C.; JIANG, M.; OUYANG, P. **Biobutanol production from sugarcane bagasse hydrolysate generated with the assistance of gamma-valerolactone.** *Process Biochemistry*, prova artigo corrigido, 14 de julho de 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135951131630191X>>.
Acesso em: 11 de agosto de 2016.
- KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. **Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw.** *Biotechnology for Biofuels*, v.2, n°31, 2009.

- KOSTYLEV, M. & WILSON, D. **Synergistic interactions in cellulose hydrolysis**. *Biofuels*, v.3, n°1, p.61-70, 2012.
- KRISHNA S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. **Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414**. *Bioprocess Engineering*, 22, p. 467-470, 2000.
- KUHADA, R. C.; DESWALA, D.; SHARMAA, S.; HATTACHARYAB, A.; JAINA, K. K.; KAURA, A.; PLETSCHKEB, B. I.; SINGHC, A.; KARPD, M. **Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.55, p.249–272, 2016.
- KUMAR, S.; DHEERAN, P.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. **Continuous ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate at high temperature with cell recycle and in-situ recovery of ethanol**. *Chemical Engineering Science*, v.138, p.524-530, 2015.
- KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J.; AKUMA, J.; WALKER, G. M.; BREMNER, D. H. **.Stimulation of bioprocesses by ultrasound: Review Article**. *Biotechnology Advances*,v.29, n°6, p.768-780, 2011.
- LAOPAIBOOM, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V. LAOPIBOOM, L. **Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production**. *Bioresource Technology*, v.101, n°3, p.1036-1043, 2010.
- 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 Agricultural Biotechnology*, v.2, p.21-25, 2013.
- LEE, J. W. & JEFFRIES, T. W. **Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors**. *Bioresour. Technology*, v.102, n°10, p.5884–5890, 2011.
- LEITE, P.; SALGADO, J. M.; VENÂNCIO, A.; DOMINGUEZ, J. M.; BELO, I. **Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and**

- cellulase production by solid-state fermentation.** *Bioresource Technology*, v.214, p.727-746, 2016.
- LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. **Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method.** *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.1, n°2, p.7-13, 2012.
- LIMA, M. B.; ALEGRE, R. MONTE; PADILHA, G. S. Produção de fitase por fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz e *aspergillus niger* e *aspergillus oryzae*, p.2105-2112. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015.
- LUNELLI, F. C.; SFALCIN, P.; SOUZA, M.; ZIMMERMAM, E.; DAL PRÁ, V.; FOLETTO, E. L.; JAHN, S. L.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. **Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars.** *Biosystems Engineering*, v. 124, p.24-28, 2014.
- MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I. **Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases.** *Process Biochemistry*, v.46, n°5, p.1196-1201, 2011.
- MALI, S.; DEBIAGI, F.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. **Starch, sugarcane bagasse fibre, and polyvinyl alcohol effects on extruded foam properties: A mixture design approach.** *Industrial Crops and Products*, v.32, p.353–359, 2010.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. **Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** *Química Nova*, v.34, n°5, p.831-840, 2011.
- MENDES, T. P. P. **Estudo dos processos de obtenção de açúcares redutores totais (ART) a partir do bagaço de frutas.** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2014. 94 p. Dissertação (Mestrado).

- MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente.** Lorena: Escola de Engenharia de Lorena Universidade de São Paulo, 2010, 101 p. Dissertação (Mestrado).
- MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. **Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico.** *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas*, v.19, n°2, p.1365-1391, 2015.
- MESA, L.; MORALES, M.; GONZALÉZ, E.; CARA, C.; ROMERO, I; CASTRO, E.; MUSSATO, S. I. **Restructuring the processes for furfural and xylose production from sugarcane bagasse in a biorefinery concept for ethanol production.** *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.85, p.196-202, 2014.
- MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A. **Sugarcane breeding and selection for more efficient biomass conversion in cellulosic ethanol.** In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. L. eds., *Routes to cellulosic ethanol.* New York: Springer, 2011, p.53-71.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*. v.31, n°3, p.426-428, 1959.
- MONRROY, M.; ORTEGA, I.; RAMÍREZ, M.; BAEZA, J.; FREER, J. **Structural change in Wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis.** *Enzyme Microbial Technology*, v.49, n°5, p.472-477, 2011.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. **Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood – quantification of macromolecular components and volatile extractives.** *Revista Árvore*, v.29, n°3, p.461-470, 2005.
- NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. **Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw.** *Bioresource Technology*, v.121, p.355-361, 2012.
- NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. **Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances.** *Industrial Crops and Products*, Disponível on-line 19 de fevereiro de 2016.

- NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. **Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies.** *Bioresource Technology*, v.208, p.184-194, 2016.
- 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.
- NOVOZYMES LATIM AMERICAN. **II Encontro de Pesquisa e Inovação Embrapa Agroenergia.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355063/8134956/Palestra+Pedro+Fernandes/3525fcb7-42b5-420f-85cc-f47049e97213>>. Acesso em: 09 de setembro de 2016.
- NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C.V.; MARTINS, A. A. **Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil.** *Revista Liberato*, v.14, n°22, p.113-238, 2013.
- OLIVEIRA, A. C. **Melhoria do processo Hatschek, por meio de tratamento de dados históricos, para fabricação de telhas onduladas.** São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado).
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** *Revista Saúde e Biologia*, v.7, n.3, p.97-109, 2012.
- OZBEK, B.; ULGEN, K. O. **The stability of enzymes after sonication.** *Process Biochemistry*, v. 36, n°9, p.1037-1043, 2000.
- PATIST, A. & BATES, B. **Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production** *Innov. Food Science. Emerging Technology.*, v.9, p.147-154, 2008.
- PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSOM, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. **Fungal cellulases,** *Chemical Reviews*, v.115, n°3, p.1308-1448, 2015.

- PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.** *Series on biotechnology*, v.2, p.47, 2008.
- PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. **Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Using Enzyme Extract and Whole Solid-state Fermentation Medium of Two Newly Isolated Strains of *Aspergillus Oryzae*.** *Chemical Engineering Transactions*, v.38, p.259- 264, 2014.
- PLÁCIDO, S. & CAPAREDA. **Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production.** *Bioresource. Bioprocessing*, v.2, n°1, p.1–12, 2015.
- POPPER, Z. A, MICHEL G, HERVÉ C, DOMOZYCH DS, WILLATS WGT, TUOHY MG, KLOAREG B, STENGEL DB. 2011. **Evolution and diversity of plant cell walls: From algae to flowering plants.** *Annual Review of Plant Biology*, v.62, p.567-590, 2011.
- PORTADOR, M.; HARDIE, A. G.; URAS, U.; GÖRGENS, J.; KNOETZE, J. H. **Production of char from vacuum pyrolysis of South-African sugar cane bagasse and its characterization as activated carbon and biochar.** *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.96, p.24-32, 2012.
- RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. **Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol.** *Fuel*, v.136, p.349-357, 2014.
- RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, A. A.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. **Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide.** *Biomass and Bioenergy*, v.35, p.2600-2607, 2011.
- RABELO, S.C. **Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP - São Paulo, 2010, 414 p. (Tese de Doutorado).

- RABELO, A. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. 180 p. Dissertação (Mestrado).
- RABEMANOLONTSOA, H.; KUNINORI, Y.; SAKA, S. **High conversion efficiency of Japanese cedar hydrolyzates into acetic acid by co-culture of *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium thermocellum*.** Journal. Chemical Technology and Biotechnology, v.9, n°4, p.1040-1047, 2015
- SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; FIGUEIREDO, A. L. **Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira - EMBRAPA, v.15, n°11, p.1290-1296, 2010.
- SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnology Advances*, v. 27, n°2, p. 185-194, 2009.
- SANTOS, K. M. A.; ARAÚJO, M. L.; SILVA, G. F.; ABUD, A. K. S.; OLIVEIRA JR, M. Avaliação das atividades enzimáticas de pectinase e poligalacturonase com diferentes proporções de casca de coco verde e sabugo de milho. p.4193-4200. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015b.
- SANTOS, T. C.; DINIZ, G. A.; SANTOS, D. C.; SANTOS, I. P. C.; FRANCO, M. Produção de celulasas estáveis a temperatura e ph a partir da fermentação em estado solido da palma forrageira, p.1010-1017. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. M. **Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes.** *Food Chemistry*, v.133, n°4, p.1299-1204, 2012b.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES V. M.; REZENDE, S. T. **Potencial da palha de cana-de-**

- açúcar para produção de etanol.** *Química Nova*, v.35, n°.5, p.1004-1010, 2012.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. **Bioethanol production from agricultural wastes: an overview.** *Renewable Energy*, v. 37, p.19-27, 2012.
- SCHEUFELE, F.B. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas.** 2012. Toledo Universidade Estadual do Oeste do Paraná- 118 p. Dissertação (Mestrado).
- SERRA SIMONE A. SERRA; CHRISTIAN M. TOMM; JHÉSSICA C. ARAÚJO; THAIS D. MENDES; LÉIA C. L. FAVARO; MÔNICA C. T. DAMASO. **Seleção de meio de cultivo para produção de celulases por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa e comparação entre linhagens mutantes e parental.** *II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia*, Brasília, 2015.
- SHAIKHA, H. M.; ADSULM. G.; GOKHALE, D. V.; VARMAA, A. J. **Enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by partial modification of its chemical structure.** *Carbohydrate Polymers*, v.86, n°2, p.926-968, 2011.
- SHIRKAVANDA, E.; BAROUTIANA, S.; GAPESB, D. J.; YOUNGA, B. R. **Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment: A review - Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.54, p.217-234, 2016.
- SILVA, D. D. V.; DUSSAN, K. J.; HERNÁNDEZ, V.; SILVA, S. S.; CADONA, C. A.; ALMEIDA, M. G. **Effect of volumetric oxygen transfer coefficient ($k_L a$) on ethanol production performance by *Scheffersomyces stipitis* on hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysate.** *Biochemical Engineering Journal*, v.112, p.249-257, 2016.
- SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; TRES, M. V.; ROSA, C. D.; MEIRELLES, M. A. A.; SOARES, M. B. A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. **Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity.** *Biocatalysis Agricultural Biotechnology*, v.2, p.102-107, 2013.

- SILVA, A. S. A.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S. **Bon EPS. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation.** *Bioresource Technology*, v.101, p.7402–7409, 2010.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de Segunda Geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Rio de Janeiro: Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado).
- SILVA, N. K. G.; BARBOSA, R. C.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. **Crescimento celular e produção de beta-galactosidase de celulase por A. niger em soro de leite.** 8º congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica. Anais, Uberlândia, MG, 2009.
- SINDHU, R.; BINODA, P.; PANDEY, A. **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview.** *Bioresource Technology*, v.199, p.76–82, 2016a.
- SINDHU, R.; GNANSOUNOUB, E.; BINODA, P.; PANDEY, A. **Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview.** *Renewable Energy*, v.98, p.203-215, 2016b.
- SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. **Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices.** *Renewable Energy*, v.50, p.488-493, 2013.
- SINGHANIA, R. R.; SAINI, R.; ADSUL, M.; SAINI, J. K.; MATHUR, A.; TULI, D. **An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction.** *Biochemical Engineering Journal*, v.102, p.45-48, 2015.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K. LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, n°7, p.541-549. 2010.

- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDY, A. **Recent advances in solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering*, v.44, p.13-18, 2009.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. 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.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. **Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil.** *Bioresource Technology*, v.101 p.4820–4825, 2010.
- SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C. R. **The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels** . Overview Articles – *BioScience*, v.64, n°3, p.192–201, 2014.
- SOUSA, V. C.; GUEDES, K.; PLÁCIDO, M.; LOPES, V.S.; FISCHER, J.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U.C. **Produção de etanol celulósico por complexo enzimático de fungo do cerrado: efeito do meio sólido na produção da enzima e carga de bagaço na fermentação etílica.** *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v.1, n°1, p.662-665, 2014.
- SOUZA, M.; MEZADRI, E. T.; ZIMMERMAN, E.; LEAES, E. X.; BASSACO, M. M.; DAL PRÁ, V.; FOLETTO, E.; CANCELLIER, A.; TERRA, L. M.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. **Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.20, n°1, p.89-94, 2013.
- SUBHEDAR, P. B.; RAY, P.; GOGATE, P. R. **Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, In Press, Corrected Proof, 2017.
- SUBHEDAR, P. B.; BABU, N. R.; GOGATE, P. R. **Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.22, p.326-332, 2015.

- SUBHEDAR, P. B. & GOGATE, P. R. **Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.101, p.108-1114, 2014.
- SZABO, O. E.; CSISZAR, E.; KOCZKA, B.; KISS, K. **Ultrasonically assisted single stage and multiple extraction of enzymes produced by *Aspergillus oryzae* on a lignocellulosic substrate with solid-state fermentation.** *Biomass and bioenergy*, v.75, p.161-169, 2015.
- SZABO, 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.
- THOMAS, L.; LARROCHEB, C.; PANDEYA, A. **Current developments in solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v.81, p.146-161, 2013.
- TRZCINSKI, A. P. & STUCKEY, D. C. **Contribution of acetic acid to the hydrolysis of lignocellulosic biomass under abiotic conditions.** *Bioresource Technology*, v.185, p.441–444, 2015.
- UMMARTYOTINA, S. & MANUSPIYAB, H. **A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.41, p.402-412, 2015.
- União da Indústria de Cana-de-Açúcar – ÚNICA, Bioeletricidade: **O que falta para esta alternativa energética deslanchar**, setembro 2012. Disponível em:
 <<http://www.unica.com.br/colunas/470156692036979688/bioeletricidade-porcento3A-o-que-falta-para-esta-alternativa/>>. Acesso em: 20 julho de 2016.
- VARSHNEY, V.K. & NAITHANI, S. **Chemical functionalization of cellulose derived from nonconventional sources.** S. Kalia, B.S. Kaith, I. Kaur (Eds.), *Cellulose Fibers: Bio-and Nano-Polymer Composites*, Springer, Berlin, Heidelberg (2011), p. 43–60.
- VASCONCELLOS, V. M.; CGIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Produção e caracterização de (hemi)celulases de *Aspergillus niger* obtidas por diferentes sistemas de cultivo, p.1722-1729. In: **Anais do XX**

- Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n°2. São Paulo: Blucher, 2015.
- VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; MACRAE, A.; SILVA BON, E. P.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. **Cellulase production by streptomyces viridobrunneus SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.164, n°3, p.256-267, 2011.
- VOLL, F. A. P. **Decomposição do peróxido de hidrogênio sobre catalisadores de paládio.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008. 116 p. Dissertação (Mestrado).
- 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.
- WANG, J. CAO, Y. BAOGUO, S.; WANG, C.; MO, Y. **Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic.** *Ultrason. Sonochemistry*, v.18, p.534-540, 2011.
- WERNER , K.; POMMER, L.; BROSTRÖM, M. **Thermal decomposition of hemicelluloses.** *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.110, p.130-137, 2014.
- XI, Y.; DAI, W.; XU, R.; ZHANG, J.; CHEN, K.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P. **Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using Actinobacillus succinogenes.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.36, p.1779–1785, 2013.
- YANG, W.; MA, LI.; MENG, F.; JI, S.; XIN, H.; CAO, B. **Characterization of an acidic cellulase produced by Bacillus subtilis BY-4 isolated from gastrointestinal tract of Tibetan pig.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v.56, p.67-72, 2015.
- YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. **Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.** *Biomass and Bioenergy*, v.67, p.329-338, 2014.

- YOO, L. W.; NHOG, G. C.; CHUA, A. S. M. **Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.53, n.4, p.250-256, 2013.
- YOO, C. G.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B.; KIM, T. H. **Pretreatment of corn stover using low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) process.** *Bioresource Technology*, v.102, n°21, p.10028–10034, 2011.
- ZHANG, Z.; GAO, X.; WANG, C.; ZHENG, Z.; WANG, L.; LIU, J. **One-pot stereoselective synthesis of chiral 1, 3-oxathiolane by *Trichosporon laibachii* lipase: Optimization by response surface methodology integrated a desirability function approach.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.133, p.27–34, 2016.
- ZHAO, Y.; CHEN, M.; ZHAO, Z.; YU, S. **The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens.** *Food Chemistry*, v.185, p.112-118, 2015.

ANEXO I

Soluções Utilizadas

O reagente DNS (Ácido Dinitrosalicílico) utilizada na determinação AE, AR foi preparado obedecendo a seguinte sequência: 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de NaOH. 1416 mL de água destilada. Dissolveu-se em aquecimento brando 7,6 mL de fenol (fundido a 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Em seguida, adicionou-se o fenol e o metabissulfito de sódio à solução de DNS, NaOH e água destilada.

Solução tampão 0,1M (100mM) citrato de sódio pH 4,8 utilizada na determinação AE foi preparada conforme a seguir: preparou-se 500 mL de uma solução 100 mM de ácido cítrico a partir de 10,5 g de ácido cítrico PA (solução A), preparou-se similarmente 500 mL de uma solução 100 mM de citrato de sódio dihidratado a partir de 14,7 gramas de citrato de sódio PA. Em seguida, foi misturada uma alíquota de 46 mL da solução A em 54 mL da solução B, sendo acrescentado água deionizada até 200 mL controlando o pH até o final.

Solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 utilizada na extração das enzimas da FES foi preparada conforme a seguir: preparou-se 1000 mL de uma solução 50 mM de fosfato de sódio (solução A) a partir de 6,95 g de fosfato de sódio monobásico PA, preparou-se também 100 mL de uma solução 50 mM de fosfato de sódio bibásico (solução B) a partir de 13,41 g de fosfato de sódio bibásico PA. Em seguida, misturou-se 195 mL da solução A e 305 mL da solução B, sendo acrescentado água deionizada até 1000 mL controlando pH.

A solução tampão carbonato-bicarbonato 200 mM pH 9,0 utilizada na extração foi preparada conforme a seguir: preparou-se 100 mL de uma solução 200 mM de carbonato (solução A) a partir de 2,12 g de carbonato de sódio anidro e 400 mL de uma solução 200 mM de bicarbonato (solução B) a partir de 6,72 g de bicarbonato de sódio. Foi misturada uma alíquota de 20 mL da solução A com 230 mL da solução B, acrescentando água deionizada até 1000 mL controlando o pH.

Solução tampão citrato 100 mM pH 5 utilizada na extração foi preparada conforme a seguir: preparou-se 300 mL de uma solução 100 mM de ácido cítrico (solução A) a partir de 6,3 g de ácido cítrico PA e 400 mL de uma solução 100 mM de citrato de sódio (solução B) a partir de 11,76 g de citrato de sódio PA. Foi misturada 205 mL da solução A com 295 mL da solução B, acrescentando água deionizada até 1000 mL controlando o pH.

ANEXO II

Tabela 2-A: Valores dos coeficientes de regressão do modelo e p-valores para as enzimas FPase, CMCase e β -glicosidase, obtido a partir da matriz de Doehlert ($\alpha = 0,05$).

Fator	FPase		CMCase		β -glicosidases	
	Coefi.	p-valor	Coefi.	p-valor	Coefi.	p-valor
Intercpt.	0,35175	0,000004	0,32125	0,000015	1,41225	0,000315
(1) Ultra (L)	0,00517	0,365893	-0,00333	0,665695	0,05550	0,562742
Ultra (Q)	-0,01525	0,127649	-0,01475	0,253770	-0,18975	0,235772
(2) pH (L)	-0,00317	0,560272	-0,00519	0,510741	0,13828	0,204451
pH (Q)	-0,11826	0,000510	-0,10742	0,001976	-0,81346	0,007941
1L by 2L	0,01443	0,234375	0,01847	0,277626	0,14030	0,472322

FPase: $R^2=0,9888$, $R_{AJ}=0,9749$; CMCase: $R^2=0,9634$, $R_{AJ}=0,9176$; β -glicosidase: $R^2=0,9342$, $R_{AJ}=0,8520$

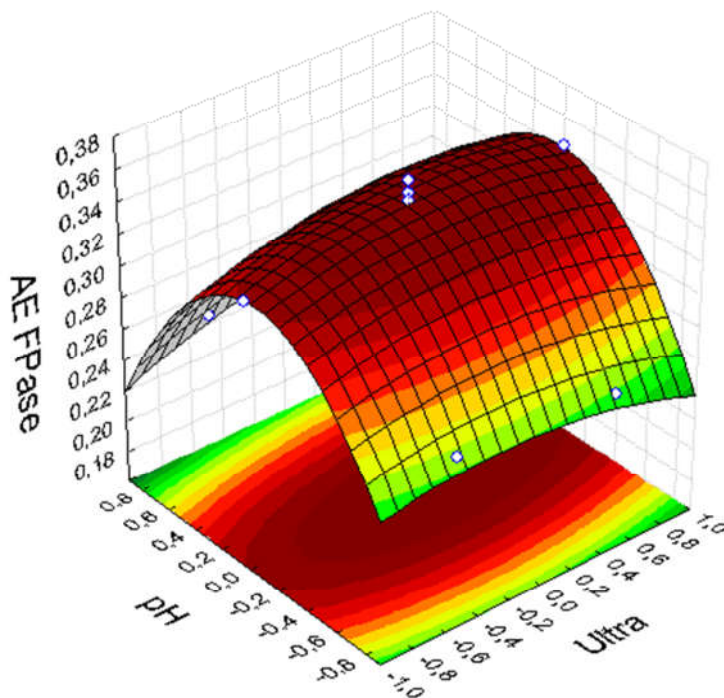


Figura 2-A: Superfície de resposta para AE FPase em função do Ultrassom e pH na extração enzimática.

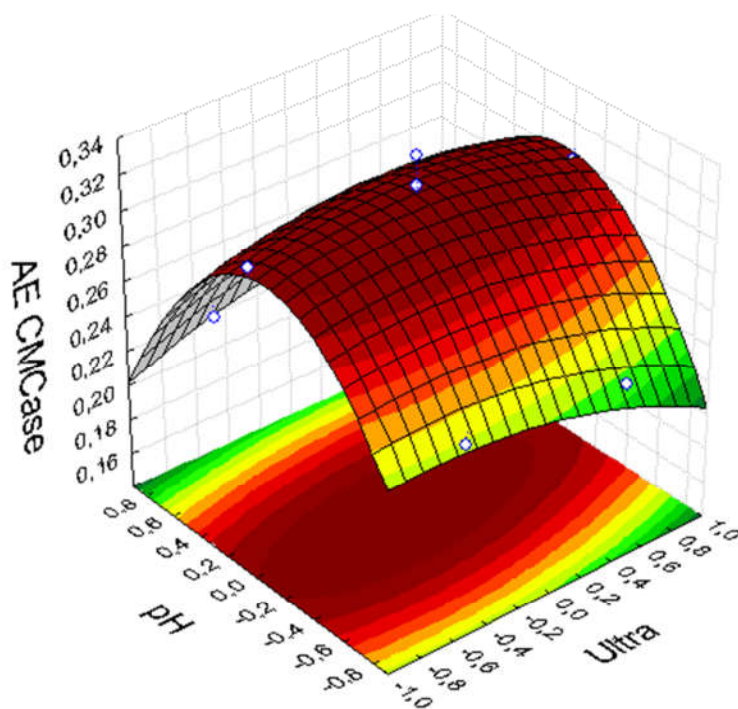


Figura 2-B: Superfície de resposta para AE CMCase em função do Ultrassom e pH na extração enzimática.

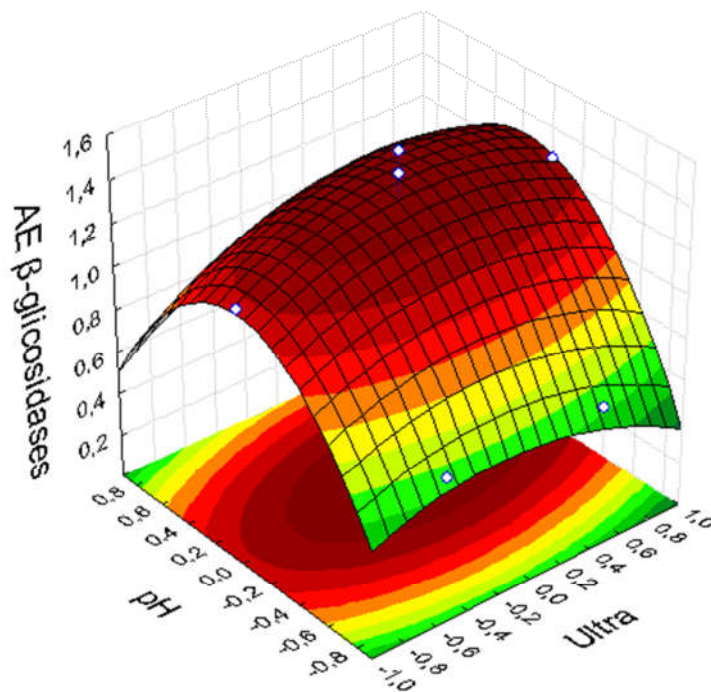


Figura 2-C: Superfície de resposta para AE β-glicosidase em função do Ultrassom e pH na extração enzimática.

ANEXO III

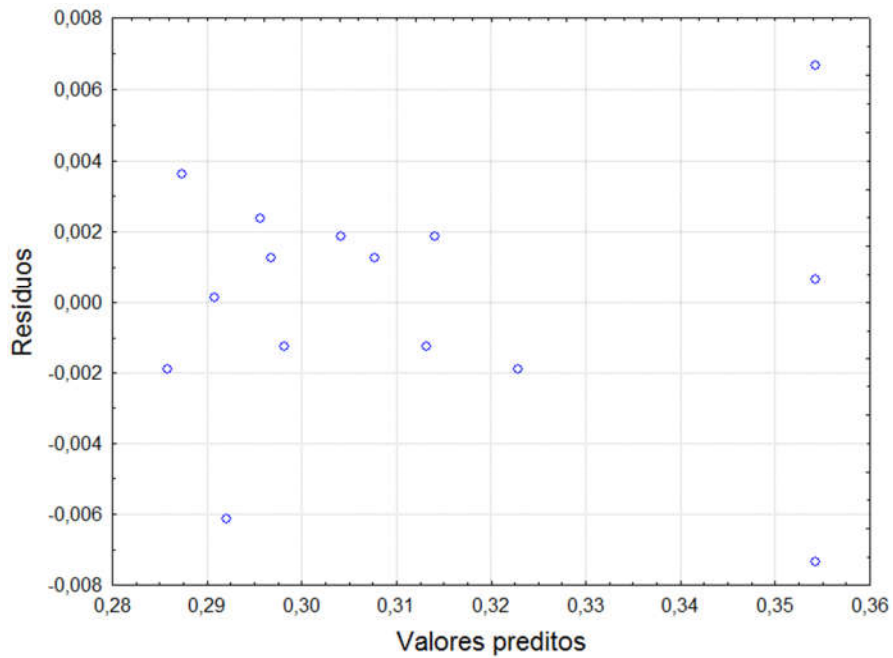


Figura 3-A: Gráfico dos resíduos versus os valores preditos pelo modelo, para os resultados de AE da FPases.

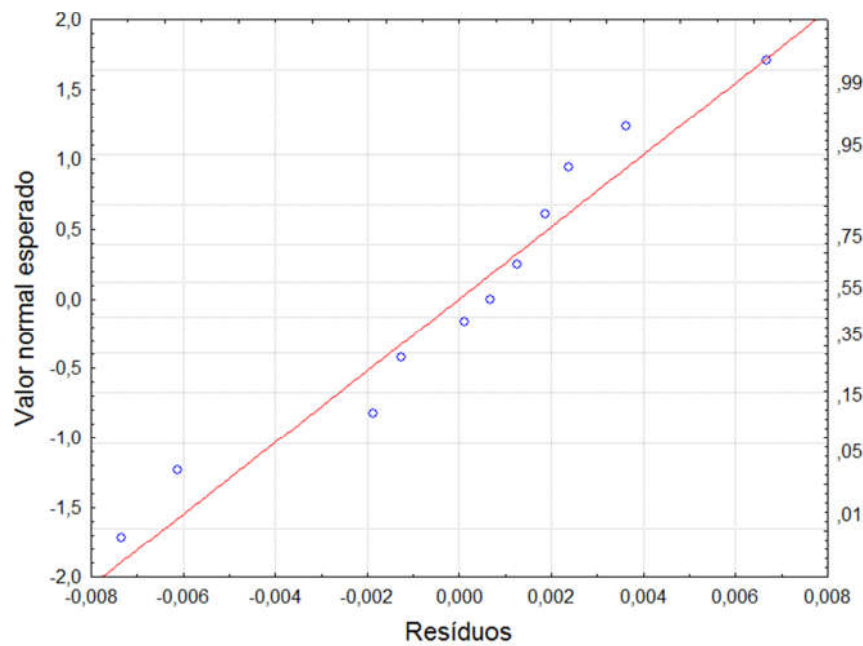


Figura 3-B: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para AE – FPase.

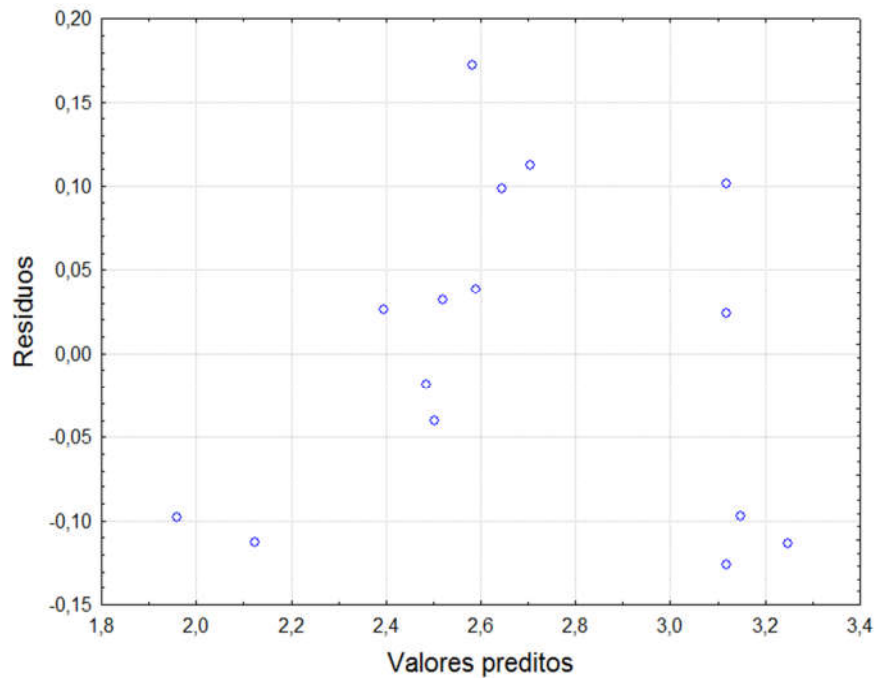


Figura 3-C: Gráfico dos resíduos versus os valores preditos pelo modelo, com base nos resultados de AE da β -glicosidase.

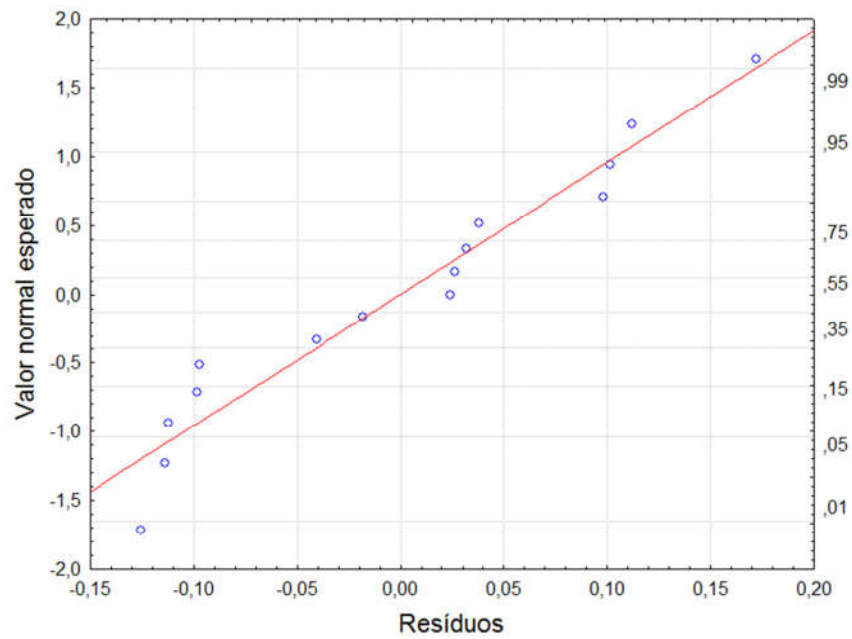


Figura 3-D: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para AE β -glicosidase.

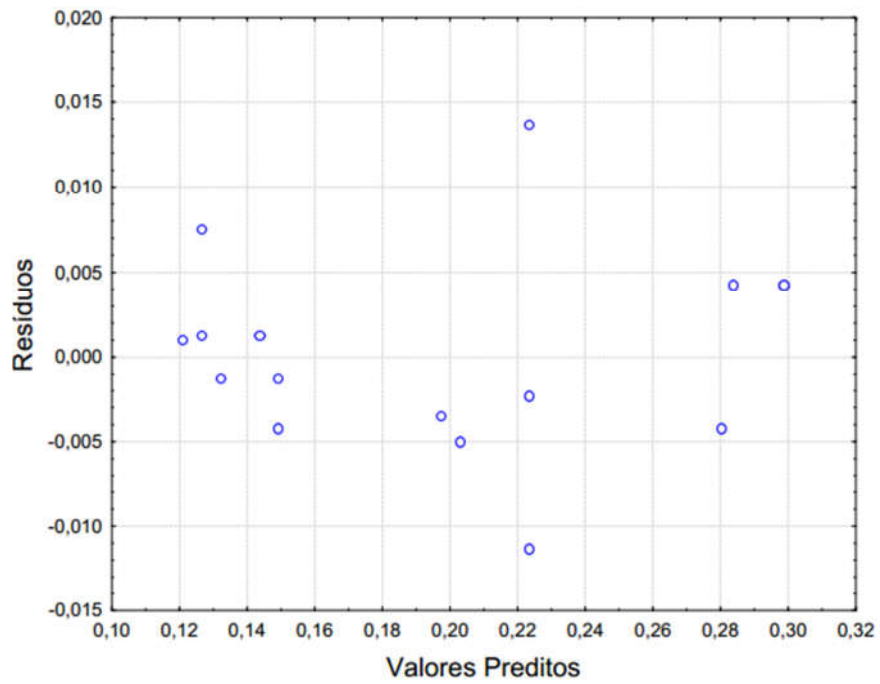


Figura 3-E: Gráfico dos resíduos versus os valores preditos pelo modelo, com base nos resultados de AE CMCase.

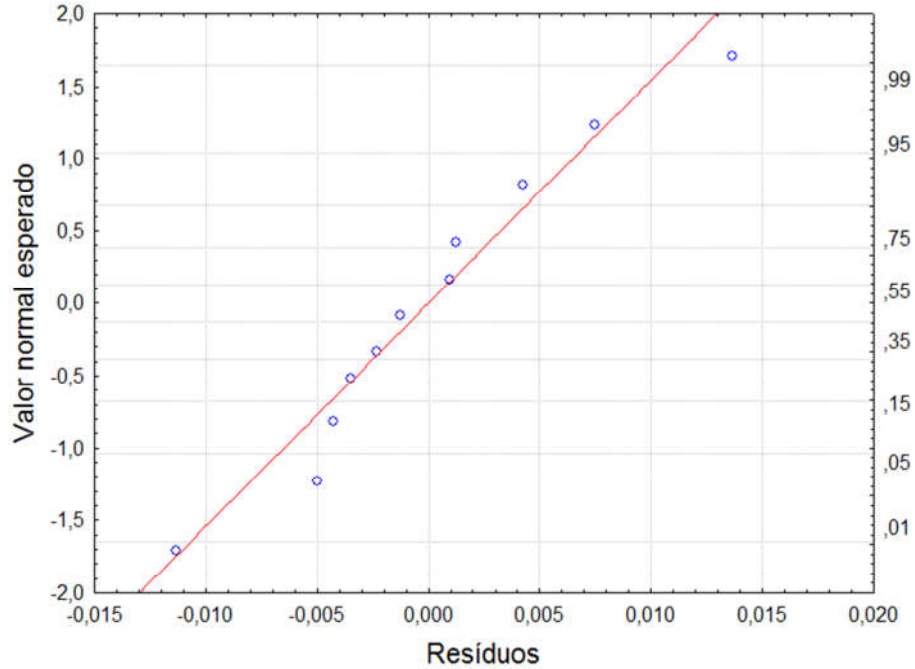


Figura 3-F: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para AE CMCase.