



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LAYANNE GUEDES SILVA DE ARAÚJO**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA DE CAJU SUBMETIDA A DIFERENTES  
PRÉ-TRATAMENTOS: RECUPERAÇÃO E REUSO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO**

**FORTALEZA**

**2018**

LAYANNE GUEDES SILVA DE ARAÚJO

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA DE CAJU SUBMETIDA A DIFERENTES PRÉ-  
TRATAMENTOS: RECUPERAÇÃO E REUSO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A69h Araujo, Layanne Guedes Silva de.  
Hidrólise enzimática da fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos: recuperação e reuso do complexo enzimático / Layanne Guedes Silva de Araújo. – 2018.  
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha.
1. Celulase. 2. Adsorção. 3. hidrólise enzimática. 4. substrato lignocelulósico. I. Título.

CDD 660

---

LAYANNE GUEDES SILVA DE ARAÚJO

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA DE CAJU SUBMETIDA A DIFERENTES PRÉ-  
TRATAMENTOS: RECUPERAÇÃO E REUSO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 06/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

---

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)

A Deus.

Aos meus pais, Francisca de Assis e Luís

Carlos pelo amor e apoio de sempre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela vida, pela oportunidade de chegar aqui e por nunca ter me desamparado.

Aos meus pais Luís Carlos e Francisca de Assis, por todo amor e compreensão, pelo apoio de sempre, por serem calmaria nos momentos de estresse e desânimo. Vocês são meu exemplo de vida. Amo vocês!

As minhas irmãs e companheiras de vida Rozeane e Leysa, por estarem comigo sempre, por todo o amor, e pela confiança que depositam em mim, por saber que posso contar com vocês sempre.

A toda minha família, obrigada pela torcida e apoio!

A Felipe, por todo carinho, amor, compreensão e paciência, por ouvir meus desabafos, por entender minha ausência e por se fazer presente em minha vida apesar das correrias diárias e dos quilômetros que nos distanciam. Você é um presente de Deus!

Aos amigos da minha cidade natal que me acompanham desde pequena e por vibrarem pelas minhas conquistas.

As minhas amigas desde o tempo de ensino médio, em especial a Monalise e Ednaja por todo o carinho e amizade, por me ouvirem e por saber que sempre que preciso posso contar com vocês. Sou grata por vocês fazerem parte da minha vida.

À Randreanne e Dayala por me acolherem aqui em Fortaleza e me ajudarem a procurar um lugar para morar. A Cassya Brenda minha companheira de apartamento, por me receber tão bem quando cheguei, por todo o respeito e compreensão, pelas conversas descontraídas e por todos os momentos compartilhados. A Clarinha uma pessoa que me passa a maior tranquilidade e confiança, meu ombro amigo desde a graduação. E a todos os amigos e as pessoas que torcem por mim.

Á professora Doutora Maria Valderéz Ponte Rocha, pela orientação, por toda paciência e dedicação nessa caminhada, por ser esse exemplo de pessoa e profissional.

Á Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves e Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues por aceitarem o convite em participarem da banca de qualificação e defesa desta dissertação para o enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos do grupo GPBio pela companhia, descontração, ensinamentos diários, em especial a Juliana por ter me ajudado antes mesmo de me conhecer, pelas idas ao Pici aos finais de semana, por ser esse ser humano incrível sempre disposta a ajudar quando necessário, falta-me palavras para agradecer, a Jouciane por me socorrer nos momentos de desespero, a Fernanda, dona do gênio mais forte que já conheci na vida, mas que me acompanha desde o início do mestrado e que quando necessário sempre me estendeu a mão, ao Gabriel pela ajuda que me foi dada. A Carlinha, Brenda, Jessyca, Marina, Renata, Ravena, Natan, Nathalia, Maysa, Rayanne, Magno, Ticiane. Ao Sr. Luis, por ser esse exemplo de humildade e generosidade e pelo excelente trabalho desempenhado no DEQ.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A todos que direta e indiretamente me ajudaram a chegar até aqui. Meu muito obrigada!

“Eu acredito que olhar para trás também é seguir em frente. É quando a gente relembra tudo que já passou para chegar até aqui, e tem a certeza de que nunca é hora de parar a caminhada”

(Braúlio Bessa).

## RESUMO

Nesse trabalho foram estudadas diferentes estratégias de reuso do complexo celulolítico durante a hidrólise enzimática da fibra de caju, visando redução dos custos do processo. Para avaliar como a composição do material interfere no processo, a fibra de caju foi pré-tratada com o ácido seguido de álcali (FC-HOH), peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) e ácido diluído (FC-H). Realizaram-se duas hidrólises enzimáticas: padrão I, quando se utilizou o complexo enzimático celulase (15 FPU/ g<sub>celulose</sub>), e padrão II, na qual, além desse complexo, foi adicionado a celobiase (60 CBU/ g<sub>celulose</sub>). O substrato com o maior rendimento foi o FC-HOH com 93% ± 3% para a hidrólise padrão I e 99% ± 1% para a hidrólise padrão II, após 72 horas. Com o material resultante, realizaram-se estratégias capazes de reutilizar a enzima ligada ao sólido residual e líquido hidrolisado, por dois ciclos sucessivos de hidrólise. Na estratégia I, variaram-se os percentuais do sólido residual (padrão I) 30, 50, 80 e 100%, que foi colocado em contato com o substrato fresco, sem adição de complexo enzimático. Os ensaios com 100% do sólido residual apresentaram os melhores rendimentos, para o FC-HOH foi obtido 32,06% ± 1,22% e recuperação de 87,3% da carga enzimática inicial (15 FPU/ g celulose), para o FC-PHA o rendimento foi 25,27% ± 0,92% e uma recuperação igual a 70,5%, usando o FC-H foram encontrados rendimentos mais baixos (16,89% ± 1,47%) e uma recuperação de 65%. Sabendo o percentual de maior recuperação enzimática, realizaram-se as estratégias III e V, usando o sólido residual (padrão II), que foi colocado em contato com o substrato fresco. Na estratégia V, houve suplementação da celulase. Para as estratégias III e V, no primeiro reuso com FC-HOH foi possível recuperar a maior quantidade de enzimas (14,89 FPU/ g<sub>celulose</sub>) e foi obtida uma economia igual a R\$ 2,140 milhões por tonelada de celulose hidrolisada, os rendimentos foram iguais a 38% ± 4% e 58% ± 1%, respectivamente. No segundo reuso, para a estratégia III, 13,02 FPU/ g celulose foi adsorvida a fibra e obteve-se um rendimento de hidrólise igual a 9,8% ± 0,5%, com uma economia de R\$ 1,871 milhões. As enzimas livres em solução (líquido hidrolisado) foram recuperadas usando as estratégias II e IV, em que o líquido hidrolisado foi colocado em contato com o substrato fresco, na estratégia IV, houve suplementação da celulase. Na estratégia II, observou-se que 83% da carga inicial se adsorveu ao FC-H, e apresentou uma economia igual a R\$ 2,027 milhões, porém com rendimento de 2,78% ± 1,08%. Dentre os substratos estudados o FC-HOH apresentou os melhores resultados e a estratégia IV se sobressaiu das demais.

**Palavras-chave:** Celulase, adsorção, hidrólise enzimática, substrato lignocelulósico.

## ABSTRACT

In this work, different strategies of reuse of the cellulolytic complex during the enzymatic hydrolysis from cashew apple fiber was studied as a strategy to reduce the costs of this process. To evaluate the effect of composition from material in the processes of reuse, cashew apple fiber was pretreated by acid followed by alkali (FC-HOH), or alkaline hydrogen peroxide (FC-PHA) or dilute acid (FC-H). Two enzymatic hydrolysis were carried out: enzymatic hydrolysis I (EH I) was performed using only the cellulase enzymatic complex (15 FPU/g<sub>cellulose</sub>) and enzymatic hydrolysis II (EH II) was conducted using the cellulase enzymatic complex (15 FPU/g<sub>cellulose</sub>) and cellobiase (60 CBU/g<sub>cellulose</sub>). The substrate FC-HOH showed the highest yields, 93% ± 3% for EH I, and 99% ± 1% for EH II. Strategies capable of reuse the enzyme bound to the residual solid and free in solution were held for two successive hydrolysis cycles. In strategy I, percentages of the residual solid obtained of EH I (30, 50, 80 and 100%) were evaluated, which it was placed in contact with the fresh substrate without addition of enzyme. The assays using 100% residual solid showed the best yields, for FC-HOH was achieved an yield of 32.06% ± 1.22% and enzymatic recovery of 87.3% of the initial enzyme charge (15 FPU/g cellulose); for FC-PHA, the yield and recovery were 25.27% ± 0.92% and 70.5%, respectively; for FC-H was obtained the lower yields (16.89% ± 1.47%) and one recovery rate of 65%. Knowing the percentage of greater enzymatic recovery, the strategies III (without supplementation of enzyme) and V (with supplementation of enzyme) were carried out using the residual solid (Enzymatic hydrolysis II), which was placed in contact with the fresh substrate. For strategies III and V, in the first reuse with FC-HOH it was possible to recover the highest amount of enzymes (14.89 FPU/g<sub>cellulose</sub>) and an economy of R\$ 2.140 million per ton of cellulose. The yields of hydrolysis were 38% ± 4% and 58% ± 1% for R1 and R2 recycles, respectively. In the second reuse, for strategy III, 13.02 FPU/ g cellulose was adsorbed to fiber and a hydrolysis yield of 9.8% ± 0.5%, achieving an economy of R\$ 1.871 million. The free enzymes in solution (hydrolyzed liquid) were recovered using strategies II and IV, in which the hydrolyzed liquid was placed in contact with the fresh substrate, in strategy IV, there was cellulase supplementation. It was observed that 83% of the initial load was adsorbed to the FC-H, and presented an economy of R\$ 2.027 million, for strategy III, but with yield equal to 2.78% ± 1.08%. Among the substrates studied the FC-HOH presented the best results and the IV strategy stood out from the others.

**Keywords:** Cellulase, adsorption, enzymatic hydrolysis, lignocellulosic substrate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura dos materiais lignocelulósicos .....	17
Figura 2	– Estrutura da celulose .....	18
Figura 3	– Caju .....	20
Figura 4	– Esquema da ação catalítica do complexo enzimático celulase .....	26
Figura 5	– Representação esquemática das possibilidades de reuso das enzimas celulolíticas após a hidrólise enzimática .....	32
Figura 6	– Diagrama esquemático da estratégia de reuso I: variação do percentual do substrato fresco e hidrolisado .....	39
Figura 7	– Diagrama esquemático das estratégias de reuso: reutilização das enzimas celulásicas (celulase e celobiase) presentes no líquido hidrolisado, sem suplementação enzimática (Estratégia II) e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual (Estratégia III) .....	40
Figura 8	– Diagrama esquemático das estratégias de reuso: reutilização das enzimas celulolíticas presentes no líquido hidrolisado, com suplementação enzimática do complexo celulase (Estratégia IV) e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual com adição do complexo celobiase e suplementação da enzima celulase (Estratégia V) .....	42
Figura 9	– Cinética de adsorção da celulase sobre o substrato lignocelulósico submetido a diferentes pré-tratamentos (FC-H, FC-HOH e FC-PHA), conduzida a 45°C e 150 rpm, com uma carga enzimática de 15 FPU/ g celulose e concentração de 1% m/v (com base no teor de celulose) em tampão citrato 50 mM a pH 4,8. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H .....	46
Figura 10	– Isotherma de adsorção da enzima celulase na fibra de caju submetida aos diferentes tipos de pré-tratamento (FC-HOH; FC-PHA; FC-H), realizada a 45°C e 150 rpm. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H .....	48
Figura 11	– Estudo cinético da adsorção do complexo enzimático celobiose na fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, conduzida a 45°C e 150 rpm,	50

com uma carga enzimática de 60 CBU/ g celulose e concentração de 1% m/v (com base no conteúdo de celulose). (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H

- Figura 12 – Perfil das concentrações de glicose e celobiose durante a hidrólise enzimática padrão I da fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, utilizando o complexo enzimático celulase (15 FPU/ g celulose) 45°C sob agitação de 150 rpm (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC- *in natura*.  
(A) Concentração de glicose; (B) Concentração de celobiose..... 51
- Figura 13 – Perfil de rendimento da hidrólise enzimática da fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, utilizando o complexo enzimático celulase (15 FPU/ g celulose). Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC- *in natura*. ..... 52
- Figura 14 – Perfil das concentrações de glicose e celobiose durante a hidrólise enzimática da fibra de caju padrão II, submetida a diferentes pré-tratamentos (FC, FC-H, FC-HOH e FC-PHA), utilizando o complexo enzimático celulase (15 FPU/ g celulose) e a celobiase (60 CBU/ g celulose) a 45°C sob agitação de 150 rpm e 72 h de hidrólise. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC- *in natura*. (A) Concentração de glicose; (B) Concentração de celobiose..... 54
- Figura 15 – Perfil de rendimento da hidrólise enzimática padrão II, dos diferentes substratos (FC, FC-H, FC-HOH e FC-PHA), utilizando o complexo enzimático Celulase (15 FPU/ g celulose) e a celobiase (60 CBU/ g celulose). Condições: 45°C, 150 rpm por 72 h. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC- *in natura*. ..... 55
- Figura 16 – Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual utilizando a fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos. Condições: 45°C, 150 rpm por 72 h. (A) FC-HOH; (B) FC-PHA; (C) FC-H. .... 58
- Figura 17 – Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com adição do substrato fresco, sem a suplementação enzimática (Estratégia II). Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H. .... 62
- Figura 18 – Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com adição do substrato fresco e suplementação enzimática da celulase (Estratégia IV). Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H. 63

- Figura 19 – Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, adicionando o substrato fresco e celobiase (60 CBU/ g celulose) (Estratégia III). Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H. .... 65
- Figura 20 – Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, utilizando suplementação da enzima celulase e adição da celobiase (60 CBU/ g celulose) (Estratégia V). Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H. .... 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de alguns materiais lignocelulósicos .....	18
Tabela 2 – Classificação dos pré-tratamentos .....	23
Tabela 3 – Modelos de Isotermas de adsorção .....	29
Tabela 4 – Tipos de estratégias utilizadas para reutilização da enzima celulase .....	31
Tabela 5 – Reutilização das enzimas celulolíticas presentes no sólido residual e líquido hidrolisado, resultantes da hidrólise padrão II, estratégias II, III, IV e V. Condições: 45°C, 150 rpm e 72 h. ....	43
Tabela 6 – Composição centesimal da fibra de caju <i>in natura</i> e após diferentes pré-tratamentos. ....	44
Tabela 7 – Caracterização dos complexos enzimáticos utilizados para hidrólise enzimática. ....	45
Tabela 8 – Parâmetros do modelo de Langmuir para as isotermas de adsorção da celulase nos substratos lignocelulósicos avaliados. ....	48
Tabela 9 – Carga enzimática retida no sólido após a hidrólise padrão I e volume de enzima economizado para o primeiro reuso enzimático. ....	57
Tabela 10 – Enzimas retidas ao sólido residual e livres em solução após a hidrólise padrão II e valores economizados para cada tonelada de celulose hidrolisada, referente ao primeiro reuso enzimático das estratégias II, III, IV e V. ....	61
Tabela 11 – Cargas enzimáticas utilizadas para o segundo reuso e valores economizados no reuso enzimático realizados na estratégia III .....	65
Tabela 12 – Quantidades de celulose, hemicelulose e lignina obtidos no reuso do substrato hidrolisado com adição da celobiase (Estratégia III). ....	66
Tabela 13 – Quantidade de celulose, hemicelulose e lignina obtidos no reuso do substrato hidrolisado com suplementação da celulase e adição da celobiase (Estratégia V). ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FC	Fibra de caju
FC-H	Fibra de caju pré-tratada com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
FC-HOH	Fibra de caju pré-tratada com ácido seguido de álcali
FC-PHA	Fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino
SF	Substrato fresco
FPU/mL	Atividade enzimática expressa em unidades de papel de filtro por mL de enzima
UCB/mL	Atividade enzimática expressa em unidades de celobiose por mL de enzima
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Materiais lignocelulósicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1</b>	<i>Celulose.....</i>	<i>18</i>
<b>2.1.2</b>	<i>Hemicelulose.....</i>	<i>19</i>
<b>2.1.3</b>	<i>Lignina .....</i>	<i>19</i>
<b>2.2</b>	<b>A cultura do caju .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Estudos visando o aproveitamento da fibra de caju.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Pré – tratamento .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1</b>	<i>Pré – tratamento ácido .....</i>	<i>23</i>
<b>2.4.2</b>	<i>Pré – tratamento ácido seguido de álcali.....</i>	<i>24</i>
<b>2.4.3</b>	<i>Pré – tratamento com peróxido de hidrogênio Alcalino .....</i>	<i>25</i>
<b>2.5</b>	<b>Hidrólise enzimática .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1</b>	<i>Reuso enzimático .....</i>	<i>28</i>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1</b>	<i>Substrato lignocelulósico .....</i>	<i>33</i>
<b>3.1.2</b>	<i>Enzimas .....</i>	<i>33</i>
<b>3.2</b>	<b>Pré - tratamentos do material lignocelulósico.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Pré – tratamento ácido diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) .....</i>	<i>33</i>
<b>3.2.2</b>	<i>Pré – tratamento ácido seguido de álcali.....</i>	<i>34</i>
<b>3.2.3</b>	<i>Pré – tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino .....</i>	<i>34</i>
<b>3.3</b>	<b>Determinação da concentração de proteínas e da atividade enzimática nos complexos enzimáticos .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Atividade da celulase .....</i>	<i>35</i>
<b>3.3.2</b>	<i>Atividade de celobiase no complexo de celobiasas NS 50010. ....</i>	<i>35</i>
<b>3.4</b>	<b>Hidrólise enzimática .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.1</b>	<i>Hidrólise enzimática padrão I e II.....</i>	<i>36</i>
<b>3.5</b>	<b>Adsorção da enzima na biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.1</b>	<i>Cinética de Adsorção da celulase .....</i>	<i>37</i>
<b>3.5.2</b>	<i>Isoterma de Adsorção da celulase .....</i>	<i>37</i>
<b>3.5.3</b>	<i>Estudo da cinética de adsorção da enzima celobiase (NS 50010) .....</i>	<i>38</i>
<b>3.6</b>	<b>Diferentes estratégias de recuperação e reuso enzimático .....</b>	<b>38</b>

3.6.1	<i>Recuperação e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, variando-se o sólido residual, sem suplementação enzimática (Estratégia I)</i> .....	38
3.6.2	<i>Reuso das enzimas celulásicas (celulase e celobiase) presentes no líquido hidrolisado, sem suplementação enzimática (Estratégia II)</i> .....	39
3.6.3	<i>Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, com adição do substrato fresco e da enzima celobiase (Estratégia III)</i> .....	40
3.6.4	<i>Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com suplementação da celulase (Estratégia IV)</i> .....	41
3.6.5	<i>Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, utilizando suplementação da enzima celulase e adição da celobiase (Estratégia V)</i> .....	41
3.7	<b>Métodos analíticos</b> .....	43
3.7.1	<i>Determinação dos açúcares</i> .....	43
3.7.2	<i>Determinação do teor de proteínas</i> .....	43
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	44
4.1	<b>Composição química dos substratos utilizados</b> .....	44
4.2	<b>Caracterização dos complexos enzimáticos</b> .....	45
4.3	<b>Estudo de adsorção das enzimas celulase e celobiase na fibra de caju <i>in natura</i> e pré-tratada</b> .....	45
4.3.1	<i>Cinéticas de Adsorção do complexo enzimático celulase</i> .....	45
4.3.2	<i>Isoterma de Adsorção da celulase</i> .....	47
4.3.3	<i>Estudo da cinética de adsorção da enzima celobiase (NS 50010)</i> .....	49
4.4	<b>Hidrólises Enzimáticas (Hidrólise padrão I e II)</b> .....	50
4.5	<b>Estratégias de Reuso Enzimático</b> .....	56
4.5.1	<b>Reuso da celulase adsorvida ao sólido de hidrólise, variando-se a quantidade do sólido residual.</b> .....	56
4.5.2	<i>Diferentes estratégias de recuperação e reuso enzimático (II, III, IV e V)</i> .....	60
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma planta oriunda do Nordeste Brasileiro, e possui em sua estrutura o caju, que é composto por um fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo), essa árvore possui uma grande capacidade adaptativa a solos de pouca fertilidade, a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico. Por possuir essas características, o cajueiro se tornou uma importante fonte de renda para os estados nordestinos. No estado do Ceará em 2016 houve uma área de castanha *in natura* colhida igual a 376 mil hectares. Nos últimos anos, o estado do Ceará foi responsável por aproximadamente 50% da produção total de castanha de caju no Brasil, sendo seguido pelos estados do Rio Grande do Norte (22%) e Piauí (18%). (CONAB, 2017; EMBRAPA 2016).

O produto principal da castanha é a amêndoa que se localiza em seu interior, já o pseudofruto (pedúnculo do caju) é processado por indústrias ou pequenas fabricas para a obtenção do suco ou da polpa congelada. Esse processamento para produção de bebidas resulta em torno de 15% (m/m) da fibra, sendo um subproduto de baixo valor agregado e uma das principais fontes de resíduos deste setor (EMBRAPA, 2016; IBGE, 2017). Por outro lado, alguns estudos tem mostrado que a fibra de caju é considerada um material lignocelulósico de elevado potencial, por ser rico em açúcares, fibras, proteínas e lipídeos, cujo aproveitamento permite a obtenção de produtos de alto valor agregado, alimentos e biocombustíveis, ampliando as oportunidades do uso do rejeito (CORREIA *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas), hemicelulose e lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também das condições de crescimento (OGEDA e PETRI, 2010; CORREIA *et al.*, 2013).

A fibra de caju vem sendo estudada no Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio – UFC) como matéria – prima alternativa e de baixo custo para produção de bioetanol de segunda geração (ROCHA, *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011; CORREIA. *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017), produção de xilitol (ALBUQUERQUE, 2014), na imobilização de enzimas (SOUZA *et al.*, 2016) e na produção de enzimas (FREITAS, 2017).

Para produção de etanol e bioprodutos (como o xilitol) é necessária a transformação da celulose e hemicelulose em seus monômeros, glicose e xilose, respectivamente, e após sua conversão no produto de interesse. O processo de bioconversão consiste em várias etapas: pré-

tratamento, que aumenta a acessibilidade da enzima aos materiais lignocelulósicos, seguida por hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos e a conversão dos açúcares para bioetanol ou bioprodutos por via microbiana ou hidrólise enzimática (BARROS *et al.*, 2017). No entanto, ainda há um entrave para comercialização desses bioprodutos, devido aos custos gerados pelas enzimas celulásicas (CASTRO, 2010; PIHLAJANIEMI *et al.*, 2014).

O custo elevado das enzimas celulásicas necessárias para hidrólise dos materiais lignocelulósicos são fatores que impactam de maneira negativa a comercialização de bioprodutos a partir da biomassa celulósica. Com o objetivo de reduzir esses custos, algumas estratégias estão sendo estudadas como, por exemplo, maximizar a produção pela melhora no desempenho da enzima, recuperação e o reuso enzimático, aproveitando sua estabilidade relativamente alta e sua afinidade pela celulose, durante o processo de hidrólise (TU *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2011; PIHLAJANIEMI *et al.*, 2014).

As celulasas geralmente se adsorvem sobre o substrato sólido por ligação à celulose e a lignina. As enzimas adsorvidas em celulose são desorvidas principalmente após a hidrólise, já a ligação com a lignina é menos reversível. Essas enzimas retidas no substrato sólido podem ser reaproveitadas com o simples contato do resíduo sólido hidrolisado com o resíduo fresco (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2014).

Existem diversos estudos sobre estratégias de reuso enzimático da celulase, utilizando diferentes materiais lignocelulósicos com o objetivo de diminuir os custos do processo de hidrólise, como GOMES *et al.*, (2016) que reutilizaram as enzimas celulasas adsorvidas ao sólido na hidrólise do lodo de papel reciclado, utilizando um processo de eluição alcalina, foi realizado quatro ciclos sucessivos. De acordo com os resultados apresentados, as enzimas recuperadas apresentaram uma ótima estabilidade e foram obtidas conversões maiores que 70% para as três rodadas de reuso. Outra estratégia utilizada para recuperação da enzima celulase é a eletroultrafiltração, um processo de ultrafiltração aprimorado por campo elétrico que foi estudado por (CHEN *et al.*, 2013), utilizando a palha de trigo pré-tratada com ácido. Os resultados mostraram que, sob condições operacionais adequadas, a eletroultrafiltração pode efetivamente reutilizar a celulase do hidrolisado lignocelulósico, e assim reduzir substancialmente o custo da hidrólise. No entanto, ainda não existe na literatura, um estudo do reuso da celulase durante a hidrólise enzimática da fibra de caju.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o reuso da celulase durante a hidrólise enzimática da fibra de caju, visando encontrar uma possível solução para reduzir os altos custos gerados pelas enzimas no processo de bioconversão dessa matéria – prima em açúcares fermentáveis. Para verificar como a composição pode influenciar na reutilização deste

complexo celulolítico e no rendimento de hidrólise, a fibra de caju foi submetida a três tipos de pré-tratamento: o ácido diluído (FC-H), ácido seguido de álcali (FC-HOH) e peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA).

Para cumprir o objetivo geral, foram listados os seguintes objetivos específicos:

- Estudo de adsorção dos complexos celulolíticos: celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 e celobiase (NS 50010) nos sólidos oriundos dos diferentes pré-tratamentos;
- Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado em condições pré-definidas;
- Desenvolver estratégias de reutilização das enzimas celulolíticas presentes na fase líquida e na fase sólida durante o processo de hidrólise;

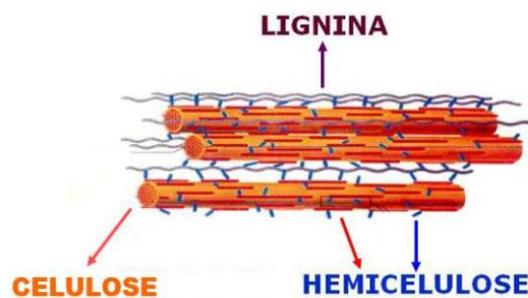
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Materiais lignocelulósicos

A biomassa vegetal compreende todos os materiais orgânicos, não fósseis, que tenham conteúdo de energia química em seu interior, abrangendo todas as vegetações aquáticas e terrestres, árvores, resíduos agrícolas e agroindustriais (OMACHI *et al.*, 2004).

Em geral, a biomassa celulósica possui em sua composição cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 – glicosídicas) associadas entre si por ligações de hidrogênio. Essas fibras celulósicas são cobertas por hemicelulose (polissacarídeos ramificados compostos principalmente por D-xilose com poucas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano ligadas entre si) (OGEDA, 2011;CORREIA *et al.*, 2013). Estes componentes são fortemente intercalados e ligados através de ligações covalentes ou não covalentes que formam a matriz lignocelulósica (SUN *et al.*, 2016). A Figura 1 ilustra a parede celular vegetal, que é coberta por lignina e hemicelulose que são responsáveis por proteger a celulose contra a deterioração por agentes externos.

Figura 1- Estrutura dos materiais lignocelulósicos



Fonte: Aguiar (2010)

Os materiais lignocelulósicos caracterizam uma matéria-prima renovável promissora para a produção de açúcares fermentescíveis, biocombustíveis e bioprodutos. No Brasil existem diversos materiais lignocelulósicos disponíveis, isso ocorre devido à grande diversidade de plantios no país (REIS *et al.*, 2017). A Tabela 1 exemplifica alguns materiais lignocelulósicos e sua composição, podendo ser observado que há diferença na composição, que pode variar de acordo com a natureza genética de cada material e das influências ambientais e suas interações (SERPA, 2016).

Tabela 1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

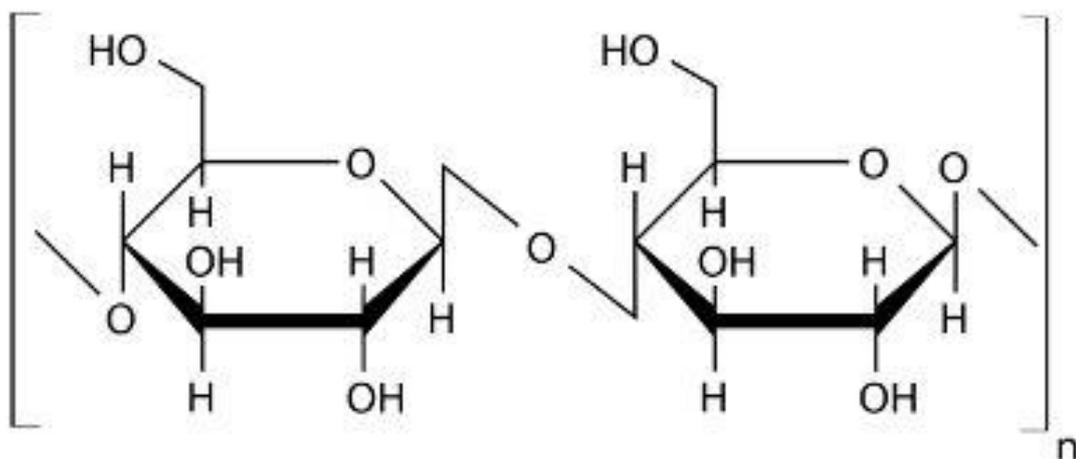
<b>Materiais lignocelulósicos</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Autores</b>
Palha de trigo	32,60	24,70	20,60	GOVUMONI <i>et al.</i> , 2013
Bagaço da cana	45,50	17,0	21,10	ROCHA <i>et al.</i> , 2011
Fibra de caju	18,16	12,83	43,28	BARROS <i>et al.</i> , 2017
Palha de milho	27,60	18,20	17,60	LIU e CHEN, 2017
Casca de arroz	35,60	11,90	15,40	SAHA e COTTA, 2007
Bagaço do tomate	39,00	5,00	11,00	PAUL e DUTTA, 2018

Fonte: elaborada pelo autor

### 2.1.1 Celulose

A celulose é um polímero que possui ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas entre unidades D-glicopirranose. É o principal componente da parede celular da fibra vegetal. Sua estrutura está ilustrada na Figura 2 (OGEDA e PETRI, 2010; COCINERO *et al.*, 2009). A configuração das ligações glicosídicas formadas entre moléculas de glicose, favorece a formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e como consequência as cadeias celulósicas se agregam conferindo elevado grau de cristalinidade a molécula, o que explica sua insolubilidade em grande número de solventes e sua resistência a degradação microbiana (CANILHA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura da celulose.



Fonte: Dreamstime (2017)

A obtenção de glicose por meio da celulose pode ocorrer por via ácida ou por via enzimática. A hidrólise ácida, gera um ambiente corrosivo que demanda o uso de materiais de construção caros (OGEDA e PETRI, 2010), além disso, durante a hidrólise ácida ocorre a geração de produtos que são considerados tóxicos para o crescimento microbiano, como o ácido acético e fórmico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Já a hidrólise enzimática ocorre normalmente em condições suaves (pH 4,8 e temperatura entre 45 e 50°C) e é isenta do problema de corrosão. No caso da hidrólise enzimática, a celulose é degradada por enzimas celulasas altamente específicas e os produtos da hidrólise são normalmente açúcares, incluindo glicose e celobiose (BEGUIN, 1994; CASTRO, 2010; ).

### ***2.1.2 Hemicelulose***

As hemiceluloses, também conhecidas como polioses, atuam como um elo químico entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, composta principalmente por blocos de construção de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila. Características essas que resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (CASTRO, 2010). Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular e não contém regiões cristalinas sendo, portanto, mais facilmente hidrolisada em açúcares fermentescíveis (LIU *et al.*, 2013).

### ***2.1.3 Lignina***

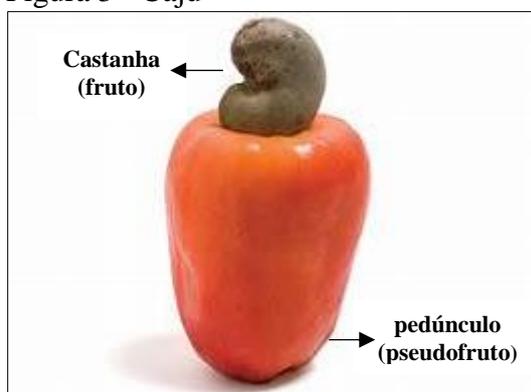
A lignina é um polímero fenólico, uma macromolécula tridimensional amorfa associada a celulose na parede celular, cuja função é conceder rigidez, resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais e também impermeabilidade (FERREIRA *et al.*, 2009; AZADFAR, 2015). É um polímero bastante abundante, possui uma estrutura tridimensional sendo constituída de três grupos fenol que integra: p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (FENGEL, 1989). Este polímero é altamente resistente à hidrólise enzimática, química e microbiana por possuir extensas ligações cruzadas.

## 2.2 A cultura do caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta oriunda do Nordeste Brasileiro, com grande capacidade adaptativa a solos de pouca fertilidade, a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico, possui em sua estrutura o caju, que é constituído da castanha (fruto) e do pedúnculo (pseudofruto), como pode ser observado na Figura 3 (EMBRAPA, 2016).

Segundo dados estatísticos de FAOSTAT (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), o caju é cultivado atualmente em 27 países, sendo o Brasil o quinto principal produtor mundial. A produção de caju no Brasil é representada por 94% na Região Nordeste, sendo o estado do Ceará o maior produtor do país. A aquisição da castanha de caju *in natura* pelos torradores, e a redução da oferta devido a redução da produtividade nos municípios produtores, promoveu uma elevação nos preços recebidos pelos produtores, chegando a ser comercializada no final de julho de 2017 ao preço de R\$ 8,00/Kg. O Ceará apresentou regularidade no volume e no valor das exportações durante os meses de julho de 2016 a julho 2017 girando em torno de 8 milhões de dólares (CONAB, 2017).

Figura 3 - Caju



Fonte: Embrapa (2017)

O principal produto gerado é a amêndoa da castanha do caju, retirada do processamento da castanha, de onde também é extraída a película que reveste a amêndoa, rica em tanino e utilizada na indústria química de tintas e vernizes. Ainda da casca da castanha é obtido o líquido da castanha do caju usado na indústria química e de lubrificantes, curtidores, aditivos, entre outros, sendo o resíduo da casca utilizado como fonte de energia nas indústrias, por meio de sua queima em fornalhas. O pedúnculo, por sua vez, possibilita a produção de bebidas, como suco, doces, ração animal e outros produtos. No entanto, estima-se que mais de 90% dos pedúnculos são desperdiçados, ou seja, é um subproduto pouco aproveitado (CONAB, 2017; CORREIA, 2017).

A fibra de caju é considerada um material lignocelulósico de elevado potencial, por ser rico em açúcares, fibras, proteínas e lipídeos, cujo aproveitamento permite a obtenção de produtos de alto valor agregado, alimentos e biocombustíveis, ampliando as oportunidades do uso do rejeito (CORREIA *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Há um leque de aplicações da fibra de caju para obtenção de bioprodutos a partir desse material lignocelulósico. No entanto, os custos gerados para obtenção das enzimas celulolíticas que participam de uma etapa necessária (hidrólise enzimática) para obtenção dos açúcares fermentáveis é alta, o que impede a comercialização em grande escala desses produtos.

### 2.3 Estudos visando o aproveitamento da fibra de caju

A utilização de materiais lignocelulósicos para a produção de bioprodutos de alto valor é promissora, pois estas representam uma fonte abundante e renovável de fontes de carbono. Materiais lignocelulósicos como sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de cana, bagaço de caju, pó de madeira, casca de aveia, dentre outros, representam uma importante e barata fonte de matéria-prima. A fibra de caju é um material lignocelulósico que vem sendo fonte de estudo há algum tempo pelo Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Bioprocessos – GPBio (DEQ – UFC) motivados pelo excelente papel da agroindústria do caju na região Nordeste do Brasil.

ROCHA *et al.*, (2009) fizeram um estudo da produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando fibra de caju pré-tratada com ácido diluído e ácido seguido de álcali da fibra de caju. Os autores demonstraram que o hidrolisado enzimático da fibra de caju pré-tratada com ácido seguido de alcali é um processo alternativo para produção de etanol por fermentação. BARROS *et al.*, (2017) estudaram a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e fermentação com pré-sacarificação simultânea (PSSF) para produção de bioetanol a partir da fibra de caju também pré-tratada por ácido seguido de álcali, utilizando *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

Outros pré-tratamentos também foram realizados utilizando a fibra de caju, como é o caso de CORREIA *et al.*, (2013) que estudaram o pré-tratamento utilizando o peróxido de hidrogênio alcalino, e em seguida realizaram a hidrólise enzimática, que se mostrou favorável para produção do etanol. Diante disso, CORREIA *et al.*, (2015) analisaram os processos separados de hidrólise e fermentação (SHF) e de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, usando *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Além disso, a fibra de caju submetida a esse mesmo pré-tratamento foi usada como suporte para imobilização da lipase B de *Candida*

*antartica*. Os resultados sugeriram que o suporte pode ser uma excelente alternativa para imobilização e estabilização da lipase (SOUZA *et al.*, 2016).

A fibra de caju foi submetida ao pré-tratamento utilizando o ácido sulfúrico diluído, e a fase líquida (hidrolisado) foi usada como matéria-prima para obtenção de xilitol, um poliol com elevada empregabilidade na indústria alimentícia e farmacêutica. Segundo ALBUQUERQUE *et al.*, (2015) o hidrolisado hemicelulósico pode ser considerado um potencial meio de cultivo para produção biotecnológica de xilitol. Outros autores (REIS *et al.*, 2017) estudaram a hidrólise enzimática da fibra de caju, após o pré-tratamento com líquidos iônicos com a finalidade de obter carboidratos.

## **2.4 Pré – tratamento**

Para conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis, é necessária a modificação das propriedades da parede celular, que consiste na etapa de pré-tratamento. Esse procedimento torna a celulose mais acessível as enzimas celulolíticas (COSTA, 2017; CORREIA *et al.*, 2018). O principal objetivo do pré- tratamento da biomassa lignocelulósica é a diminuição da cristalinidade da celulose e solubilização das estruturas recalcitrantes (lignina e hemicelulose) da parede do vegetal (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Geralmente, o pré- tratamento é classificado de acordo com o efeito sobre a matéria – prima, são classificados em físicos, químicos, físico – químicos e biológico. Cada classe de pré-tratamento apresenta particularidades para aplicação em larga escala. Os físicos, por mais simples que sejam, apresentam elevado custo energético. Os pré-tratamentos físico-químicos são eficientes, porém a produção de inibidores é elevada, o que também ocorre com os pré-tratamentos químicos. Os biológicos são irrelevantes para aplicação comercial devido ao alto tempo do processo (RODRIGUES, 2010). Na Tabela 2 pode ser observado a classificação dos pré-tratamentos e alguns exemplos de pré-tratamentos que foram estudados e que utilizaram diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.

Tabela 2 - Classificação dos pré-tratamentos.

<i>Matéria-prima</i>	<i>Classificação</i>	<i>Pré-tratamento</i>	<i>Referências</i>
Fibra de caju	Físicos	Micro-ondas	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2011
Microalgas	Químicos	Alcalino	HARUN <i>et al.</i> , 2011
Capim elefante	Químico	Ácido	SANTOS <i>et al.</i> , 2018
Palha de trigo	Físico-Químicos	Explosão a vapor	DESHPANDE e ERIKSSON, 1984

Fonte: elaborada pelo autor

No presente estudo, utilizando a fibra de caju, selecionou-se três diferentes pré-tratamentos: ácido diluído, ácido seguido de álcali, e peróxido de hidrogênio alcalino que foram selecionados devido à variação no teor de celulose, hemicelulose e lignina presente na fibra de caju após o pré-tratamento, para avaliar a influência da composição do material no processo de hidrólise enzimática. Esses pré – tratamentos foram estudados pelo grupo de pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio), o pré-tratamento com ácido diluído (ALBUQUERQUE, *et al.*, 2015), pré – tratamento ácido seguido de álcali (BARROS, *et al.*, 2017; ROCHA, *et al.*, 2009) e o pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio alcalino (CORREIA, *et al.*, 2013).

#### **2.4.1 Pré – tratamento ácido**

Nos pré-tratamentos ácidos ocorre a solubilização da hemicelulose na biomassa e modificações na estrutura da lignina, tornando a celulose mais acessível a hidrólise enzimática, resultando na liberação de parte da glicose presente na cadeia de celulose. Essa forma de pré-tratamento pode ser realizada com ácido concentrado ou diluído, porém, o uso do ácido concentrado não é tão atrativo para obtenção de produtos a partir dos bioprocessos, pois formam compostos inibidores aos catalisadores biológicos. Além disso, os altos custos operacionais e de manutenção reduzem o interesse na aplicação do pré-tratamento utilizando o ácido concentrado (ALVIRA *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Portanto, o uso do ácido diluído acaba sendo uma alternativa melhor. Os ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

Quando o pré-tratamento com ácido diluído é utilizado, as frações de celulose e lignina podem permanecer praticamente inalteradas na fase sólida. Conforme as condições

operacionais, na fase líquida são formados monossacarídeos (xilose, glicose e arabinose), produtos de degradação das hemiceluloses (formação de ácido acético a partir da hidrólise de grupos acetil) e/ou o produtos de decomposição dos monossacarídeos (tais como o furfural, produto da degradação das pentoses, e 5-hidroximetilfurfural, produto da degradação das hexoses) (RODRIGUES, 2014).

Após o processo de hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica, é liberado açúcares como a xilose, glicose, manose, galactose, arabinose, entre outros. A D-xilose é um açúcar bastante abundante na natureza, e após o processo fermentativo produz um poliol com ampla aplicação nas indústrias alimentares e farmacêuticas, o xilitol. ALBUQUERQUE *et al.*, (2015) e SERPA, (2016) realizaram esse estudo utilizando diferentes micro-organismos.

#### ***2.4.2 Pré – tratamento ácido seguido de álcali***

Durante a realização dos pré-tratamentos ácidos ocorre a solubilização da hemicelulose na biomassa e modificações na estrutura da lignina, tornando a celulose mais acessível a hidrólise enzimática, resultando na liberação de parte da glicose presente na cadeia de celulose (ALVIRA *et al.*, 2010). Já no pré-tratamento alcalino, um dos principais efeitos é a ruptura da ligação intermolecular de hidrogênio entre xilano e outros componentes da biomassa, como por exemplo a lignina ou outra cadeia de hemicelulósicos, causando uma maior porosidade dos materiais lignocelulósicos. Além do mais, a utilização do álcali em solução geralmente promove uma expansão da parede celular do material, gerando um aumento da área superficial da matriz lignocelulósica, favorecendo a ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática (HAQUE *et al.*, 2013).

Com o intuito de explorar as vantagens e fugir das desvantagens dos métodos tradicionais de pré-tratamento de etapa única, vários esquemas de pré-tratamento de duas etapas constituídos de pré-tratamento ácido diluído e pré-tratamento alcalino foram estudados (BARROS *et al.*, 2017). Segundo ZHANG *et al.*, (2010) a combinação do pré-tratamento ácido seguido de álcali é eficaz para remoção de hemicelulose e lignina, o que resulta em altos teores de celulose no substrato lignocelulósico.

Esse tipo de pré-tratamento sequencial consegue recuperar a xilose, mantendo ainda uma digestibilidade enzimática alta o suficiente para o resíduo de biomassa pré-tratado (BARROS *et al.*, 2017).

O pré-tratamento com ácido seguido de álcali, têm sido utilizado em estudos reportados na literatura no tratamento da fibra de caju (ROCHA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2017), de microalga (HARUN *et al.*, 2011) e espiga de milho (ZHANG *et al.*, 2010).

#### **2.4.3 Pré – tratamento com peróxido de hidrogênio Alcalino**

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino tem como objetivo a solubilização da lignina através de ação de radicais oriundos da dissociação do peróxido de hidrogênio (CORREIA *et al.*, 2013).

Quando adicionado a base hidróxido de sódio ao peróxido de hidrogênio a solução se torna um agente efetivo na deslignificação. Isso ocorre devido a formação do ânion hidroperóxido (HOO<sup>-</sup>), formado em pH alcalino, que se mostra como a principal espécie ativa no peróxido. Em oposição, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe em radicais hidroxil (-OH) e superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Estes são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos, rompendo algumas ligações e, ocasionalmente, levando a dissolução da lignina (SUN, J. X. *et al.*, 2004; CORREIA *et al.*, 2013).

O peróxido de hidrogênio alcalino tem sido estudado por alguns autores para o pré-tratamento de diferentes materiais lignocelulósicos (CORREIA *et al.*, 2013; KARAGÖZ *et al.*, 2012; SAHA e COTTA, 2007; SELIG *et al.*, 2009). De acordo com os autores, o pré-tratamento alcalino é capaz de tornar mais eficiente a hidrólise enzimática da celulose, pois as bases são eficazes na solubilização da lignina, mantendo as cadeias de celulose e hemicelulose quase intactas comparando-se aos pré-tratamentos com ácidos ou hidrotérmicos.

### **2.5 Hidrólise enzimática**

Terminada a etapa de pré-tratamento, o material é submetido a hidrólise enzimática, para que ocorra a disponibilização da glicose existente (ALVIRA *et al.*, 2010). A hidrólise de materiais lignocelulósicos pode sofrer influência não apenas pela eficácia das enzimas, como também pelas características físicas, químicas e morfológicas dos materiais lignocelulósicos (SUN *et al.*, 2016). A hidrólise enzimática da celulose é o resultado da ação sinérgica de múltiplos componentes enzimáticos com diferentes mecanismos de ação, sendo normalmente realizada em condições suaves (temperatura entre 45 e 50°C) (SUN, 2002 ; SHASTRI, 2016).

As enzimas são catalisadores que possuem eficiência catalítica e especificidade, que possibilita a diferenciação entre as reações e os substratos. Além disso, fornecem processos

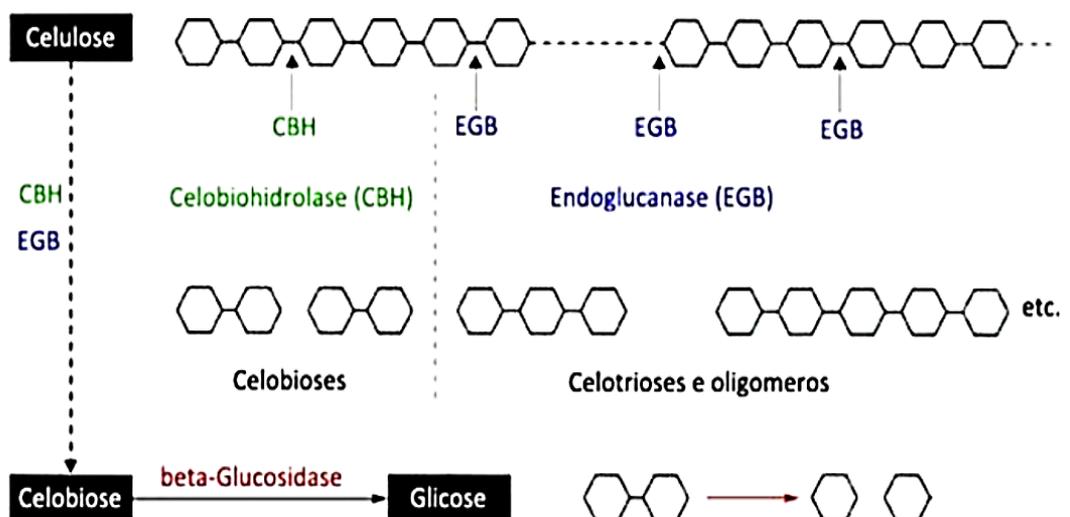
muito mais competitivos quando comparados com catalisadores não biológicos (SANTOS, 2015; MADHU; CHAKRABORTY, 2017; MADHAVAN *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2015).

Diversas substâncias são produzidas a partir do uso de enzimas e biocatálise de células, tecnologia essa comprovada em indústrias químicas e farmacêuticas. Os processos baseados em enzimas geralmente ocasionam uma diminuição no tempo de processo, número de etapas de reação e quantidade de resíduos (CHOI *et al.*, 2015). As enzimas em sua grande maioria são obtidas a partir de vegetais, animais ou micro-organismos (CARNEIRO, 2003).

As celulases, enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas em cadeias celulolíticas, biocatalisadores específicos que atuam em união para formação de açúcares, dentre os quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial. São enzimas que constituem um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise.

Estas enzimas hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4-d-glicosídicas na estrutura de celulose para liberar glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. É um complexo enzimático bastante amplo, incluindo endo-glucanases (EGB; EC 3.2.1.4) que quebra as cadeias de celulose em posições aleatórias dentro das próprias cadeias; celobiohidrolases (CBH; EC 3.2.1.91) que deterioram eficazmente as regiões cristalinas e  $\beta$ -glucosidases (BGL; EC 3.2.1.21) que faz a conversão da celobiose em glicose, diminuindo a ação inibitória desempenhada pela celobiose (SRIVASTAVA *et al.*, 2017; OGEDA, 2011). A Figura 4 mostra esquematicamente o que foi mencionado acima.

Figura 4 –Esquema da ação catalítica do complexo enzimático celulase.



Fonte: Ogeda (2011).

Existem duas estratégias principais para produção de celulasas por micro-organismos, são elas: Fermentação no Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FS). A diferença mais significativa existente entre elas é o teor de água presente no meio reacional. Na FES praticamente ocorre ausência ou quase ausência de água livre (CASTRO, 2010).

As celulasas são responsáveis por cerca de 20% do mercado global de enzimas em todo o mundo (SRIVASTAVA *et al.*, 2017). A produção dessas enzimas em escala industrial iniciou-se na década de 80, tendo em vista sua aplicação como um aditivo para ração animal, de maneira a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes. Posteriormente foram aplicadas como insumo para a indústria de alimentos, com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais das massas. Ainda nesse setor, as celulasas começaram a atuar também no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos. As celulasas começaram a ser usadas em grande escala nas seguintes indústrias: têxtil, processos de biopolimento, bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para modificar de forma controlada as propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras; usada também em lavanderias, de maneira a aumentar o brilho, remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos (CASTRO, 2010).

Outra aplicação do complexo enzimático celulase que vem ganhando bastante espaço é hidrólise da biomassa. As matérias – primas de origem celulósicas que possuem em torno de 20 a 60% de celulose e podem ser totalmente convertida em glicose (CASTRO, 2010). Porém os altos valores de produção são um entrave à sua ampla utilização industrial (CUNHA *et al.*, 2012). Por esse motivo, celulasas microbianas tem sido amplamente estudadas a fim de desenvolver novos bioprocessos mais econômicos para produção de enzimas celulolíticas, bem como buscar enzimas com maior potencial que as utilizadas atualmente (CUNHA *et al.*, 2012; SINGHANIA, 2011; SINGHVI *et al.*, 2011).

Vendo o importante papel desempenhado pelas enzimas na conversão de lignoceluloses, a integração do processo de hidrólise e fermentação tem forte dependência destes catalisadores biológicos. Portanto, deve existir um controle entre a carga enzimática utilizada, custo da enzima e eficiência do processo de conversão. É importante também levar em consideração outros parâmetros necessários para hidrólise, além da atividade enzimática, como concentração de sólidos, agitação, temperatura e tempo de hidrólise (RODRIGUES, 2014).

Ao utilizar substratos lignocelulósicos que são insolúveis no meio reacional, durante a hidrólise enzimática a agitação pode influenciar na ação das enzimas, reduzindo as limitações de transferência de massa (RODRIGUES *et al.*, 2011). No entanto, alguns autores observaram

que agitações muito altas resultam numa diminuição da taxa de hidrólise, atribuído ao decréscimo da atividade enzimática (TENGBORG *et al.*, 2001).

Além disso, o uso de elevadas concentrações de substrato pode influenciar na eficiência da hidrólise. Um dos principais desafios para a hidrólise enzimática com alta carga de sólidos, é a limitação de transferência de massa, devido as baixas quantidades de líquido no meio reacional, reduzindo a capacidade de mistura e a mobilidade das enzimas (MODENBACH e NOKES, 2013). A temperatura também é um parâmetro importante no processo de hidrólise enzimática, temperaturas entre 45-50 °C favorece a ação das enzimas (ROCHA *et al.*, 2009), porém temperaturas maiores que essas podem ocasionar uma diminuição da atividade enzimática ou até desnaturação das enzimas celulósicas.

As enzimas, na etapa de hidrólise enzimática representam uma das maiores despesas, em média 50% do custo do processo de hidrólise, por isso, há uma necessidade relevante de reutilização (RODRIGUES *et al.*, 2012), e de melhorias no processo de hidrólise.

Muitos trabalhos de pesquisa tem sido destinado a maximizar a produção, melhorar o desempenho da enzima e a eficiência de sacarificação enzimática de lignocelulósicos para produzir carboidratos fermentáveis (TU *et al.*, 2007), com o objetivo de diminuir os custos gerados na etapa de hidrólise enzimática. Outra estratégia, seria recuperar e reutilizar as enzimas ligadas ao substrato residual, bem como as enzimas presente na suspensão da reação.

### **2.5.1 Reuso enzimático**

Pesquisas e aplicações referentes ao tema da reutilização enzimática da celulase vem sendo conduzidas. O grande interesse no reuso desse material é tentar diminuir os custos gerados pelas celulasas no processo de hidrólise enzimática. Um extenso trabalho de pesquisa tem sido dedicado a estudar o processo de reuso enzimático, alguns mantêm o foco no processo de reutilização das enzimas que se encontram ligadas ao substrato residual, outros analisam a enzima livre em solução.

Existem diversas possibilidades de reuso da celulase devido a divisão de celulasas numa fração insolúvel e solúvel durante a sacarificação dos materiais lignocelulósicos (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2014). A maior parte das celulasas são adsorvidas sobre o substrato sólido por meio da ligação com a celulose e lignina. As enzimas adsorvidas em celulose são liberadas basicamente após a hidrólise, enquanto a ligação com a lignina é menos reversível. Esta adsorção não produtiva restringe fisicamente as enzimas de atingir a celulose (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A adsorção consiste em um processo heterogêneo de transferência de massa, na qual as moléculas da fase gasosa ou líquida ficam retidas na superfície de um sólido. Esse fenômeno é ocasionado pelas interações entre as moléculas da fase fluida e o sólido adsorvente (ALMEIDA, 2013).

Existem dois tipos de adsorção, que se baseiam na natureza das forças das interações envolvidas no processo de adsorção. A adsorção física (adsorção de Van de Waals) é um fenômeno reversível, sendo o resultado de forças intermoleculares de atração relativamente fracas entre as moléculas do sólido e a substância adsorvida. Já a adsorção química é o resultado da interação entre o sólido e a substância adsorvida, ocorre a formação de ligações de natureza covalente ou iônica, á alta temperatura de forma irreversível, ocorrendo alteração química das moléculas (AGUIAR, 2016).

No estudo de adsorção, é primordial a realização da cinética de adsorção que é responsável por descrever a velocidade em que as moléculas de adsorbato se adsorvem ao adsorvente e atingem o equilíbrio. Muitos fatores podem influenciar essa velocidade de adsorção, como: as características físico-químicas do adsorbato (peso molecular, solubilidade, etc), do adsorvente (natureza, estrutura de poros, tamanho da partícula) e da solução (concentração, temperatura e pH) (CLAUDINO, 2003).

Após obtido o tempo de equilíbrio (resultante da cinética), é realizada a isoterma de adsorção que tem como objetivo mostrar o quanto um adsorvente é capaz de adsorver um adsorbato. Existem diversas isotermas que descrevem as características de equilíbrio da adsorção, incluindo Freundlich, Langmuir e Redlich-Peterson, dentre outras (MENYA *et al.*, 2017). Na Tabela 4 pode ser observado alguns modelos de isoterma de adsorção.

Tabela 3 : Modelos de Isotermas de adsorção.

<i>Isoterma</i>	<i>Modelo</i>	<i>Equação</i>
Freundlich	Modelo experimental	$q_e = K \cdot C_p^{\frac{1}{N}}$
Langmuir	Modelo teórico	$q_e = \frac{q \cdot K \cdot C_p}{1 + K \cdot C_p}$
Langmuir - Freundlich	Junção do modelo teórico de Langmuir com o de Freundlich experimental	$q_e = \frac{q_s \cdot K \cdot C_p^m}{1 + K \cdot C_p^m}$

Fonte: Adaptado de (ALMEIDA, 2013)

A isoterma de Langmuir vem sendo estudada por alguns autores, como QI *et al.*, (2011) que utilizaram o modelo de Langmuir para comparar o substrato enzimático (palha de trigo) submetido a diferentes tipos de pré-tratamento (ácido diluído e álcali). Além disso, os autores

estudaram a recuperação da celulase durante a hidrólise enzimática da palha de trigo submetida a diferentes pré-tratamentos (alcalino e ácido). Utilizaram quatro métodos capazes de recuperar e reutilizar a enzima ligada ao substrato residual, e a enzima livre em solução, que foram usadas por três ciclos sucessivos de hidrólise. Os resultados obtidos mostraram que todos os quatro métodos foram capazes de recuperar as enzimas, tanto na fase líquida quanto na fase sólida, sendo possível recuperar e reciclar uma quantidade considerável de celulase durante a hidrólise de substratos celulósicos. O material com menor quantidade de lignina em sua composição, apresentou melhores rendimentos de hidrólise, indicando o efeito prejudicial da lignina nos métodos de reutilização de enzimas.

Outros autores analisaram outros métodos de reutilização da enzima celulase como PIHLAJANIEMI *et al.* (2014) que estudaram um processo de reutilização de sólidos que foi feito com a palha de trigo pré-tratada e em seguida compararam a hidrólise a tempos de reação constantes, alimentação de substrato e consumo na hidrólise de líquidos e enzimas. Já os autores DU *et al.*, (2014), realizaram um estudo, para testar a viabilidade da estratégia de reutilização da celulase após a sacarificação e fermentação simultânea, usando a fibra de milho pré-tratada. Além disso, otimizaram os parâmetros operacionais desta estratégia e avaliaram os custos da reutilização enzimática usando o método proposto. De acordo com os resultados apresentados, foi possível haver uma redução nos custos da enzima em mais de 50%. WANG *et al.* (2016) avaliaram a reutilização da celulase no processo de tratamento enzimático da polpa de madeira dura de Kraft para ajuste de viscosidade e reatividade. Foram realizados cinco ciclos sucessivos de tratamento enzimático com e sem adição de celulase fresca. Foi observado, que após os cinco ciclos de tratamento as enzimas apresentavam uma faixa de atividade enzimática de 48,8 a 35,1 %.

Outra estratégia utilizada para recuperação da enzima celulase é a eletro ultrafiltração, um processo de ultrafiltração aprimorado por campo elétrico que foi estudado por (CHEN *et al.*, 2013), utilizando a palha de trigo pré-tratada com ácido. Os resultados mostraram que, sob condições operacionais adequadas, a eletro ultrafiltração pode efetivamente reutilizar a celulase do hidrolisado lignocelulósico, e assim reduzir substancialmente o custo da hidrólise. GOMES *et al.*, (2016) reutilizaram as enzimas celulasas adsorvidas ao sólido na hidrólise do lodo de papel reciclado, utilizando um processo de eluição alcalina, foi realizado quatro ciclos sucessivos. De acordo com os resultados apresentados, as enzimas recuperadas apresentaram uma ótima estabilidade e foram obtidas conversões maiores que 70% para as três rodadas de reuso.

A imobilização é uma estratégia bastante utilizada para reutilização enzimática, DING *et al.*, (2016) realizaram a imobilização da enzima celulase, que foi covalentemente ligada a um polímero termo-responsivo (PNMN), esse polímero foi sintetizado através da polimerização de N-ispropilmetacrilamida com acrilato de metilo e a N-(hidroximetil) acrilamida. A enzima foi reutilizada por cinco ciclos sucessivos de hidrólise. Os resultados obtidos mostraram que o bioconjugado de polímero-celulase manteve 85,2% de sua atividade inicial após os ciclos de hidrólise, e constatou-se também que o polímero utilizado é um transportador promissor para imobilizar a enzima. Na Tabela 4, está representado um breve resumo de estratégias que foram utilizadas por alguns autores para reutilização da enzima celulase.

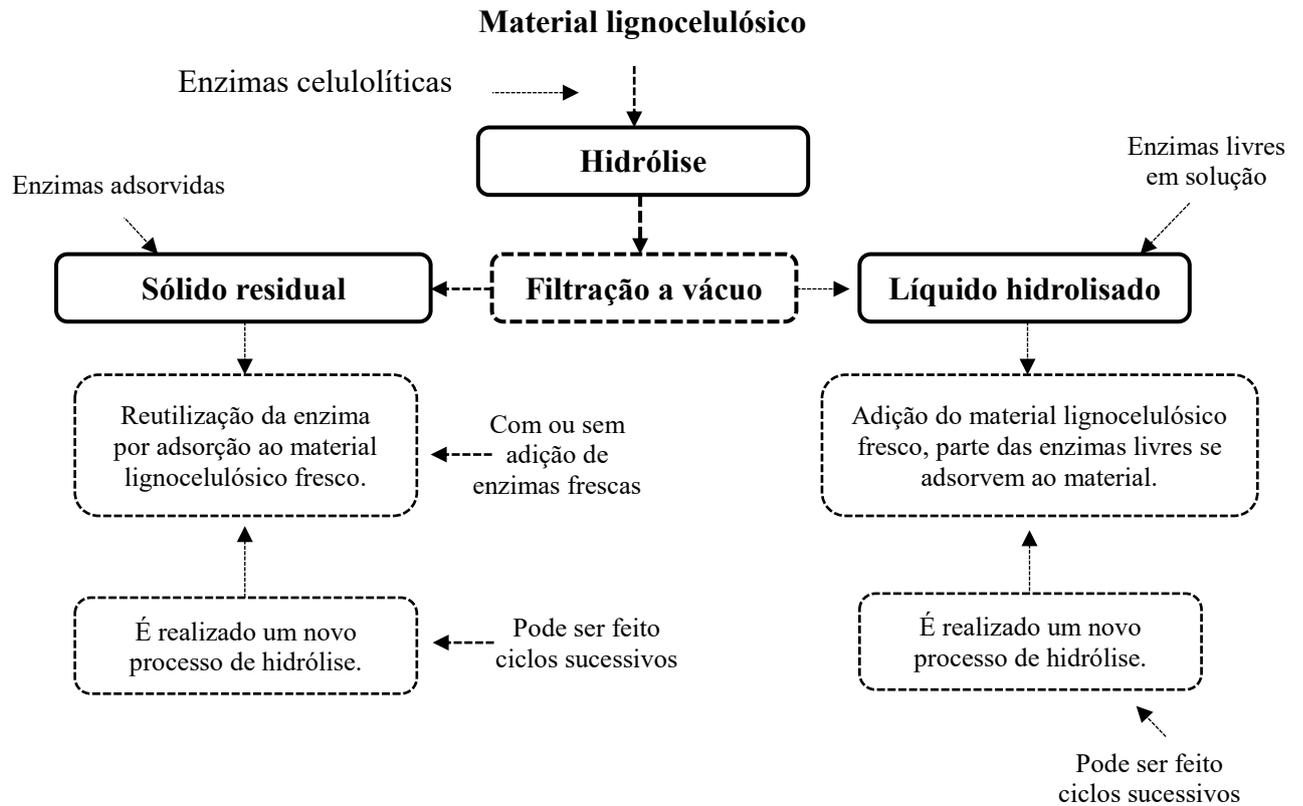
Tabela 4- Estratégias utilizadas para reutilização da enzima celulase.

<i>Estratégia de reutilização enzimática</i>	<i>Referências</i>
Adsorção	PIHLAJANIEMI <i>et al.</i> , 2014; QI <i>et al.</i> , 2011; TU <i>et al.</i> , 2007
Eletrultrafiltração	CHEN <i>et al.</i> , 2013
Eluição alcalina	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2012
Imobilização	DING <i>et al.</i> , 2016

Fonte: elaborado pelo autor

Os estudos mencionados anteriormente e representados na Tabela 4, apresentaram resultados satisfatórios quanto a recuperação e reutilização enzimática durante a hidrólise de substratos celulósicos. No entanto, melhorar o desempenho da enzima e tentar reutilizá-la com o intuito de baratear os custos para produção de carboidratos fermentáveis continua a ser um desafio pertinente. Na Figura 5 pode ser observado o diagrama com algumas possibilidades de reuso das enzimas celulolíticas após o processo de hidrólise. Dessa maneira, este trabalho surge com o intuito de reutilizar o complexo enzimático da celulase usando a fibra de caju pré-tratada usando três métodos diferentes, são elas: Pré-tratamento com ácido diluído, ácido seguido de álcali, e o pré-tratamento utilizando o peróxido de hidrogênio.

Figura 5 - Representação esquemática das possibilidades de reuso das enzimas celulolíticas após a hidrólise enzimática.



Fonte: elaborado pelo autor

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 *Substrato lignocelulósico*

Nesta pesquisa utilizou-se a fibra de caju como substrato lignocelulósico, que foi gentilmente cedida pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia, localizada no estado do Ceará, Brasil. O procedimento inicial foi realizado de acordo com a metodologia citada por ROCHA *et al.* (2009), no qual a fibra de caju foi lavada três vezes com água, seca a 60 °C durante um período de 24 horas em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE-394/1). Em seguida, foi triturada com o moinho de bolas (Tecnal, R-TE-250) e peneirada. As partículas com diâmetro entre 0,25 mm e 0,84 mm foram selecionadas e utilizadas nos experimentos. O material resultante desse procedimento foi nomeado como FC.

#### 3.1.2 *Enzimas*

No presente estudo, os complexos enzimáticos utilizados foram celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO), e o complexo de celobiasas NS 50010, doado pela empresa Novozymes (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark).

### 3.2 Pré - tratamentos do material lignocelulósico

Após o procedimento inicial realizado no material lignocelulósico, conforme (descrito no item 3.1.1), realizaram-se diferentes pré-tratamentos da matéria-prima: pré-tratamento ácido, pré-tratamento ácido seguido de álcali e pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio alcalino, descritos a seguir.

#### 3.2.1 *Pré – tratamento ácido diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)*

Para realização do pré-tratamento ácido, a fibra de caju seca foi imersa em solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 0,6 M, com uma concentração de sólido de 30% (m/v), em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Posteriormente, o material sofreu um tratamento térmico em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ROCHA *et al.*, 2011). Após o pré-tratamento, foram feitas lavagens com água destilada (H<sub>2</sub>O) até atingir pH adequado para hidrólise enzimática. Logo em seguida, o material foi seco a 50 °C durante 24 horas, triturado e as partículas que ficaram

retidas entre os Mesh 20-80 (correspondendo a 0,25-0,84 mm), foram selecionadas e estocadas a temperatura ambiente (27 °C). O material submetido a este pré-tratamento foi denominado como FC-H.

### ***3.2.2 Pré – tratamento ácido seguido de álcali***

A realização desse pré-tratamento foi realizada em dois estágios, ambos seguindo a metodologia de ROCHA *et al.*, (2009). O primeiro estágio está descrito no item 3.2.1. Porém, para realização do segundo estágio o material foi pesado ainda úmido, levando em consideração o teor de umidade e uma concentração de sólidos 30% (m/v). E então, a FC-H foi imersa em solução de NaOH 1 M, em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Em seguida, realizou-se o tratamento térmico a 121 °C em autoclave por 30 minutos. O material pré-tratado foi lavado com água destilada (H<sub>2</sub>O) até neutralização do pH, seco a 50 °C por 24 horas, triturado e as partículas que ficaram retidas entre os Mesh 20-80 (correspondendo a 0,25-0,84 mm) foram selecionadas e estocadas. Esse material foi nomeado como FC-HOH.

### ***3.2.3 Pré – tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino***

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio foi realizado segundo a metodologia descrita por CORREIA *et al.* (2013), que consistiu da imersão da fibra de caju em solução de peróxido de hidrogênio alcalino (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na concentração de 4,3% v/v a pH 11,5 sendo ajustado usando o hidróxido de sódio (NaOH). O pré-tratamento foi conduzido em agitador orbital a 35 °C, 250 rpm durante 6 horas, em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de volume reacional e uma porcentagem de sólidos de 5% m/v. Posteriormente, o líquido e o sólido foram separados por filtração a vácuo. A fração sólida foi lavada até atingir um pH igual a 7, e seca em estufa a 50 °C por 24 h, triturado e os grãos foram padronizados por peneiramento (Mesh 20-80 correspondendo a 0,25-0,84 mm), e foram estocados até realização dos experimentos. O material foi nomeado como FC-PHA.

## **3.3 Determinação da concentração de proteínas e da atividade enzimática nos complexos enzimáticos**

A concentração de proteínas totais nos complexos enzimáticos comerciais foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade enzimática de cada enzima utilizada ao longo dos experimentos encontra-se descrita a seguir.

### 3.3.1 Atividade da celulase

Para determinação da atividade de celulases, expressa em unidades de papel filtro (FPU) por mL do complexo, foi utilizada a metodologia proposta por GHOSE (1987). Em tubos de ensaio, foram adicionadas tiras de 1 cm x 6 cm (aproximadamente 50 mg) de papel de filtro Whatman número 1 e 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM para pré-incubação a 50 °C. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 0,5 mL de distintas diluições enzimáticas. Usando as mesmas condições experimentais, realizou-se a reação do branco das diluições (meio reacional sem a presença do substrato) e o branco do substrato (sem utilização da enzima). Após o tempo de 60 minutos, as reações foram interrompidas pela adição do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A leitura das amostras foi realizada a 600 nm sendo posteriormente determinadas as concentrações de glicose obtidas utilizando uma curva de calibração. Em seguida, a atividade foi expressa em unidades de papel filtro (FPU) por mL do complexo enzimático e calculada pela Equação 2.

$$At_{FPU/ml} = \left( \frac{C_{Ar} \times V_R}{V_{SE} \times t_H} \right) \times 5,5 \cdot 10^3 \quad (2)$$

Sendo,

$C_{Ar}$ : concentração de glicose (g/L);

$V_R$ : O volume reacional (L);

$V_{SE}$ : O volume da solução enzimática (mL);

$t_H$  : O tempo de hidrólise (min);

$5,5 \cdot 10^3$ . Fator para conversão em  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor.

### 3.3.2 Atividade de celobiase no complexo de celobiasas NS 50010.

Para medir a atividade da celobiase, utilizou-se uma solução de celobiose a 15 mM como substrato para a hidrólise. Adicionou-se aos tubos de ensaio, 1,0 mL da solução de celobiose, sendo pré-incubados a 50 °C. Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL de diferentes diluições enzimáticas (com capacidade de produzir 1,0 mg de glicose), foram incubados a 50 °C durante 30 minutos de reação. Após o tempo reacional, os tubos foram colocados em água fervente por um período de 5 min para interromper a reação. O material foi centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos, em seguida filtrado. A concentração de glicose produzida foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para o cálculo da atividade de celobioase, foi determinado a massa de glicose (mg) presente no meio reacional. Através de um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático versus massa de glicose gerada, estimou-se a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose ( $C_{Enzima}$ ) e com esta concentração determinou-se a atividade enzimática utilizando a Equação 3 (GHOSE, 1987):

$$\frac{CBU}{ml} = \frac{0,0926}{C_{Enzima}} \quad (3)$$

Sendo,  $C_{Enzima}$  a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose, e 0,0926 é utilizado para conversão das unidades.

### 3.4 Hidrólise enzimática

#### 3.4.1 Hidrólise enzimática padrão I e II

A hidrólise enzimática padrão I da biomassa *in natura* e pré-tratada foi realizada em frascos Erlenmeyers de 250 mL num agitador orbital (Tecnal – TE 422, SP, Brazil) a 45 °C, agitação de 150 rpm por um período de 72 horas. Tal experimento foi conduzido segundo a metodologia de CORREIA *et al.*,(2013). Nos ensaios, foi obedecido a proporção 1% (m/v) de celulose para cada substrato (FC *in natura*, FC-H, FC-HOH e FC-PHA), em tampão citrato de sódio 50 mM para manutenção do pH de 4,8, usando uma carga enzimática do complexo celulase de 15 FPU/ g celulose. Com o objetivo de inibir o crescimento microbiano foi adicionado na mistura de hidrólise, 80 µL (10 mg/mL em 70% etanol) de tetraciclina para cada volume reacional de 10 mL. Foram retiradas amostras (1 mL) durante intervalos de tempo distintos e foram centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi então analisado quanto ao teor de proteínas e açúcares (glicose e celobiose).

Em seguida, após a determinação da concentração de carboidratos calculou-se o rendimento de glicose e celobiose (g/g de material lignocelulósico) segundo a Equação 4, na qual o valor de 0,9 é o fator para corrigir a molécula de água que é adicionada após a hidrólise da celulose e V é o volume reacional.

$$Rendimento = \frac{\left(Concentração_{(glicose+celobiose)} \left(\frac{g}{L}\right)\right) * 0,9 * V(L)}{g\ cellulose\ inicial} \quad (4)$$

A hidrólise padrão II foi conduzida seguindo um procedimento semelhante a hidrólise padrão I, porém, para essa hidrólise além da adição do complexo celulase de *Trichoderma reesei* 26921 na carga de 15 FPU/ g celulose, foi adicionado o extrato enzimático celobiase (NS 50010) numa carga de 60 CBU/ g celulose. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.5 Adsorção da enzima na biomassa lignocelulósica**

O processo de adsorção enzimática é fundamental para o processo de hidrólise enzimática. Diante disso, foi estudado a cinética de adsorção das enzimas celulásicas e posteriormente avaliou-se o modelo de isoterma que se ajustou aos dados experimentais.

#### **3.5.1 Cinética de Adsorção da celulase**

A cinética de adsorção da celulase (*Trichoderma reesei* ATCC 26921) foi realizada utilizando a fibra de caju (FC) submetida a diferentes pré-tratamentos (FC-HOH, FC-PHA e FC-H). Inicialmente, o material pré-tratado foi adicionado a 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH=4,8), a uma concentração de celulose de 1% m/v e carga enzimática utilizada foi 15 FPU/ g de celulose. As cinéticas foram realizadas em um agitador orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) a 45 °C sob agitação de 150 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1 mL em diferentes intervalos de tempo e foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min, e então o sobrenadante de cada amostra foi recolhido. Em seguida, analisou-se a concentração de proteínas e determinou-se a atividade enzimática da celulase. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **3.5.2 Isoterma de Adsorção da celulase**

A isoterma de adsorção da celulase foi feita utilizando a fibra de caju pré-tratada por diferentes métodos (FC-H, FC-HOH, FC-PHA), variando-se a quantidade de proteína do extrato enzimático de 0,01 a 1,00 mg/mL. Adicionou-se à concentração de celulose de 1% m/v e tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) a 45 °C até atingir o tempo de equilíbrio. O teor de proteína no sobrenadante foi determinado como celulase livre em solução. A quantidade de celulase ligada ao substrato foi calculada como a diferença entre a proteína livre em solução e a proteína total inicialmente adicionada ao meio de reação. E então foi verificado se o modelo de Langmuir (Equação 5) se ajustava aos dados experimentais.

$$E_{ad} = \frac{E_{max}K_pE_f}{(1 + K_pE_f)} \quad (5)$$

$E_{ad}$  : concentração de celulase adsorvida no substrato (mg/g de substrato);

$E_{max}$ : teor máximo de celulase adsorvido (mg/g de substrato);

$K_p$  : constante de equilíbrio de Langmuir (mL/mg de celulase)

$E_f$  : concentração de celulase livre na solução (mg/mL).

### **3.5.3 Estudo da cinética de adsorção da enzima celobiase (NS 50010)**

A cinética de adsorção da celobiase (NS 50010) foi realizada utilizando a fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, como o ácido diluído (FC- H), ácido seguido de álcali (FC-HOH) e peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA). O material pré-tratado foi adicionado a 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH=4,8), a uma concentração de substrato de 1% m/v (tomando como base a quantidade de celulose) e a carga enzimática utilizada foi 60 CBU/g celulose do complexo celobiase. As cinéticas foram realizadas em um agitador orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) a 45 °C sob agitação de 150 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1 mL em diferentes intervalos de tempo e foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min, e então o sobrenadante de cada amostra foi recolhido, e em seguida foi analisado a concentração de proteínas. O procedimento experimental foi realizado em triplicata.

## **3.6 Diferentes estratégias de recuperação e reuso enzimático**

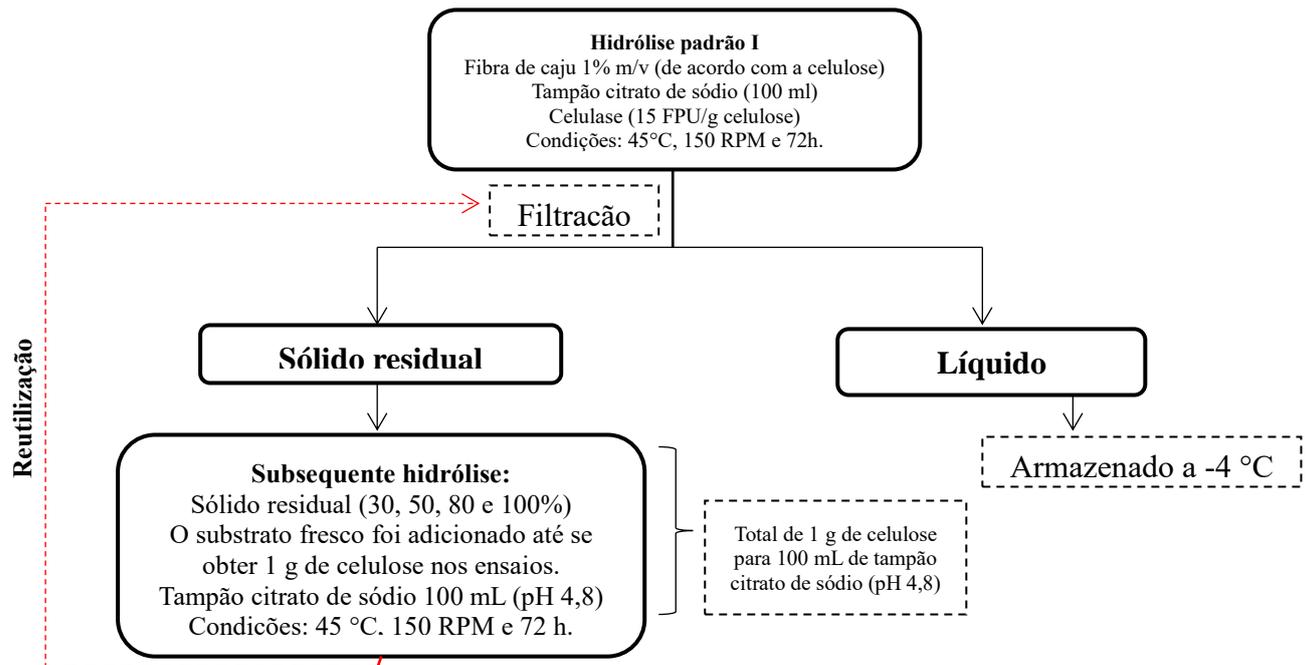
Após a realização das hidrólises enzimáticas padrão I e II, foram desenvolvidas cinco estratégias de reuso das enzimas celulásicas, que são descritas detalhadamente a seguir.

### **3.6.1 Recuperação e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, variando-se o sólido residual, sem suplementação enzimática (Estratégia I)**

De posse dos materiais hidrolisados obtidos da hidrólise padrão I (método 3.5.1) de cada pré-tratamento, com rendimentos e quantidades de proteínas livres conhecidos, quantificou-se a massa necessária destes para que combinado com o substrato fresco (SF), fosse obtido 1 g de celulose para um volume reacional de 100 mL (1% m/v). Para analisar a eficiência da adsorção enzimática, foram utilizados quatro pontos distintos de estudo, 30, 50, 80 e 100% de concentração do sólido residual na mistura. Foram realizados dois ciclos sucessivos de hidrólise

enzimática em um agitador orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) a 45 °C sob agitação de 150 rpm e 72 horas. Este procedimento foi feito em triplicata. Na Figura 6 é apresentado um diagrama que ilustra esta estratégia.

Figura 6 - Diagrama esquemático da estratégia de reuso I: variação do percentual do substrato fresco e hidrolisado.



Fonte: elaborado pelo autor

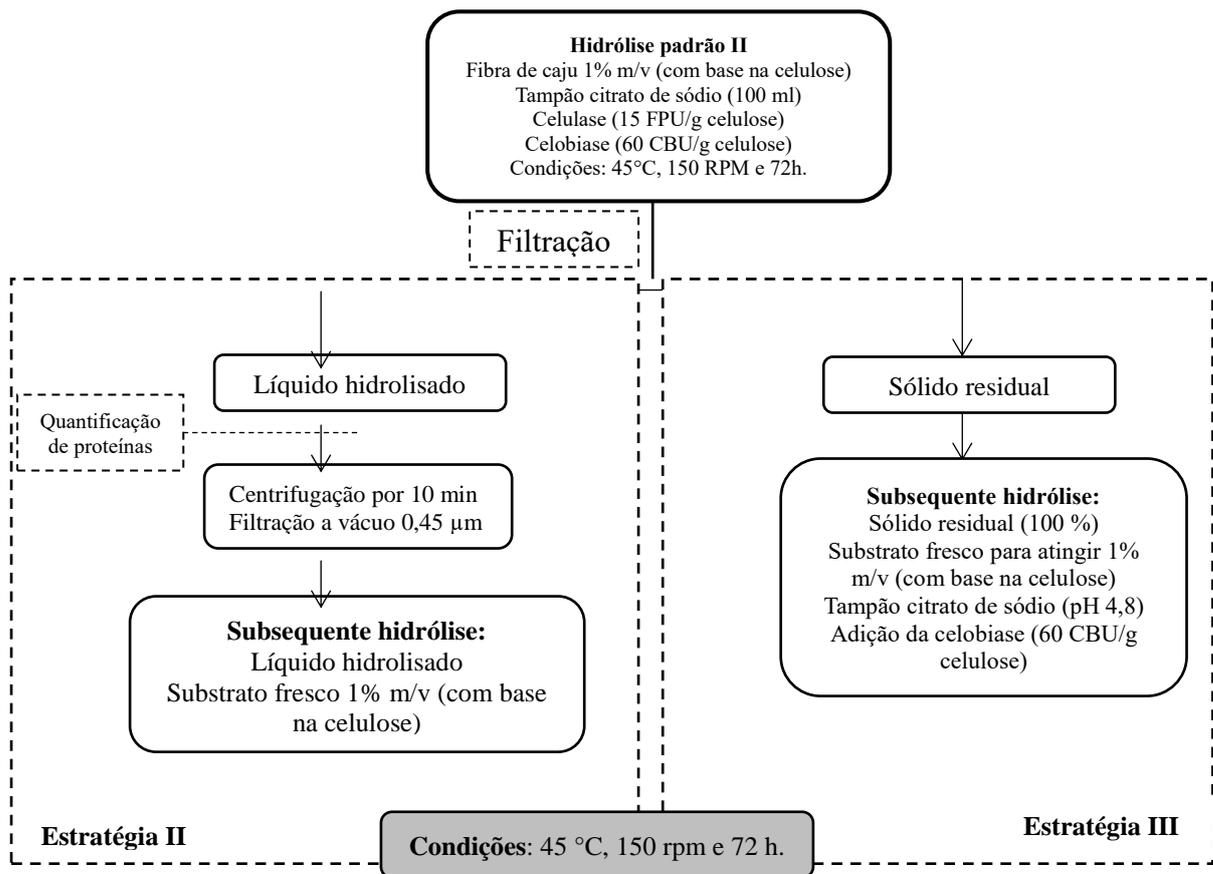
### 3.6.2 Reuso das enzimas celulásicas (celulase e celobiase) presentes no líquido hidrolisado, sem suplementação enzimática (Estratégia II).

Após a realização do processo de hidrólise padrão II, o material foi filtrado a vácuo e separou-se as fases sólida e líquida. De posse do material, foi calculado o quanto de enzima ainda se encontrava livre em solução e a quantidade de açúcares resultantes. Para essa estratégia foi reutilizado a fase líquida da hidrólise enzimática, que após filtração a vácuo foi centrifugada por 10 minutos, a 5000 rpm e em seguida filtrada novamente em membrana de 0,45 µm. Neste reuso foi mantida a proporção 1% m/v, e o percentual mássico corresponde a quantidade de celulose adicionada ao líquido hidrolisado. O experimento foi conduzido a 45 °C, 150 rpm e 72 horas.

### 3.6.3 Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, com adição do substrato fresco e da enzima celobiase (Estratégia III).

A partir da quantidade de celulase medida na fase líquida, determinou-se o quanto de enzima ficou adsorvida na fase sólida. Não houve suplementação usando a enzima celulase. Posteriormente, foi adicionado substrato fresco 1% m/v (calculado de acordo com a quantidade de celulose) a 100% do sólido residual, em tampão citrato de sódio (pH 4,8) e adicionado 60 CBU/ g celulose do complexo celobiase (NS 50010), pois foi levado em consideração que a celobiase não se adsorveu ao substrato lignocelulósico e permaneceu na fase líquida. O experimento foi incubado por 72 horas nas condições de 45 °C e 150 rpm, o fluxograma da Figura 7 ilustra o processo de reuso da estratégia II e III, respectivamente.

Figura 7 - Diagrama esquemático das estratégias de reuso: reutilização das enzimas celulásicas (celulase e celobiase) presentes no líquido hidrolisado, sem suplementação enzimática (estratégia II) e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual (Estratégia III).



### 1° Reuso

Fonte: elaborado pelo autor

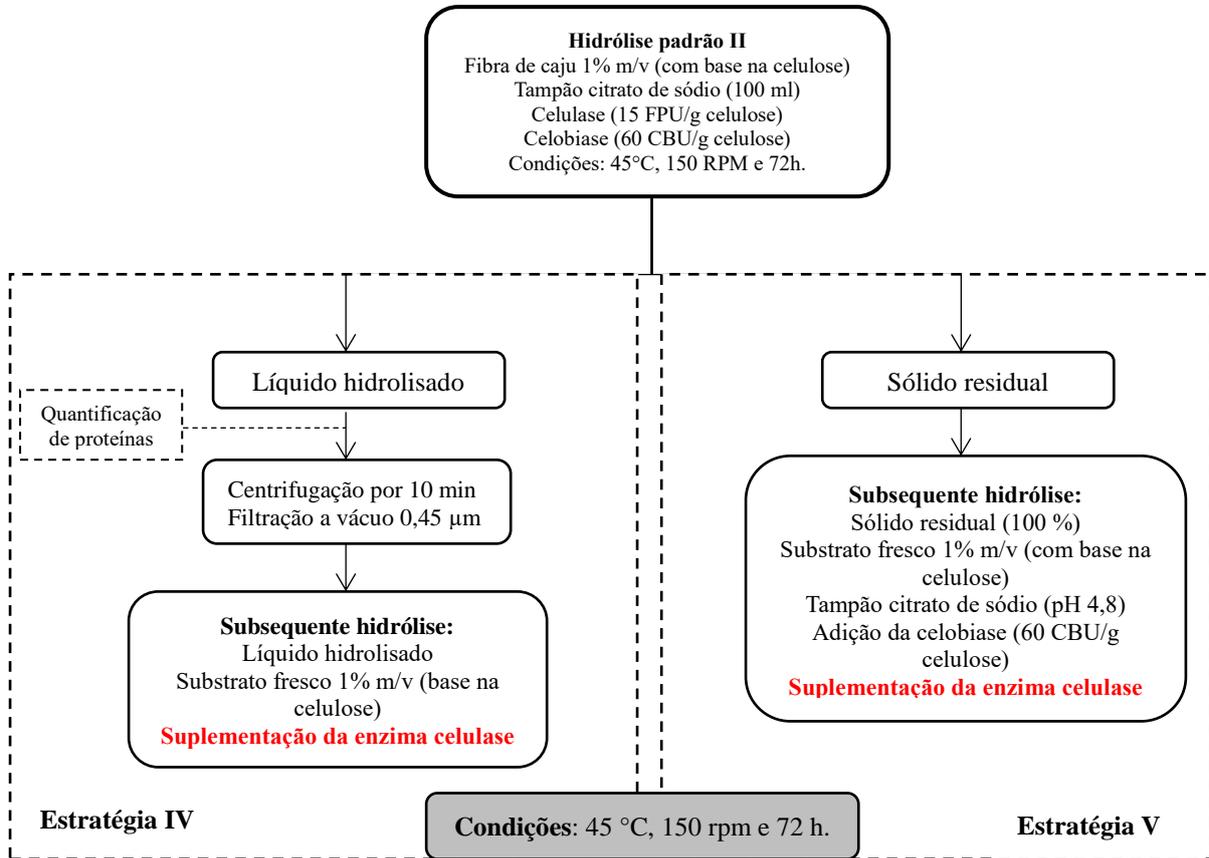
### ***3.6.4 Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com suplementação da celulase (Estratégia IV).***

Na hidrólise padrão II foi realizada a filtração a vácuo para separação da fase líquida e sólida. Na quarta estratégia reutilizou as enzimas presentes no líquido hidrolisado, que após a quantificação de proteínas conforme realizado pelos autores QI *et al.*,(2011) e ZHENG *et al.*, (2016), usou-se uma correlação entre o teor proteico e FPU/ g de celulose por meio de uma curva de calibração. Depois foi determinado o volume de extrato enzimático necessário para que atingisse o valor de 15 FPU/ g celulose, que foi adicionado ao meio reacional. Foi respeitada a proporção 1% m/v, onde o percentual mássico corresponde a celulose fresca adicionada ao líquido hidrolisado. O experimento foi conduzido a 45 °C, 150 rpm por um período de hidrólise de 72 horas.

### ***3.6.5 Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, utilizando suplementação da enzima celulase e adição da celobiase (Estratégia V)***

A estratégia V reutilizou as enzimas adsorvidas ao sólido residual da hidrólise padrão II, e após a quantidade de celulase medida na fase líquida determinou-se o quanto de proteínas ficou adsorvida na fase sólida. Posteriormente, foi adicionado fibra fresca 1% m/v (pesado de acordo com a quantidade de celulose) ao sólido residual em tampão citrato de sódio (pH 4,8) e acrescentado a este uma suplementação da celulase até que atingisse o valor de 15 FPU/g celulose e adicionado 60 CBU/ g celulose do complexo celobiase (NS 50010), considerou-se que não houve adsorção da celobiase ao substrato lignocelulósico, e a enzima permaneceu no líquido hidrolisado. O experimento foi incubado por 72 horas nas condições de 45 °C e 150 rpm, o fluxograma da Figura 8 ilustra o procedimento realizado para as estratégias IV e V.

Figura 8 - Diagrama esquemático das estratégias de reuso: reutilização das enzimas celulolíticas presentes no líquido hidrolisado, com suplementação enzimática do complexo celulase (Estratégia IV) e reuso da celulase adsorvida ao sólido residual com adição do complexo celobiase e suplementação da enzima celulase (Estratégia V).



Fonte: elaborado pelo autor

### 1° Reuso

Na Tabela 5, é apresentado um resumo das quatro estratégias de reuso enzimático que foram desenvolvidas utilizando o líquido hidrolisado e o sólido residual resultante da hidrólise padrão II (método 3.4.1). Essas estratégias foram usadas para dois ciclos consecutivos de hidrólise. Ao final de cada reuso, foi calculado a eficiência da hidrólise enzimática e o quanto se recuperou da enzima.

Tabela 5- Reutilização das enzimas celulolíticas presentes no sólido residual e líquido hidrolisado, resultantes da hidrólise padrão II, estratégias II, III, IV e V. Condições: 45 °C, 150 rpm e 72 h.

<i>Estratégias</i>	<i>Fase Recuperada</i>	<i>Suplementação da Enzima Celulase</i>	<i>Adição da Enzima Celobiase</i>
II	Líquido hidrolisado	Não	Não
III	Sólido residual	Não	Sim
IV	Líquido hidrolisado	Sim	Não
V	Sólido residual	Sim	Sim

Fonte: elaborado pelo autor

### 3.7 Métodos analíticos

#### 3.7.1 Determinação dos açúcares

Os açúcares (glicose e celobiose) foram analisados por cromatografia de alta performance (CLAE), usando um sistema CLAE Waters (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um índice detector de refração Waters 2414. As concentrações dos açúcares foram analisadas utilizando a coluna Aminex HPX-87H, o eluente usado foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mmol em água deionizada a um fluxo volumétrico de 0,5 mL/min sob uma temperatura de 65 °C.

#### 3.7.2 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford (1976). Utilizou-se curva de calibração com padrão soro albumina bovina (BSA), adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO), válida numa faixa de concentração de 0 mg/mL a 1 mg/mL. Os resultados foram calculados através da curva padrão do reagente de Bradford e obtidos em mg/mL.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Composição química dos substratos utilizados

As composições centesimais da fibra de caju *in natura* (FC *in natura*) e submetida a diferentes tipos de pré-tratamento estão representadas na Tabela 6. A fibra de caju é um material lignocelulósico que vem sendo fonte de pesquisa em vários projetos do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Bioprocessos – GPBio (DEQ – UFC), incluindo o estudo de diferentes pré-tratamentos que foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho. Logo, os resultados das caracterizações representadas na Tabela 6 foram baseados em análises experimentais desenvolvidas pelo GPBio.

Tabela 6 - Composição centesimal da fibra de caju *in natura* e após diferentes pré-tratamentos.

<i>Material</i>	<i>Celulose (%)</i>	<i>Hemicelulose (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Cinzas (%)</i>	<i>Referências</i>
FC <i>in natura</i>	20,91 ± 2,19	10,17 ± 0,89	35,26 ± 0,9	1,62 ± 0,07	CORREIA, 2017
FC-H	19,01 ± 0,15	5,40 ± 0,09	62,18 ± 1,36	2,78 ± 0,01	SERPA, 2016
FC- HOH	74,72 ± 1,16	5,58 ± 0,04	11,01 ± 0,08	0,99 ± 0,11	BARROS <i>et al.</i> , 2017
FC-PHA	44,16 ± 0,29	18,24 ± 0,07	2,91 ± 0,07	5,87 ± 0,86	CORREIA, 2017

Fonte: elaborada pelo autor

Observa-se que o pré-tratamento ácido (FC-H) solubilizou parte da hemicelulose existente na fibra de caju *in natura*. Segundo AGBOGBO e WENGER (2007) com a remoção de hemicelulose há um aumento da área superficial e do volume de poros do substrato, ocasionando um aumento do rendimento e da taxa de hidrólise enzimática.

Com a realização do pré-tratamento ácido seguido de álcali (FC-HOH) aumentou-se a proporção de celulose com base nos outros constituintes, a porcentagem de celulose foi de 20,91% para 74,72%. O aumento da proporção de celulose por sua vez, deve-se a redução no percentual de lignina em comparação a porcentagem inicial da fibra *in natura*. Foi verificado que o tratamento utilizando o NaOH diluído em materiais lignocelulósicos causa um inchaço, aumenta a área interna, diminui o grau de polimerização e cristalinidade, rompe as ligações entre a lignina e carboidratos, para que assim possa remover a lignina (ALVIRA *et al.*, 2010; RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Na Tabela 6 pode ser observado também a composição da FC-PHA. O pré-tratamento da fibra de caju utilizando o peróxido de hidrogênio alcalino resultou num aumento no percentual de celulose que passou de 20,91 % para 44,16 %. O percentual de lignina na fibra *in natura* era de 35,26% e após o pré-tratamento resultou em 2,91%, uma extração de 91,7%. Já a quantidade de hemicelulose teve um percentual de aumento de 10,17% para 18,24%. A remoção da lignina se deve à ação oxidante do peróxido de hidrogênio, quebrando as ligações dessa molécula em partes menores, tendo como alguns produtos da reação de oxirredução, o gás oxigênio e a água (SELIG *et al.*, 2009; CORREIA *et al.*, 2013).

O intuito de realizar diferentes pré-tratamentos na fibra de caju, foi obter o mesmo substrato possuindo diferentes composições, para verificar as interferências da composição no processo de hidrólise enzimática e na reutilização da enzima.

## 4.2 Caracterização dos complexos enzimáticos

Na Tabela 7 encontra-se a caracterização dos complexos enzimáticos em termos de concentração de proteínas e atividade enzimática. Os mesmos serão usados ao longo desse estudo para a hidrólise enzimática da fibra de caju.

Tabela 7 - Caracterização dos complexos enzimáticos utilizados para hidrólise enzimática.

<i>Enzimas</i>	<i>Proteínas (mg/mL)</i>	<i>Atividade Celulase (FPU/mL)</i>	<i>Atividade Celobiase (UCB/mL)</i>
Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> ATCC (26921)	32,41	97,8	ND*
Celobiase (NS 50010)	30,10	-	384,28

\*Não determinado

As caracterizações enzimáticas dos complexos (vide Tabela 7) foram determinadas com o objetivo de conhecer a atividade enzimática das enzimas presentes nos extratos enzimáticos utilizados, que posteriormente foi utilizado para quantificar o volume do complexo enzimático que seria usado ao longo dos experimentos.

## 4.3 Estudo de Adsorção das enzimas celulase e celobiase na fibra de caju *in natura* e pré-tratada.

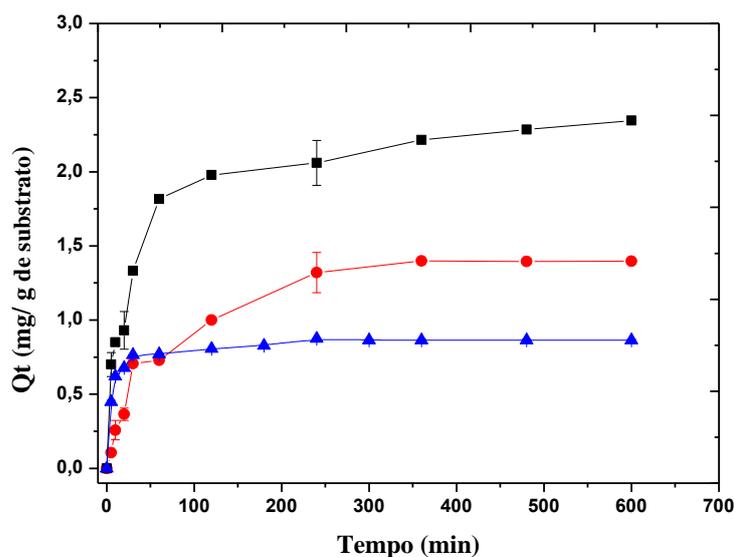
### 4.3.1 Cinéticas de Adsorção do complexo enzimático celulase

A hidrólise enzimática da biomassa é um processo biocatalítico heterogêneo, em que a adsorção enzimática em substratos e a formação de complexos enzima-substrato são pré-requisitos para hidrólise da celulose. Como resultado, é essencial descrever com precisão o

comportamento de adsorção enzimática (ZHENG *et al.*, 2016). A cinética de adsorção foi realizada utilizando o complexo enzimático celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 na carga de (15 FPU/ g celulose), o equivalente a 0,07 mg/ mL de proteínas, que foi incubada sob agitação de 150 rpm e 45 °C. As condições foram as mesmas que posteriormente foram empregadas na hidrólise enzimática, para que a partir dos resultados obtidos fosse possível analisar o comportamento da enzima na hidrólise enzimática dos diferentes materiais estudados (ácido, ácido seguido de álcali e peróxido de hidrogênio alcalino).

Na Figura 9, observa-se a variação da quantidade de celulase adsorvida por grama de substrato em função do tempo. Nota-se que o substrato pré-tratado com o ácido diluído (FC-H) teve uma rápida adsorção nos primeiros 40 minutos, seguido por um período de diminuição da taxa de adsorção, e finalmente atingiu o equilíbrio de adsorção após um período de 120 minutos. Por outro lado, a adsorção da enzima na fibra de caju pré-tratada com o peróxido de hidrogênio e com o ácido seguido de álcali, foi mais lenta para atingir o equilíbrio, resultou em 360 e 480 minutos, respectivamente. E essa variação no tempo de equilíbrio pode ser explicada devido a diferença na composição dos substratos, as quais possuem uma menor quantidade de lignina e um maior percentual de celulose.

Figura 9 - Cinética de adsorção da celulase sobre o substrato lignocelulósico submetido a diferentes pré-tratamentos (FC-H, FC-HOH e FC-PHA), conduzida a 45 °C e 150 rpm, com uma carga enzimática de 15 FPU / g celulose e concentração de 1% m/v (com base no conteúdo de celulose) em tampão citrato 50 mM a pH 4,8. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H.



Fonte: elaborada pelo autor

A lignina afeta significativamente o perfil de adsorção das celulases devido as suas propriedades de ligação não produtivas com a celulase, que dificultam o acesso da celulase com

a celulose (TU *et al.*, 2009; QI *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2017). Outro problema gerado pela lignina é a perda de atividade da celulase, segundo ZHENG *et al.* (2016), essa perda de atividade no processo de hidrólise é principalmente causada pela adsorção da celulase na lignina que ocorre de forma não produtiva e irreversível.

A fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos continha diferentes teores de lignina (62,2% para substrato tratado com ácido; 11,0% para substrato tratado com ácido seguido de álcali e 2,9 % para o substrato tratado com peróxido de hidrogênio alcalino); portanto, diferentes características de adsorção e dessorção seria esperado durante a hidrólise. Então, por a fibra de caju pré-tratada com ácido apresentar um menor teor de celulose e maior quantidade de lignina, adsorveu-se de maneira mais rápida a celulase a este material, porém a quantidade de celulase adsorvida por grama de substrato ( $Q_t$ ) é menor, por ser necessário uma quantidade maior de FC-H para obter a quantidade de celulose necessário para realizar os experimentos na mesma concentração de celulose.

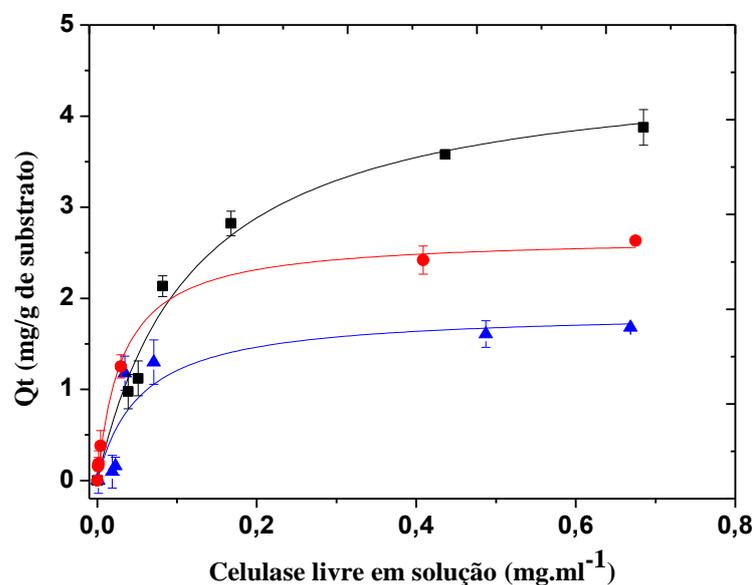
OUYANG *et al.*, (2013) investigaram a eficiência da hidrólise, adsorção da celulase e reciclagem das enzimas durante a hidrólise do bagaço da polpa de sulfite (BSP), e constataram que uma menor concentração de substrato precisa de mais tempo para atingir o equilíbrio, do que altas concentrações de substrato. Além disso, constataram que utilizando uma menor concentração de substrato ocorreu uma maior adsorção da celulase, indicando que a propriedade de adsorção pode diminuir com o aumento da concentração do substrato. O que condiz com os resultados apresentados na Figura 9, em que o substrato FC-H que possui o menor teor de celulose (necessitando de maior quantidade de substrato para padronização dos experimentos), conseguiu adsorver mais rapidamente a enzima celulase, e o substrato FC-HOH com maior teor de celulose (necessitando de menor quantidade de substrato) adsorveu uma maior quantidade de celulase.

Após o conhecimento do tempo de equilíbrio de adsorção, a isoterma de adsorção da celulase foi obtida para saber o teor de proteína adsorvida no substrato fresco quando misturado com suspensão de reação.

#### **4.3.2 Isoterma de Adsorção da celulase**

Na Figura 10 pode ser observado a isoterma de adsorção da enzima celulase nos diferentes substratos lignocelulósicos (FC-H; FC-HOH e FC-PHA), foi usado uma carga enzimática de 15 FPU/ g celulose (0,07 mg/ mL de proteínas). Posteriormente, o modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais, os valores dos parâmetros obtidos podem ser observados na Tabela 8.

Figura 10 - Isoterma de Adsorção da enzima celulase na fibra de caju submetida aos diferentes tipos de pré- tratamento (FC-HOH; FC-PHA; FC-H), realizada a 45 °C e 150 rpm. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H;



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 8 - Parâmetros do modelo de Langmuir para as isotermas de adsorção da celulase nos substratos lignocelulósicos avaliados.

<i>Substrato</i>	$E_{max}$ (mg/g)	$K_p$ (mL/mg)	$R^2$
FC-HOH	4,67	8,15	0,9834
FC-PHA	2,67	31,82	0,9966
FC-H	1,86	18,58	0,8541

Fonte: elaborada pelo autor

Os valores dos coeficientes de correlação resultantes do ajuste da isoterma de Langmuir indicam a qualidade do ajuste do modelo matemático aos dados experimentais de adsorção da celulase em todos os substratos avaliados.

Os parâmetros encontrados na Tabela 8 são úteis para investigar os mecanismos de interação entre enzimas e substratos. Para o substrato tratado com o ácido (FC-H) a constante de Langmuir que é usada como uma estimativa da afinidade das enzimas para os substratos, foi relativamente maior ( $K_p = 18,58$  mL/mg), do que para o substrato tratado por ácido seguido de álcali (FC-HOH), com um valor de  $K_p = 8,15$  mL/mg, o que aponta uma maior afinidade da celulase pelo substrato pré-tratado com ácido do que o substrato tratado com ácido seguido de álcali. O FC-H tem 19,01% de celulose e o FC-HOH possui 74,72%, porém, uma afinidade menor foi verificada no tratamento FC-HOH do que o tratamento FC-H. Esse fato pode ser justificado pela diferença no teor de lignina nos dois substratos. Sabe-se que a lignina não pode

ser hidrolisada, no entanto, ocorre a adsorção de forma não produtiva entre celulase e lignina, devido interações hidrofóbicas com os grupos hidrofóbicos presentes nos domínios de ligação da celulase (PALONEN *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2011). O valor do  $K_p$  encontrado para o substrato FC-PHA foi de 31,82 mL/mg, que pode ser atribuído ao maior teor de hemicelulose presente no material (vide Tabela 7), que pode auxiliar no processo de adsorção da enzima celulase.

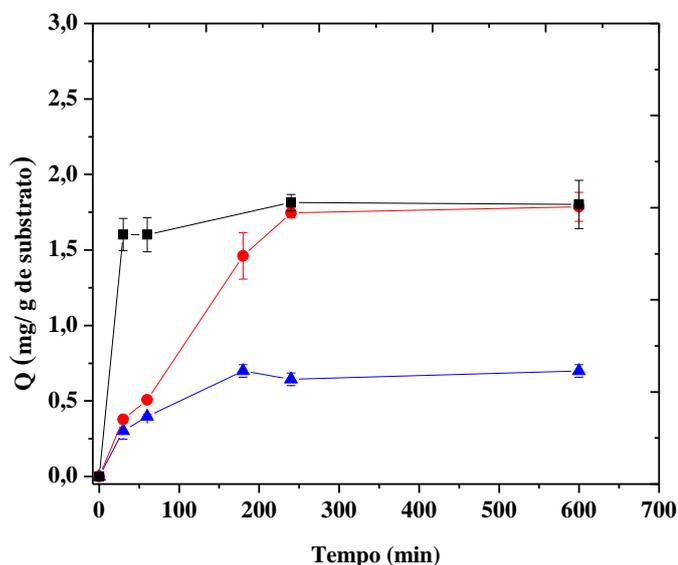
O valor de  $E_{max}$  encontrado para o substrato FC-H foi de 1,86 mg/g, para o FC-PHA foi de 2,67 mg/g e para o FC-HOH foi igual a 4,67 mg/g, que indicam a capacidade máxima de adsorção da enzima celulase para cada substrato lignocelulósico. Com os resultados apresentados, é observado que o substrato FC-HOH que possui 74% de celulose em sua composição, obteve o maior valor de  $E_{max}$ , indicando que a enzima celulase consegue se adsorver em maior quantidade no substrato que possui o maior teor de celulose, que é o principal alvo da enzima celulase.

Um perfil semelhante a isoterma de adsorção obtida, foi encontrado por (QI *et al.*, 2011). Eles estudaram a adsorção da celulase derivada de *Trichoderma reesei*, na palha de trigo pré-tratada com ácido (20,5% de lignina) e com álcali (3,6% de lignina) no qual, o substrato que possuía o menor percentual de lignina em sua composição, conseguiu adsorver a maior quantidade de celulase.

#### **4.3.3 Estudo da cinética de adsorção da enzima celobiase (NS 50010)**

Avaliou-se também a cinética de adsorção da enzima celobiase (NS 50010) nos diferentes substratos lignocelulósicos (FC-HOH; FC-H e FC-PHA), usando uma carga enzimática igual a 60 CBU/ g celulose (0,08 mg/ mL de proteínas), que pode ser observado na Figura 11. Além da celulase, a celobiase é outra enzima celulásica que está envolvida na hidrólise da biomassa lignocelulósica (CASTRO, 2010). A celobiase tem como função converter as celobioses e oligossacarídeos solúveis em glicose, para que a celobiase efetue essa conversão, ao contrário da celulase, não há necessidade da adsorção da enzima a celulose, pois os dímeros de celobiose encontram-se solúveis na mistura ao longo da hidrólise enzimática. No entanto, essa adsorção pode ocorrer ao longo da reação, assunto que diverge na literatura. De acordo com TU *et al.* (2007) a  $\beta$ -glicosidase normalmente não se liga ao substrato celulósico o que dificultaria sua reutilização. No entanto, YANG e WYMAN (2006) realizaram um estudo utilizando a farinha de milho e foi constatado que houve adsorção da  $\beta$  – glicosidase no substrato lignocelulósico.

Figura 11- Estudo cinético da adsorção do complexo enzimático celobiase na fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, conduzida a 45 °C e 150 rpm, com uma carga enzimática de 60 CBU/ g celulose e concentração de 1% m/v (com base no conteúdo de celulose). (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H.



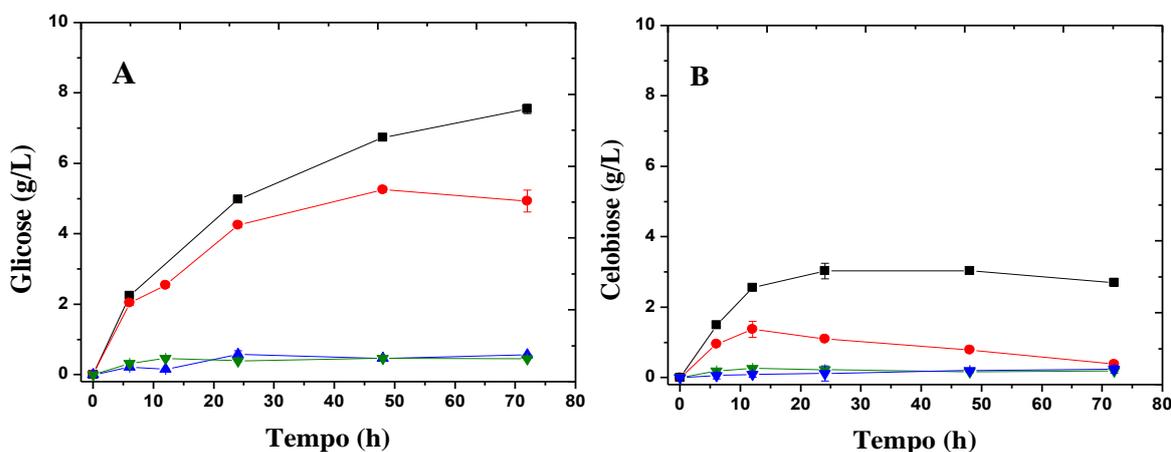
Fonte: elaborada pelo autor

Na Figura 11 pode ser observado que houve adsorção da enzima celobiase na fibra de caju submetida aos diferentes tipos de pré-tratamentos (FC-HOH; FC-PHA e FC-H). O tempo de equilíbrio encontrado foi o mesmo para todos os substratos estudados (FC-H; FC-HOH e FC-PHA), sendo igual a 250 min. No entanto, foi observado que a composição do material interferiu na quantidade de enzima adsorvida, o substrato pré-tratado com ácido seguido de álcali, que apresenta uma quantidade de celulose de 74% obteve uma quantidade adsorvida de 1,8 mg de proteína por grama de fibra de caju pré-tratada, e a celulase em 600 minutos obteve uma adsorção de 2,4 mg de proteína por grama de fibra pré-tratada. O FC-H por sua vez obteve uma quantidade adsorvida de 0,7 mg/g de celobiase e 0,9 mg/g de celulase. É observado que a quantidade adsorvida de celobiase para os substratos é inferior a adsorvida de celulase.

#### 4.4 Hidrólises Enzimáticas (Hidrólise padrão I e II)

A Figura 12 mostra os resultados obtidos da hidrólise enzimática padrão I usando os quatro substratos (FC, FC-H, FC-HOH e FC-PHA), que foi conduzida sem a suplementação da celobiase, sob uma temperatura de 45 °C com agitação de 150 rpm. Na Figura 12, é apresentado os resultados da concentração de açúcares (glicose e celobiose) em função do tempo de hidrólise.

Figura 12 - Perfil das concentrações de glicose e celobiose durante a hidrólise enzimática padrão I da fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, utilizando o complexo enzimático celulase (15 FPU/g celulose) a 45 °C sob agitação de 150 rpm. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC H; (▼) FC *in natura*. (A) Concentração de glicose; (B) Concentração de celobiose.



Fonte: elaborada pelo autor

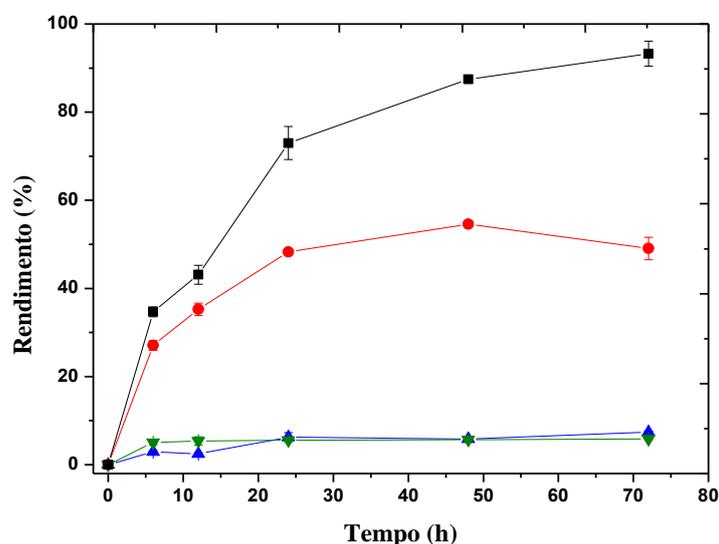
É observado na Figura 12, que a concentração dos açúcares aumentou com o passar do tempo, indicando que no início da hidrólise, existem dificuldades no acesso das enzimas ao substrato, e no decorrer da quebra das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídica das moléculas de celulose, o grau de polimerização diminui facilitando o acesso das enzimas. Na literatura, comportamentos semelhantes foram encontrados para o mesmo material (BARROS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2011), e para diferentes tipos de materiais como o bagaço da cana-de-açúcar (TIZAZU; MOHOLKAR, 2017) e palha de trigo (SMIT; HUIJGEN, 2017). Para o FC *in natura* as maiores concentrações de glicose e celobiose obtidas foram de  $0,45 \pm 0,03$  g/L e  $0,19 \pm 0,01$  g/L em 72 h, respectivamente. Valores relativamente baixos, isso devido aos percentuais elevados da composição de hemicelulose e lignina presentes no FC *in natura* (ver composição na Tabela 5), o que dificulta o acesso da enzima celulase ao polímero celulose, além do mais, as altas concentrações de sólidos dificultam a transferência de massa, diminuindo o rendimento de hidrólise.

Após 72 horas de hidrólise, os sólidos pré-tratados que apresentaram os maiores valores de concentração de glicose foi o FC-HOH ( $7,55 \pm 0,34$  g/L) e o FC-PHA ( $4,94 \pm 0,31$  g/L). Comprovando que a remoção da lignina, e a diminuição da cristalinidade da celulose, favorece o acesso da enzima celulase a celulose, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática (ALVIRA *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2017; CORREIA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2016).

A celobiose é um produto resultante da quebra da cadeia de celulose, assim como a glicose, no entanto, sua presença no hidrolisado pode acarretar inibição enzimática da celulase (CORREIA *et al.*, 2015). Na Figura 12B é observado que os hidrolisados de FC-HOH e FC-PHA possuem os maiores valores de concentração de celobiose de  $(2,70 \pm 0,10 \text{ g/L})$  e o FC-PHA  $(0,40 \text{ g/L} \pm 0,06)$ , respectivamente. Essas concentrações de celobiose podem possivelmente ter contribuído para as baixas concentrações de glicose. Nesse ensaio, o único complexo adicionado foi o da celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, que apesar de possuir a  $\beta$ -glicosidase, apresenta-se em quantidade muito baixa, que pelos ensaios realizados não foi possível detectar. Alguns estudos relataram esse fato (CORREIA *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2017). Por isso, a suplementação com a celobiase é importante para o aumento da conversão enzimática.

Na Figura 13 é mostrado os rendimentos da hidrólise enzimática dos diferentes pré-tratamentos, que foram calculados a partir das concentrações de glicose e celobiose mostradas na Figura 12A e 12B.

Figura 13 - Perfil de rendimento da hidrólise enzimática da fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos, utilizando o complexo enzimático celulase ( $15 \text{ FPU/g}_{\text{celulose}}$ ). Condição da hidrólise:  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC *in natura*.



Fonte: elaborada pelo autor

Pode ser observado na Figura 13, que os percentuais de rendimento mais baixos foram obtidos para a FC-H ( $7,4\% \pm 0,24\%$ ) e a fibra *in natura* ( $5,83\% \pm 0,24\%$ ) que apresentaram perfis de hidrólise muito semelhantes.

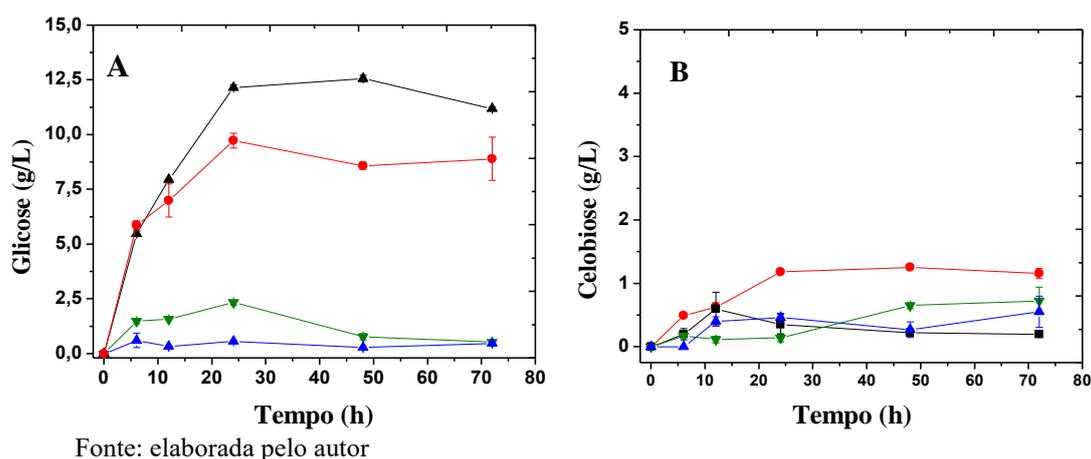
Os maiores rendimentos foram obtidos para a fibra FC-HOH ( $93\% \pm 2,83$ ) e para a fibra FC-PHA ( $49\% \pm 2,55$ ). O baixo teor de rendimento apresentado para o FC-PHA apesar de

possuir a menor quantidade de lignina deve-se também ao aumento no teor de hemicelulose, que assim como a lignina dificulta o contato da enzima celulase a celulose, como já foi citado por alguns autores (CARVALHEIRO *et al.*, 2008; CASTRO, 2010). Além disso, esse pré-tratamento apresenta um menor percentual de celulose em sua composição quando comparado ao FC-HOH, fazendo com que seja necessária uma maior quantidade de sólidos para se obter o teor de celulose padronizado para o ensaio, e uma elevada carga de sólidos dificulta a transferência de massa, diminuindo assim o rendimento do processo.

O complexo enzimático celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 é composto por algumas enzimas como, as endoglucanases,  $\beta$ -glicosidase e exoglucanases, e estas atuam de maneira sinérgica para conversão do polímero celulose em açúcares fermentáveis. No entanto, muitas vezes a  $\beta$ -glicosidase presente no complexo não é suficiente para conversão da celobiose em glicose, gerando acúmulo desse componente que funciona como inibidor e que desfavorece o rendimento da hidrólise. Diante disso, para uma melhoria da hidrólise enzimática se faz necessário a suplementação do complexo enzimático celobiase (NS 50010). A partir dos resultados obtidos (vide Figura 12) é notório que houve acúmulo de celobiose, mostrando que a  $\beta$ -glicosidase presente no complexo celulase não foi suficiente para conversão da celobiase em glicose. Logo, torna-se importante a suplementação do complexo celobiase na hidrólise enzimática dos substratos utilizados. O objetivo de estudar a hidrólise padrão I e II foi para avaliar o desempenho da enzima celulase sem a interferência da celobiase, e com a presença desse complexo.

Na Figura 14 é representado as concentrações de glicose e celobiose obtidas a partir da hidrólise padrão II, em que o ensaio experimental foi conduzido utilizando os dois complexos celulásicos, a celulase a uma carga de 15 FPU/g celulose e a celobiase com 60 CBU/g celulose.

Figura 14 - Perfil das concentrações de glicose e celobiose durante a hidrólise enzimática da fibra de caju padrão II submetida a diferentes pré-tratamentos (FC, FC-H, FC-HOH e FC-PHA), utilizando o complexo enzimático Celulase (15 FPU/g<sub>celulose</sub>) e a celobiase (60 CBU/g<sub>celulose</sub>) a 45 °C sob agitação de 150 rpm e 72 horas de hidrólise. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC *in natura*. (A) Concentração de glicose; (B) Concentração de celobiose.

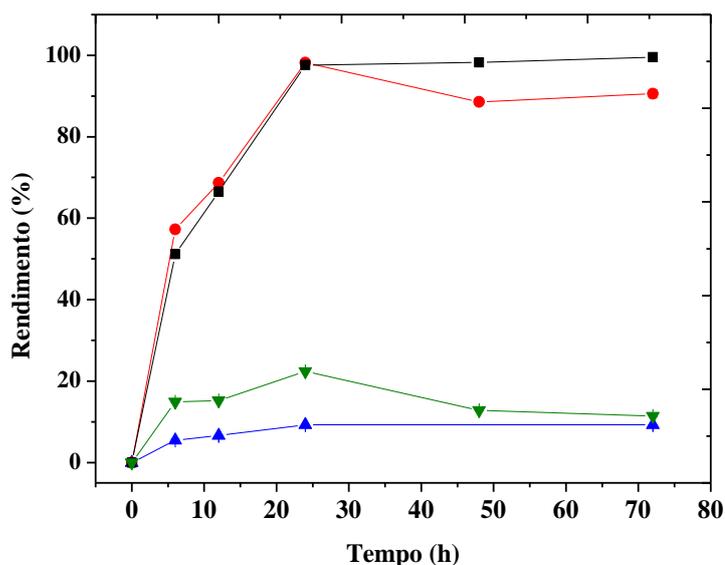


Na literatura, TENGBORG *et al.* (2001) enfatizaram que quantidades suficientes do complexo enzimático portador da enzima que converte celobiose em glicose, são de grande importância para o aumento nos rendimentos de glicose. Comportamento que pode ser observado quando se compara os resultados mostrados referentes a hidrólise padrão I e II (vide Figura 13 e Figura 14). É visto que há uma diferença significativa nas concentrações. A concentração de glicose para o substrato FC-HOH obteve um aumento de 37% (passando de 7,55 g/L para 12 g/L), já o FC-PHA obteve um aumento de 55% (passando de 4,94 g/L para 8,9 g/L). Pode-se notar que o FC *in natura* após o período de 24 horas apresentou uma queda na concentração de glicose. Na Figura 14B é visto que após 24 h do processo de hidrólise há um aumento na concentração de celobiose, que funciona como inibidor no processo.

O substrato FC-H resultou em aumento na concentração de glicose com o passar do tempo, obtendo uma concentração igual a 0,47 g/L de glicose em 72 horas de hidrólise, porém, quando comparado aos demais substratos, foi o que apresentou uma das menores concentrações de glicose, isso se deve ao seu alto percentual de lignina em sua composição (62,18%) diminuindo o acesso da enzima celulase ao polímero celulose. Além disso, o alto teor de sólidos devido ao baixo percentual de celulose (19%), faz com que seja necessária uma maior quantidade de sólidos para se obter a quantidade de celulose padronizado para o ensaio, limitando a transferência de massa, devido as baixas quantidades de líquido no meio reacional, reduzindo a capacidade de mistura e a mobilidade das enzimas.

Na Figura 15, está representado os rendimentos da hidrólise enzimática padrão II que foram obtidos a partir das concentrações de glicose e celobiose.

Figura 15 – Perfil de rendimento da hidrólise enzimática padrão II dos diferentes substratos (FC, FC-H, FC-HOH, FC-PHA), utilizando o complexo enzimático Celulase (15 FPU/g celulose) e a celobiase (60 CBU/g celulose). Condições: 45 °C, 150 rpm por 72 horas. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H; (▼) FC *in natura*.



Fonte: elaborada pelo autor

Pode ser observado na Figura 15, que foram obtidos percentuais de rendimento superiores aos encontrados sem a suplementação da celobiase. Os maiores rendimentos obtidos foram para o FC-HOH e FC-PHA, como já era de se esperar, pois possuem a menor quantidade de lignina e o maior teor de celulose em sua composição (vide Tabela 7). Quando comparados aos demais substratos, os valores de rendimento atingido pelo FC-HOH e FC-PHA foram 99% e 90%, respectivamente. Os demais substratos apesar de apresentarem conversões inferiores aos apresentados acima, também obtiveram um aumento considerável para o FC-H que foi 22% e para o FC *in natura* resultou num aumento de 47%, comparando-se os rendimentos com as hidrólises padrões I e II.

Os resultados apresentados e discutidos acima, referente a hidrólise padrão I e II, já foram fonte de estudo no Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio), utilizando a fibra de caju como material lignocelulósico por alguns autores, dentre estes BARROS *et al.*, (2017); CORREIA *et al.*, (2015) e ROCHA *et al.*, (2009). No entanto, uma análise foi necessária para o desenvolvimento do presente estudo, pois a partir dos resultados obtidos e do material hidrolisado resultante das hidrólises enzimáticas (padrão I e

II), foram realizadas diferentes estratégias de reutilização das enzimas celulolíticas presentes na hidrólise.

#### **4.5 Estratégias de Reuso Enzimático**

Como mostrado na Figura 13, após 72 horas de hidrólise (padrão I), boa parte da celulose presente nos substratos foi hidrolisada. Para o FC-HOH o rendimento obtido foi de  $93\% \pm 2,8\%$ , para o FC-PHA  $49\% \pm 2,5\%$ , já o rendimento obtido para o FC-H foi de  $7,4\% \pm 0,24\%$  e para o FC *in natura* foi de  $5,83\% \pm 0,23\%$ . De acordo, com os estudos de adsorção realizados (vide Figura 9 e 10) é observado que uma parte da celulase se adsorve ao substrato lignocelulósico e que muito dessa enzima também se mantém livre em solução. Com o intuito de maximizar o uso da celulase ligada/adsorvida ao substrato residual e solúvel na suspensão, realizou-se estratégias de reuso enzimático.

##### **4.5.1 Reuso da celulase adsorvida ao sólido de hidrólise, variando-se a quantidade do sólido residual.**

A estratégia de reuso I foi realizada com o sólido residual da hidrólise padrão I (método 3.4.1), variando-se a quantidade deste material na hidrólise subsequente em diferentes proporções. Após a hidrólise inicial, foi obtido a partir da quantificação de proteínas a quantidade de enzimas retida no sólido residual, para o substrato FC-H, 9,74 FPU/ g celulose ficou retida no sólido residual, para o FC-HOH ficou retido 13,10 FPU/ g celulose, e para o FC-PHA 10,57 FPU/ g celulose, essas cargas enzimáticas retidas foram as reutilizadas para as hidrólises subsequentes. Pode ser observado que os resultados mostraram economias interessantes, o que pode tornar esse tipo de estratégia atraente a nível industrial.

Na Tabela 9 pode ser observado o quanto da enzima celulase se adsorveu ao sólido após a primeira hidrólise enzimática (hidrólise padrão I), esse sólido residual, resultante da hidrólise inicial foi utilizado para o primeiro reuso de hidrólise.

Tabela 9- Carga enzimática aderida ao sólido residual após a hidrólise padrão I e valores economizados por tonelada de celulose hidrolisada.

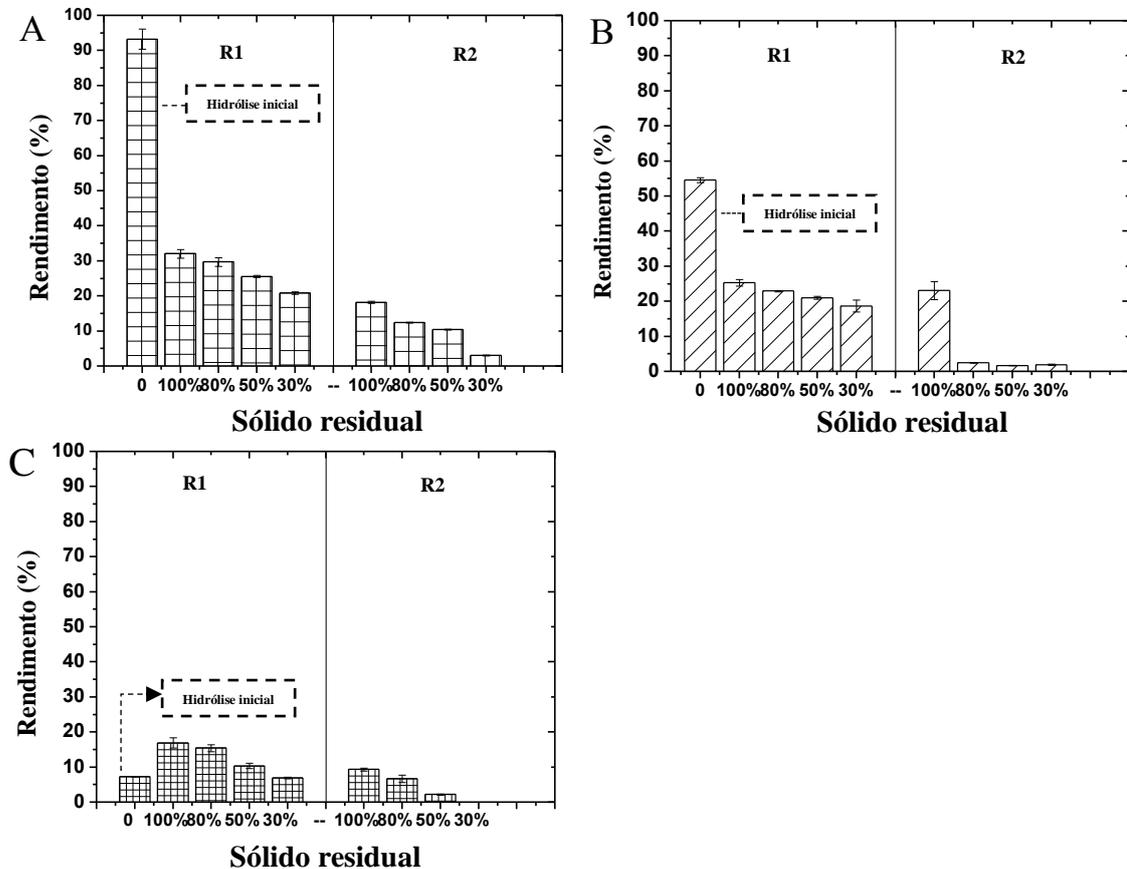
<i>Substrato</i>	<i>Carga inicial (FPU/ g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada de celulose hidrolisado (15 FPU/ g celulose)</i>	<i>Carga adsorvida no sólido residual (FPU/ g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada de celulose hidrolisada para carga adsorvida no sólido residual</i>
FC-H	15	2.200.000	9,74	1.420.000
FC-HOH	15	2.200.000	13,10	2.000.000
FC-PHA	15	2.200.000	10,57	1.560.000

Fonte: elaborada pelo autor

Na Tabela 9 é apresentado o quanto de carga enzimática ficou adsorvido ao sólido residual após a primeira hidrólise enzimática (padrão I), ou seja, o quanto de carga enzimática foi levado para a primeira reutilização enzimática (R1). Assim como mostrado nos resultados obtidos a partir dos estudos de adsorção, (tópico 4.3.1 e 4.3.2) é visto que o substrato FC-HOH conseguiu reter uma maior quantidade de enzimas, quando comparado aos demais substratos, conseguindo reter 87,33% da carga adicionada inicialmente (15 FPU/ g celulose), tendo uma economia por tonelada de celulose hidrolisada igual a R\$ 2.000.000,000, cerca de 91% do valor gasto inicialmente (vide Tabela 9). Já o FC-PHA e FC-H conseguiram reter 74,46% e 64,93% respectivamente de enzimas celulasas, obtendo economias inferiores ao FC-HOH, no entanto, ainda muito vantajosas.

Na Figura 16 pode ser observado os rendimentos de hidrólise, que foram obtidos a partir da reutilização do sólido hidrolisado dos diferentes substratos (FC-HOH; FC-PHA e FC-H) em contato com o substrato fresco adicionado a reação de hidrólise.

Figura 16 - Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual utilizando fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos. Condições: 45 °C, 150 rpm por 72 horas. (A) FC-HOH; (B) FC-PHA; (C) FC-H.



Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados apresentados na Figura 16, mostram que quanto maior o percentual do sólido residual for utilizado na hidrólise subsequente, mais altos são os rendimentos de hidrólise. No primeiro reuso, utilizando 100% do substrato FC-HOH em contato com o substrato fresco, foi obtido  $32,06\% \pm 1,22\%$  de rendimento, tendo uma recuperação de 87,33% da enzima adicionada inicialmente no processo (15 FPU/ g celulose); para 80% do sólido residual, o rendimento foi de  $29,73\% \pm 1,24$ ; usando 50%, o rendimento foi igual a  $25,58\% \pm 0,31\%$ , e com apenas 30% de substrato fresco, o resultado obtido foi de  $20,81\% \pm 0,35\%$ . Pelos valores apresentados é notório que quanto maior a quantidade de sólido residual presente na mistura, mais enzimas estão sendo adicionadas na suspensão da hidrólise subsequente, implicando num maior rendimento de hidrólise enzimática.

Para o segundo reuso (vide Figura 16A), houve uma diminuição na capacidade de recuperar a celulase para prosseguir a hidrólise. Por exemplo, o rendimento do primeiro reuso foi de  $32,06\% \pm 1,22\%$ ; para o segundo reuso o valor encontrado foi igual a  $18,20\% \pm 0,33\%$ ,

para 100% de sólido residual presente em solução, ou seja, uma diminuição no percentual de 43,23% foi observada. Quando foi utilizado 30% do sólido residual para o segundo reuso o rendimento observado foi de  $3,08\% \pm 0,11\%$ , havendo uma queda de 90,4%.

A adsorção da celulase no substrato é o primeiro passo para que ocorra a hidrólise do material (QI *et al.*, 2011). De acordo com os resultados apresentados, observa-se que as enzimas adsorvidas ao sólido residual, podem ser recuperadas por simples contato desse sólido com o substrato fresco, pois não foi adicionado novo extrato enzimático ao longo dos ciclos de hidrólise (R1 e R2).

O substrato pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, representados na Figura 16B, resultou em um comportamento semelhante ao substrato ácido seguido de álcali (FC-HOH), em que quanto maior o percentual de substrato não hidrolisado presente na mistura, maior foi o rendimento encontrado, e a cada novo reuso, menores os rendimentos obtidos. No entanto, observa-se que para o substrato FC-PHA foram encontrados rendimentos menores, e uma menor recuperação enzimática quando comparado ao FC-HOH.

No primeiro reuso, utilizando o FC-PHA o maior rendimento foi para o ensaio utilizando 100% do sólido residual com um valor de  $25,27\% \pm 0,92\%$ , quando comparado a hidrólise inicial ocorreu uma queda de 46% no rendimento, e houve uma recuperação enzimática de 70,47%. Já no segundo reuso, esse valor de rendimento passou para  $23,07\% \pm 2,56\%$ , apresentando um valor semelhante ao encontrado no primeiro reuso. Os demais mostraram valores bem inferiores, com quedas maiores no percentual de rendimento, como é o caso do ensaio com 30% do sólido residual, que passou de 18,25% para 1,87% mostrando uma queda de 89% de um reuso para o outro.

Na Figura 16c tem-se os valores encontrados para o substrato pré-tratado com ácido diluído, o qual apresentou baixos valores de rendimento. Isso pode ser atribuído a quantidade de lignina apresentada em sua composição, pela interferência que este constituinte tem na hidrólise enzimática já citado anteriormente. Superior ao valor da primeira hidrólise, no primeiro reuso, o maior rendimento encontrado foi para 100% do substrato não hidrolisado em contato com o substrato fresco, resultando em  $16,89\% \pm 1,47\%$  de rendimento, e para o segundo reuso foi obtido um valor de  $9,32\% \pm 0,44\%$ , uma diminuição de 45,18% entre os ciclos de hidrólise. Esse comportamento pode ser explicado pelos ataques enzimáticos sofridos pelo substrato na primeira hidrólise, que podem ter realizado modificações na estrutura do material, auxiliando assim a acessibilidade das enzimas a celulose para o próximo processo de hidrólise, e conseqüentemente ter aumentado os rendimentos.

Comparando-se os substratos pré-tratados mostrados anteriormente, foi observado que quanto maior o percentual de substrato não hidrolisado, maior o rendimento obtido nas hidrólises enzimáticas. O substrato FC-H foi o que apresentou os menores percentuais de rendimento, quando comparado aos demais substratos. Para o primeiro reuso, o valor encontrado foi de  $16,89\% \pm 1,47\%$  e no segundo reuso o valor encontrado foi de  $9,32\% \pm 0,44\%$ , quando utilizado 100% do sólido residual nos ensaios.

Pelos resultados apresentados é constatado que as enzimas celulásicas permanecem relativamente ativas para um reuso de hidrólise embora ocorra uma diminuição para o segundo reuso. Contudo, ainda assim reduz a necessidade de adição de enzima fresca durante os processos de bioconversão. O acúmulo de lignina no processo resulta numa diminuição dos percentuais quando comparado ao reuso anterior, dificultando o contato da enzima com a celulase. Além disso, pode ter ocorrido inibição por produtos gerados durante a reação, como a celobiose, e a enzima pode ter se desnaturado devido aos ciclos sucessivos de hidrólise e pelas condições operacionais. Comportamentos semelhantes foram encontrados por QI *et al.* (2011) e TU *et al.* (2007). A partir da Figura 16 também pode ser constatado que a quantidade de enzima recuperada está atrelada ao rendimento de hidrólise obtido, o substrato (FC-HOH) que conseguiu uma maior recuperação de enzimas, foi o que obteve o maior rendimento de hidrólise enzimática.

De acordo com os valores obtidos, para todos os pré-tratamentos estudados, conclui-se que as maiores taxas de rendimento encontradas foi quando se utilizou 100% do sólido residual, que foram utilizados nas hidrólises subsequentes, pois quanto maior o percentual de resíduo da hidrólise anterior presente em solução, maior a quantidade de enzima que está sendo levada para o meio reacional. Diante disso, esse percentual de sólido residual foi utilizado para as estratégias III e V.

#### ***4.5.2 Diferentes estratégias de recuperação e reuso enzimático (II, III, IV e V)***

Como foi mostrado ao longo dos resultados já mencionados, após o período de 72 horas de hidrólise, uma quantidade da enzima permanece livre em solução enquanto o maior percentual se adsorve ao substrato lignocelulósico. Para maximizar a recuperação da celulase, ambas as enzimas, presentes em solução e ligadas ao sólido residual foram reaproveitados na hidrólise subsequente por meio das estratégias (II a V). Para realização das estratégias foi utilizada a hidrólise padrão II descrita no item 3.5.1.

Na Tabela 10, pode ser observado o quanto de carga enzimática ficou adsorvida na fibra de caju e o quanto se manteve livre em solução submetida aos diferentes pré-tratamentos (FC-HOH; FC-H e FC-PHA), após a primeira hidrólise (padrão II), essas cargas adsorvidas na fibra foram as utilizadas para o primeiro reuso de hidrólise nas estratégias que se seguem (II a V).

Tabela 10- Enzimas retidas ao sólido residual e livres em solução após a hidrólise padrão II e valores economizados para cada tonelada de celulose hidrolisada referente ao primeiro reuso enzimático das estratégias II, III, IV e V.

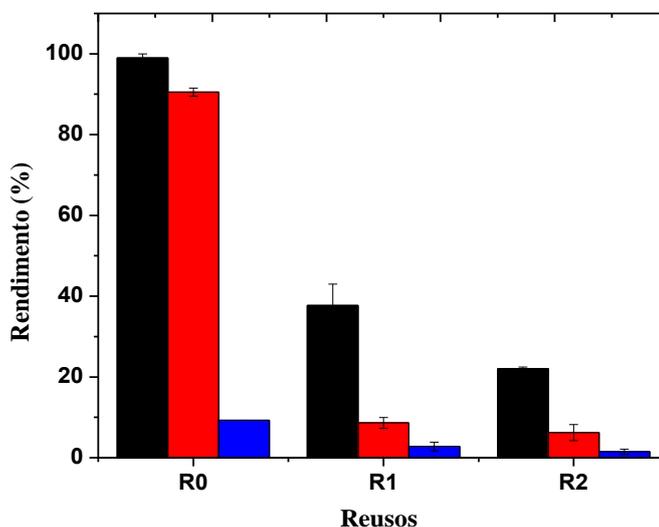
<i>Substrato</i>	<i>Carga usada inicialmente (FPU/ g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada de celulose hidrolisada (15 FPU/ g celulose)</i>	<i>Adsorvida a fibra de caju (FPU/ g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada de celulose adsorvida na fibra</i>	<i>Livre em solução (FPU/ g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada referente a enzima livre</i>
FC-H	15	2.200.000	12,41	1.840.000	2,59	367.000
FC-HOH	15	2.200.000	14,89	2.140.000	0,14	14.000
FC-PHA	15	2.200.000	14,25	1.980.000	0,75	113.000

Fonte: elaborada pelo autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10, foi possível observar que a maior parte da carga enzimática fica retida ao sólido residual, para todos os substratos estudados, porém, o FC-HOH adsorveu a maior quantidade dentre os substratos estudados, a carga de 14,89 FPU/ g celulose ficou associada ao sólido residual, comprovando os resultados obtidos no estudo de adsorção (vide Figuras 9 e 10), em que foi visto que o material pré-tratado com ácido seguido de álcali (FC-HOH) conseguia adsorver uma maior quantidade de celulase por massa de substrato.

Na Figura 17 é exposto os resultados da segunda estratégia de reuso, em que foi reutilizado o líquido hidrolisado, sem suplementação enzimática, levando em consideração que a celobiase adicionada inicialmente continuaria em solução após o período de 72 horas. A partir dos resultados obtidos no estudo de adsorção (vide Figura 10) constatou-se que pouca quantidade da enzima celobiase se adsorve ao substrato lignocelulósico. Em seguida, o substrato fresco foi adicionado, o primeiro reuso foi realizado por um período de 72 horas e em seguida o segundo reuso.

Figura 17 - Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com adição do substrato fresco, sem suplementação enzimática. (Estratégia II). Condições: 45 °C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H.



Fonte: elaborado pelo autor

Na Figura 17, é observado que as enzimas presentes no líquido foram capazes de hidrolisar o substrato fresco, mesmo que a maior quantidade de enzimas tenha sido adsorvida ao sólido hidrolisado, como pode ser visto na Tabela 10. Os maiores rendimentos encontrados, foram para o substrato FC-HOH, tendo rendimentos no primeiro reuso igual a  $37,7\% \pm 2,54\%$ , no segundo reuso um valor de  $22\% \pm 0,50\%$ .

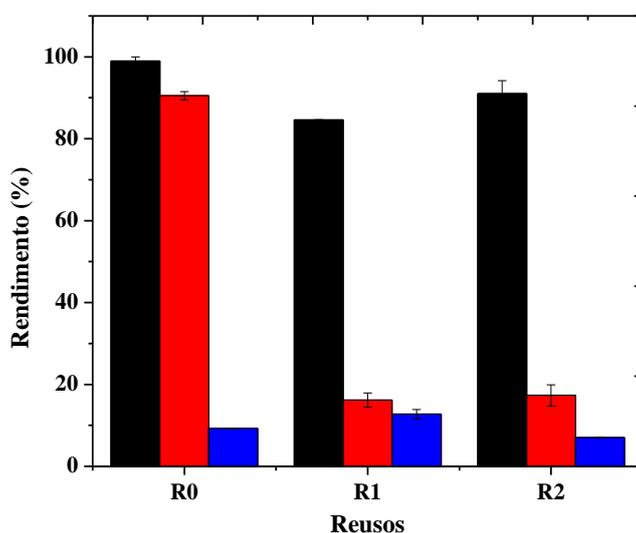
Para o FC-PHA os valores de rendimento foram de  $8,6\% \pm 1,34\%$  e  $6,2\% \pm 1,99\%$  para o primeiro e segundo reuso, respectivamente e houve uma recuperação enzimática de 0,75 FPU/g celulose para o primeiro reuso. Esses baixos valores de rendimento de hidrólise podem ser explicados devido ao baixo teor de celulase que se mantém livre em solução. Além disso, o teor de hemicelulose presente nesse substrato (FC-PHA) influência de maneira negativa no acesso da enzima a celulase, o que também contribui para os baixos valores de rendimento. Outro ponto a destacar é a produção do açúcar xilose e alguns oligômeros que são liberados pela hemicelulose, QING *et al.*, (2010) realizaram um estudo e foi constatado que esses oligômeros inibem fortemente a ação das enzimas celulases durante o processo de hidrólise enzimática. Essa ação de inibição da enzima celulase afeta diretamente o rendimento de hidrólise do substrato pré-tratado com FC-PHA pois é o que possui a maior quantidade de hemicelulose em sua composição.

Para o FC-H os rendimentos foram os mais baixos, sendo iguais a  $2,78\% \pm 1,08\%$  para o primeiro reuso e  $1,50\% \pm 0,65\%$  no segundo reuso, assim como tem sido mostrado em todas

as hidrólises realizadas. Para esse substrato, em média 20% da enzima adicionada inicialmente se mantém livre em solução. Além disso, esse material possui o maior teor de lignina (62% m/m) dificultando ainda mais a conversão da celulose em açúcares.

Com o intuito de melhorar os rendimentos mostrados na estratégia II, foi realizada uma suplementação apenas com a enzima celulase baseando-se na quantidade de proteínas que ainda estava presente no líquido, em seguida o substrato fresco foi adicionado e o primeiro reuso foi realizado, e após 72 horas o segundo reuso, a estratégia ficou definida como estratégia IV. Os resultados podem ser vistos na Figura 18.

Figura 18 - Reuso da celulase e celobiase presente no líquido hidrolisado com adição do substrato fresco e suplementação enzimática da celulase (Estratégia IV). Condições: 45 °C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H.



Fonte: elaborado pelo autor

Na Figura 18, pode ser observado que os maiores percentuais de rendimento foram para o substrato ácido seguido de álcali (FC-HOH), que pode ser explicado pelo maior teor de celulose presente nesse substrato, fazendo com que seja necessária uma menor quantidade de sólidos para se obter a quantidade de celulose padronizada para os ensaios, tendo assim uma baixa quantidade de sólidos o que provoca uma transferência de massa mais eficiente, aumentando o rendimento do processo.

RAMOS *et al.* (1993) realizou um estudo do reuso enzimático da celulase de *Trichoderma* utilizando como matéria prima *Eucalyptus viminalis* pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino e analisou a influência da acumulação de açúcar nos rendimentos de hidrólise. A partir dos resultados obtidos as taxas mais baixas de hidrólise foram observadas quando altas concentrações de açúcar estavam acumuladas na mistura de reação de hidrólise.

Comparando-se as estratégias II e IV, resultados mostrados nas Figuras 17 e 18, é observado que os maiores rendimentos foram obtidos quando houve a suplementação da celulase no líquido hidrolisado, o que era esperado, pois no meio reacional teria uma maior quantidade de enzimas, quando comparado ao que não foi efetuada a suplementação. Analisando a Figura 17 é visto que o rendimento alcançado no primeiro reuso pelo FC-HOH foi de 37,7 % e quando há suplementação (Figura 18) o resultado obtido foi de 84,6 % houve um aumento de 55 % na eficiência entre as estratégias.

Para o substrato FC-PHA o valor do rendimento de hidrólise sem a suplementação da enzima celulase foi de 8,6 % (vide Figura 17), no primeiro reuso e quando o meio foi suplementado o rendimento obtido foi de 16,17 %, um aumento na eficiência da hidrólise superior a 46 %. Para esse substrato a economia no percentual de enzima foi de 5 %, pois livre em solução havia 0,75 FPU/ g de celulose, sendo a carga inicial de 15 FPU/ g celulose.

Já para o substrato ácido (FC-H) o rendimento encontrado para o primeiro reuso de hidrólise (com suplementação) foi de 12,7 % e quando não houve suplementação o valor encontrado foi de 2,7 %, uma queda no rendimento igual a 78 %. Para esse substrato houve uma economia de 17 % na quantidade de enzima necessária para o ensaio (15 FPU/g celulose).

Como pode ser observado na Tabela 9, a maior quantidade das enzimas se adsorve ao sólido residual, ficando uma menor quantidade livre em solução, diante disso foi realizado as estratégias de reuso III e V, que foram conduzidas usando a melhor condição obtida na estratégia I, em que 100% do sólido residual presente na mistura de reação obteve o maior rendimento de hidrólise. Para essa estratégia III, o reuso enzimático foi realizado a partir da hidrólise padrão II, e foi adicionado apenas o extrato celobiase usando uma carga de 60 CBU/ g celulose, considerando que toda a celobiase fica livre em solução após o processo de hidrólise.

Na Tabela 11 pode-se observar as cargas enzimáticas presentes no sólido residual antes da realização do segundo reuso enzimático.

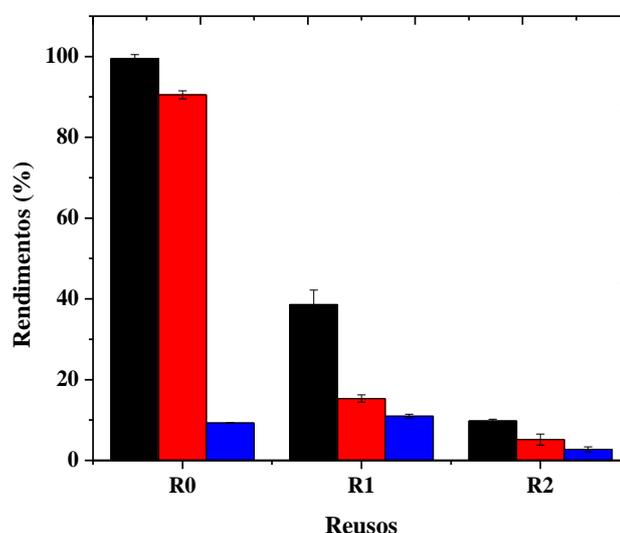
Tabela 11- Cargas enzimáticas utilizadas para o segundo reuso e valores economizados no reuso enzimático realizados na estratégia III.

<i>Substrato</i>	<i>Carga inicial presente no sólido residual R1 (FPU/g celulose)</i>	<i>R\$ por tonelada de celulose hidrolisada</i>	<i>Carga presente no sólido residual R2 (FPU/g celulose)</i>	<i>R\$ tonelada de celulose hidrolisada no R2</i>
<b>FC-H</b>	12,41	1.840.000	3,46	560.000
<b>FC- HOH</b>	14,86	2.140.000	13,02	1.880.000
<b>FC-PHA</b>	14,25	1.980.000	12,39	1.840.000

Fonte: elaborada pelo autor

Na Tabela 11 nota-se que a carga associada a fibra de caju para o segundo reuso foi menor que a utilizada no primeiro, uma causa possível dessa menor carga enzimática no segundo reuso deve ter ocorrido devido a desnaturação enzimática ao longo dos ciclos de hidrólise. Na Figura 19 é visto que essa diminuição da carga enzimática resultou num menor rendimento de hidrólise para o segundo reuso. Outro fator para esse menor rendimento é devido ao acúmulo de lignina e hemicelulose, como citado na Tabela 12, a cada novo reuso é observado que foi alcançado um menor rendimento, que pode ser explicado pela alta concentração de sólidos e acúmulo de lignina e hemicelulose que impedem processo difusivo. Além disso, em cada novo reuso pode ter ocorrido desnaturação da enzima celulase, impactando na hidrólise do material.

Figura 19 - Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, adicionando o substrato fresco e celobiase (60 CBU/ g celulose) (Estratégia III). Condições: 45 °C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-OH; (■) FC-PHA; (■) FC-H.



Fonte: elaborado pelo autor

A Tabela 12 mostra as quantidades em gramas, de celulose, hemicelulose e lignina em cada ciclo de hidrólise enzimática.

Tabela 12- Quantidades de celulose, hemicelulose e lignina obtidos no reuso do substrato hidrolisado com adição da celobiase (Estratégia III).

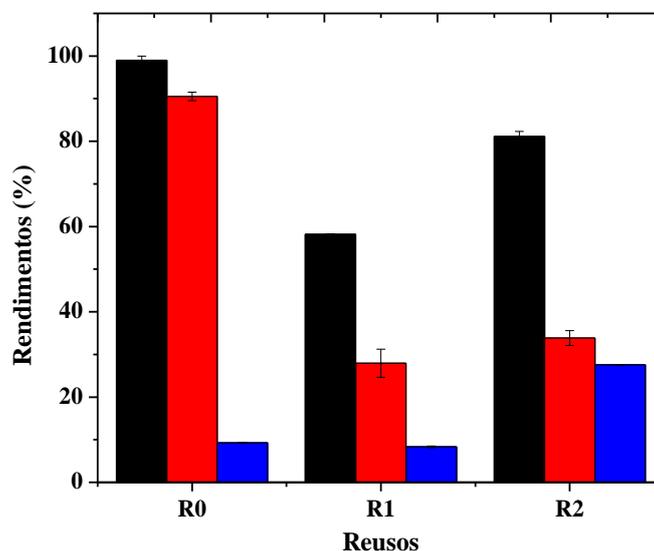
<i>Substrato</i>	<i>Reuso</i>	<i>Celulose (g)</i>	<i>Hemicelulose (g)</i>	<i>Lignina (g)</i>	<i>Rendimento hidrólise (%)</i>
FC-H	0	1,00	0,28	3,26	9
	1	1,90	0,56	6,52	11
	2	4,23	0,84	9,78	2,7
FC-HOH	0	1,00	0,08	0,12	99
	1	1,01	0,16	0,24	38
	2	1,63	0,23	0,36	9
FC-PHA	0	1,00	0,41	0,07	90
	1	1,10	0,82	0,13	15
	2	1,95	1,23	0,19	5

Fonte: elaborada pelo autor

Na Tabela 12 nota-se que o teor de lignina e hemicelulose em cada ciclo de hidrólise aumenta com o aumento da concentração do substrato, e que a acumulação de lignina no substrato foi maior para o pré-tratamento ácido do que para os demais pré-tratamentos, pois em sua composição o maior percentual existente é o de lignina, polímero que não é hidrolisado durante a hidrólise enzimática, e conseqüentemente se acumula, o que explica a diferença substancial nos rendimentos de hidrólise. É visto também que o maior teor de hemicelulose está presente no FC-PHA que apesar de possuir um teor de lignina inferior ao FC-HOH alcançou valores mais baixos de rendimento quando comparado ao substrato tratado com ácido – álcali (FC-HOH), evidenciando assim que o acúmulo de hemicelulose, e dos oligômeros como a xilose que são liberados pela hemicelulose durante o processo de hidrólise, inibem a celulase, diminuindo portanto o rendimento de hidrólise.

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos a partir da estratégia V, na qual houve adição da celobiase (60 CBU/ g celulose) e suplementação da celulase, que foi calculada a partir dos resultados apresentados na Tabela 9, visando uma melhoria nos rendimentos do reuso enzimático da estratégia III.

Figura 20 - Reuso da celulase adsorvida ao sólido residual, utilizando suplementação da enzima celulase e adição da celobiase 60 CBU/ g celulose (Estratégia V). Condições: 45 °C, 150 rpm e 72 h. (■) FC-HOH; (■) FC-PHA; (■) FC-H.



Fonte: elaborado pelo autor

Sabe-se que a maior parte da enzima fica retida no sólido hidrolisado, durante o primeiro reuso da hidrólise foi calculado que para o substrato FC-HOH mais de 98,6% (14,8 FPU/ g celulose) da enzima ficou retida ao substrato hidrolisado, para o FC-PHA o percentual de enzima retida no substrato hidrolisado foi igual a 95% (14,25 FPU/g celulose) e para o FC-H cerca de 83% (12,41 FPU/ g celulose) da enzima se manteve adsorvida ao substrato sólido. Em todos os substratos hidrolisados houve a necessidade de uma pequena quantidade de suplementação enzimática da enzima celulase para se obter a carga enzimática de 15 FPU/ g celulose em todos os substratos pré-tratados.

Na Figura 20 pode ser visto que há um aumento do rendimento do segundo reuso em relação ao primeiro o que pode estar associado a suplementação da enzima celulase. Segundo XUE et al. (2012) e ERIKSSON et al. (2002) adicionar celulases frescas pode “reiniciar” a hidrólise retardada devido à falta de enzimas ativas disponíveis. Para reutilização da enzima com o substrato sólido, estratégias III e V, foi analisado que o substrato que apresentou a maior recuperação enzimática foi o FC-HOH pois possuía a maior quantidade de enzima retida no substrato com os maiores valores de rendimento de hidrólise nas duas estratégias de reuso, além do mais, quando houve suplementação da enzima celulase os rendimentos foram bem superiores.

A Tabela 13 mostra os valores em gramas de celulose, hemicelulose e lignina para cada reuso feito para a estratégia V.

Tabela 13- Quantidades de celulose, hemicelulose e lignina obtidos no reuso do substrato hidrolisado com suplementação da celulase e adição da celobiase.

<i>Substrato</i>	<i>Reusos</i>	<i>Celulose</i> (g)	<i>Hemicelulose</i> (g)	<i>Lignina</i> (g)	<i>Rendimento</i> <i>hidrólise (%)</i>
FC-H	0	1	0,28	3,26	9
	1	1,9	0,56	6,52	8
	2	3,6	0,84	9,78	27
FC-HOH	0	1,00	0,08	0,12	99
	1	1,01	0,16	0,24	58
	2	1,43	0,23	0,36	81
FC-PHA	0	1,00	0,41	0,07	90
	1	1,10	0,82	0,13	28
	2	1,9	1,23	0,193	34

Fonte: elaborada pelo autor

Quando se compara a estratégia II com a estratégia III (Figura 17 e 19, respectivamente) é observado que maiores rendimentos foram alcançados no reuso do sólido hidrolisado do que do líquido, isso por que a maior quantidade de celulase fica retida no sólido, no entanto para a estratégia III não é possível a reutilização da enzima celobiase, já que o maior percentual da enzima se mantém livre em solução, como foi observado no estudo cinético da enzima celobiase (vide Figura 11). Na estratégia II foi possível reutilizar um baixo percentual da enzima celulase, porém foi reutilizada toda a celobiase presente no líquido hidrolisado, mas menores rendimentos de hidrólise enzimática foram encontrados, o que pode ser explicado devido as altas concentrações de açúcares da hidrólise anterior, inibindo o novo ciclo de hidrólise (XUE *et al.*, 2012). Referente as economias realizadas, com o substrato que apresentou os melhores rendimentos de hidrólise, na estratégia II para o FC-HOH foi economizado com a reutilização da celobiase um valor igual a R\$ 1.660.000,000 utilizando como base de cálculos 60 CBU/ g celulose (carga adicionada inicialmente), e para a enzima celulase o valor economizado foi de R\$ 14.000,000, utilizando os valores tabelados (vide Tabela 10), já na estratégia III o valor economizado foi de 2.140.000,000 de acordo com a carga de enzima celulase que se manteve adsorvida a fibra após o processo de hidrólise. O que torna a estratégia III mais viável economicamente e foi a que obteve os melhores rendimentos, tornando-se uma estratégia mais atrativa quando se compara essas duas estratégias.

Na Tabela 13 encontra-se a composição dos substratos usados na estratégia V em que houve suplementação da celulase durante o reuso, é visto que os valores de rendimento alcançados foram inferiores aos obtidos quando ocorre a suplementação da celulase, o mesmo comportamento ocorrido na estratégia III ocorreu na estratégia V, em que quanto maior as

concentrações do substrato maior a quantidade de hemicelulose e lignina presentes na reação de hidrólise.

De acordo com as estratégias mostradas, foi visto que as estratégias III e V conseguiram recuperar uma maior quantidade de enzimas, obtiveram os maiores rendimentos quando comparadas as estratégias II e IV, além disso, conseguiram obter uma maior economia.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que o tipo de pré-tratamento e a composição química do material lignocelulósico são fatores críticos para o desempenho da hidrólise enzimática. Além disso, foi possível reutilizar uma quantidade substancial de celulase durante a hidrólise enzimática da fibra de caju submetida aos diferentes pré-tratamentos, foi possível também a reutilização da enzima celobiase. Além disso, foi constatado que utilizando 100% do sólido residual na mistura, foram obtidos maiores valores de rendimento da hidrólise enzimática.

O substrato que apresentou a melhor recuperação enzimática e as melhores taxas de rendimento foi o ácido seguido de álcali (FC-HOH) em todas as estratégias de reuso. As estratégias que reutilizaram o sólido residual conseguiram obter maiores taxas de recuperação enzimática, e menores custos no processo. Porém, os rendimentos no processo de reuso tornam-se mais atrativos quando há suplementação enzimática. Logo, conclui-se que as estratégias desempenhadas ao longo dessa pesquisa podem ser úteis para redução dos custos no processo de hidrólise enzimática.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. F. **Adsorção de compostos sulfurados do gás natural por diferentes adsorventes e dessorção utilizando co2 supercrítico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica- RJ. 2016.
- AGBOGBO, F., WENGER, K. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 723–727, 2007
- ALBUQUERQUE, T. L. DE; GOMES, S. D. L.; MARQUES, J. E.; SILVA, I. J. DA; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, v. 255, p. 33–40, 2015.
- ALMEIDA, A. M. DE. **Estudo numérico de colunas de adsorção de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Do Paraná. Curitiba - PR , 2013
- ALVIRA, P. *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- AZADFAR, M. Número de onda e diferentes atribuições para as principais bandas no IR das ligninas. *International Journal of Biological. Macromolecules*, v.75, p. 58–66, 2015
- BARROS, E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 307, p. 939–947, 2017.
- BEGUIN, J.-P. A. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 13, p. 25–58, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976
- CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.
- CARNEIRO, F. A, C. **Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas**. Dissertação (Mestrado em tecnologia de fabricações). Escola de Engenharia Textil. Portugal. 2003.

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

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

CLAUDINO, A. **Preparação de carvão ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

COCINERO, E. J. *et al.* The building blocks of cellulose: The intrinsic conformational structures of cellobiose, its epimer, lactose, and their singly hydrated complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 31, p. 11117–11123, 2009.

CONAB disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_02\\_09\\_14\\_35\\_39\\_cajucultura\\_no\\_ceara\\_-\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_09_14_35_39_cajucultura_no_ceara_-_2017.pdf)> Acesso dia 16/10/17.

CORREIA, C.; SOUZA, W. DE; SANT, C.; BRIENZO, M. Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. March 2017, p. 193–200, 2018.

CORREIA, J. A. DA C. **Produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino utilizando o processo de sacarificação e fermentação simultânea: avaliação de configurações e parâmetros**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2017.

CORREIA, J. A. DA C.; JÚNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 249–256, 2013.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270–274, 2012.

DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. E. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology**, 1984. v. 6, n. 8, p. 338–340.

DING, Z. *et al.* Immobilization of cellulase onto a recyclable thermo-responsive polymer as bioconjugate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 39–45, 2016.

DU, R. *et al.* Cellulase Recycling after High-Solids Simultaneous Saccharification and Fermentation of Combined Pretreated Corncob. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2014.

EMBRAPA Disponível em:

<[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=7705&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=10308](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7705&p_r_p_-996514994_topicoId=10308)> Acesso dia 19/10/2017.

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

FENILA, F., SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. S96–S104, 2016.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Da; SILVA, F. De C. Da. Potencialidades e oportunidades na Química da sacarose e outros açúcares. **Química nova**, v. 34, n. 5, p. 879–883, 2009.

FIGUEIREDO, E. V. C. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

FREITAS, M.F.M. **Produção de Lipases por leveduras isoladas do bagaço de caju utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2017.

GOMES, D.; DOMINGUES, L.; GAMA, M. Bioresource Technology Valorizing recycled paper sludge by a bioethanol production process with cellulase recycling. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 637–644, 2016.

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

HAQUE, M. A.; BARMAN, D. N.; KANG, T. H.; KIM, M. K.; KIM, J.; KIM, H.; YUN, H. D. Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time. **Biosystems Engineering**, v. 114, n. 3, p. 294–305, 2013.

HARUN, R. *et al.* Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464–3467, 2011.

JOHAN, B.; PETERSON, R.; TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly ( ethylene glycol ) addition. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, p. 754–762, 2007.

KARAGÖZ, P. *et al.* Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 349–357, 2012.

KIM, S. *et al.* Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 229–233, 2012.

LI, J. *et al.* One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 171–178, 2014.

- LIU, C. P. *et al.* Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 3, p. 171–179, 2013.
- MADHAVAN, A. *et al.* Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, 2017.
- MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of Cleaner Production**, v. 145, p. 114–133, 2017.
- MENYA, E. *et al.* Production and performance of activated carbon from rice husks for removal of natural organic matter from water: A review. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 129, p. 271–296, 2017.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.
- OGEDA, T. L. **Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 110, 2011.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. F. Hidrólise Enzimática De Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OMACHI, I. H. *et al.* Biomassa F Lorestal Para Exportação : O Caso. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 1, p. 29–36, 2004.
- OUYANG, J. *et al.* Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 288–293, 2013.
- PALONEN, H. *et al.* Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65–72, 2004.
- PAUL, S.; DUTTA, A. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 130, n. November 2017, p. 164–174, 2018.
- PIHLAJANIEMI, V. *et al.* Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw : Comparison of solids-recycling, sequential hydrolysis and batch hydrolysis. **bioresource technology**, v. 153, p. 15–22, 2014.
- QI, B. *et al.* Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2881–2889, 2011.
- QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9624–9630, 2010.
- RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 1, p. 19–25, 1993.

REIS, C. L. B. *et al.* Bioresource Technology Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids : Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. v. 224, p. 694–701, 2017.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1–3, p. 407–417, 2017.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 526–533, 2012.

RODRIGUES, T. H. S. **Estudo do pré-tratamento alcalino em microondas da fibra do caju (*Anacardium Occidentale L.*) Seguido de hidrólise enzimática para produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2010.

SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. S96–S104, 2016.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 528–532, 2007.

SANTOS, C. C. *et al.* Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. March 2017, p. 193–200, 2018.

SANTOS, J. C. S. DOS. **Otimização de biocatalisadores: Desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2015

SELIG, M. J. *et al.* The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1–3, p. 397–406, 2009.

SERPA, J. DE F. **Produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2016.

SINGHVI, M. S.; ADSUL, M. G.; GOKHALE, D. V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6569–6572, 2011.

SMIT, A. T.; HUIJGEN, W. J. J. The promotional effect of water-soluble extractives on the enzymatic cellulose hydrolysis of pretreated wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 994–999, 2017.

SOUZA, T. C. DE *et al.* Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69, 2016.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. June 2016, p. 0–1, 2017.

SUN, J. X. *et al.* Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

SUN, S. *et al.* The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

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

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood. **Biotechnol**, p. 110–117, 2001.

TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Dilute Acid Hydrolysis of Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 250, n. October 2017, p. 197–203, 2017.

TU, M.; ZHANG, X.; PAICE, M.; MACFARLANE, P.; SADDLER, J. N. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6407–6415, 2009.

TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the Distribution of Cellulases and the Recycling of Free Cellulases during the Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates. **Biotechnol**, p. 398–406, 2007.

ROCHA, M. V. P ; RODRIGUES, T. H. S. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Microbiol. Biotechnol**, p. 1099–1107, 2011.

WANG, Q. *et al.* Recycling cellulase towards industrial application of enzyme treatment on hardwood kraft-based dissolving pulp. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 160–163, 2016.

XUE, Y.; JAMEEL, H.; PARK, S. Strategies to recycle enzymes and their impact on enzymatic hydrolysis for bioethanol production. **BioResources**, v. 7, n. 1, p. 602–615, 2012.

YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **InterScience**, 2006.

ZHENG, Y.; ZHANG, R.; PAN, Z. Investigation of adsorption kinetics and isotherm of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on lignocellulosic substrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 1–9, 2016.