CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI
GENARO RAMIREZ VEDIA

PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES DE MANDIOCA E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA TRATADO COM LÍQUIDO IÔNICO

São Bernardo do Campo
2020

GENARO RAMIREZ VEDIA

PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES DE MANDIOCA E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA TRATADO COM LÍQUIDO IÔNICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro Universitário FEI para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Orientado pela Profª. Drª. Andreia de Araújo Morandim Giannetti.

São Bernardo do Campo

2020

Vedia, Genaro Ramirez.
Produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca e aplicação na hidrólise de bagaço de cana tratado com líquido iônico / Genaro Ramirez Vedia. São Bernardo do Campo, 2020.
124 f. : il.

Dissertação - Centro Universitário FEI.
Orientadora: Prof.ª Dra. Andreia de Araújo Morandim-Giannetti.

1. Fungos endofíticos. 2. Celulases. 3. Hidrólise do bagaço de cana. 4. Açúcares fermentescíveis. 5. Biocombustíveis. I. Morandim-Giannetti, Andreia de Araújo, orient. II. Título.

Elaborada pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da FEI com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

centro universitário FEI

APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO
ATA DA BANCA EXAMINADORA

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Química

Mestrado

PGQ-10

Aluno: Genaro Ramirez Vedia **Matrícula:** 418109-5

Título do Trabalho: Produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca e aplicação na hidrólise de bagaço de cana tratado com líquido iônico.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Profª Drª Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Data da realização da defesa: 27/02/2020

ORIGINAL ASSINADA

Avaliação da Banca Examinadora:

São Bernardo do Campo, / / .

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Andreia de Araújo Morandim Giannetti Ass.: _____

Profª Drª Fernanda Guerreiro Rossi Higa Ass.: _____

Profª Drª Lidiane Gaspareto Felippe Ass.: _____

A Banca Julgadora acima-assinada atribuiu ao aluno o seguinte resultado:

APROVADO ☒ REPROVADO ☐

VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

APROVO A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO EM QUE FORAM INCLUÍDAS AS RECOMENDAÇÕES DA BANCA EXAMINADORA

_____

Aprovação do Coordenador do Programa de Pós-graduação

_____

Prof. Dr. Ricardo Belchior Torres

Dedico este trabalho a Deus, pelo seu propósito em minha vida. A minha mãe, Yolanda Vedia, meu amor eterno. Ao meu pai Juan Ramirez. Aos meus irmãos Ruth, Juana, Maura, Georgina, Jessica e Juan.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof.ª Dra. Andreia de Araújo Morandim Giannetti, por toda a atenção, paciência, sabedoria, dedicação e tempo, primordiais para que fosse possível finalizar meu trabalho. Agradeço também por acreditar e confiar em mim em todo momento e por compartilhar seu exorbitante conhecimento, que ajudaram na concretização deste desafio, que é mais um passo na minha carreira acadêmica.

A minha mãe Yolanda, uma mulher maravilhosa que eu sempre admirei. Ela me apoiou em tudo, sem ao menos questionar o que eu estava fazendo. Lembro o dia que falei que queria estudar no Brasil e ela disse que tudo bem. Senhora que sempre me deu forças e aconselhou nos momentos exatos. Hoje, estou aqui: eu consegui mais uma conquista! Muito obrigado mãe. Ao senhor Juan Ramirez, meu pai, homem paciente e sábio que sempre acreditou em mim, na minha capacidade e inteligência. Pai, eu sei que algum dia vou virar aquele empresário inovador que nós queremos, e vou colocar em prática cada um de seus conselhos.

As minhas irmãs Ruth, Juana, Maura, Georgina e Jessica, mulheres incríveis, minhas segundas mães, que cuidam de mim até agora como se estivesse na escola. Muito obrigado pelo apoio, pois quando mais precisava, vocês estavam ali para me dar um conselho, um abraço, uma força e sempre acreditaram em mim, hoje quero dizer que realizei mais um sonho e foi graça a vocês, minhas irmãs. Também quero agradecer a meu irmão, Juan, pelo apoio em todos os momentos da vida acadêmica e aos meus sobrinhos Matias, Juliana, Victória, Martino e Zoe, por alegrar todos meus dias com tanto carinho, afeto e por confiar em mim e me ter como um exemplo.

A meus amigos Robert e Heloisa, pela ajuda, conhecimento e conselhos transmitidos nas matérias cursadas no mestrado e na minha estada no Brasil. Aos professores do Mestrado em Engenharia Química e técnicos do laboratório da FEI, pelos conhecimentos e colaborações transmitidos ao longo deste período. Ao meu primo Moises e sua esposa Beatriz, que me acolheram no Brasil e me apresentaram a prestigiosa FEI, na qual hoje concluo mais um sonho na vida acadêmica. Aos amigos, André e Ian, muito obrigado pela amizade, parceria, paciência, e pela compreensão nestes dois anos dividindo o apartamento com vocês e, por cada conselho e força para não desistir. Em especial, agradeço a senhora Dalva Cardoso, por ter cuidado de mim como seu próprio filho, quando mais precisava.

RESUMO

Estudos relacionados a busca de novas fontes de enzimas têm crescido significativamente, principalmente os envolvendo a obtenção de glicosidases, como as celulases, xilanases, entre outras. Neste sentido, neste trabalho foi verificada a produção de celulases a partir de fungos associados a caules de mandioca e, também, foi avaliada a eficiência da aplicação de extratos enriquecidos nesta classe de enzimas na hidrólise de bagaço de cana submetido ao tratamento o líquido iônico (LI) acetato de *sec*-butilamônio. Para isso, inicialmente foi avaliada a produção de celulases por 14 fungos isolados dos caules de mandioca, sendo verificada maior produtividade dessa classe de enzimas pelo fungo *Annulohypoxylon stygium* (CA14) que mostrou uma concentração de açúcares fermentescíveis durante a hidrólise da celulose microcristalina de 0,83 ± 0,01 $mg.mL^{-1}$ e, *Phanerochaetaceae* sp. (CA17), com uma concentração de 0,46 ± 0,03 $mg.mL^{-1}$. Posteriormente, verificou-se a influência do tempo de crescimento desses fungos (CA14 e CA17) em meio líquido, sendo determinado um período ideal de crescimento de 13 dias para CA14 (atividade enzimática de 0,212 ± 0,002 $FPU.mL^{-1}$) e, 14 dias para CA17 (0,201 ± 0,002 $FPU.mL^{-1}$). Verificada a maior produtividade de celulases por CA14, avaliou-se também o pH ideal de crescimento para o mesmo (pH 4, atividade de 0,427 ± 0,003 $FPU.mL^{-1}$). Finalizada a etapa de determinação das condições ideais de crescimento do fungo CA14, realizou-se um novo processo de crescimento e, o extrato enzimático obtido foi aplicado no processo de hidrólise do bagaço de cana submetido a um pré-tratamento com o LI acetato de *sec*-butilamônio (melhor líquido iônico a ser utilizado quando comparado a outros líquidos iônicos avaliados - acetato de imidazólio, lactato de imidazólio e, lactato de *sec*-butilamônio). Foi realizada, ainda, uma etapa de pré-purificação do extrato enzimático através da precipitação com sulfato de amônio com saturações de 25, 50 e, 75 %. Todas as frações foram avaliadas perante ação da hidrólise do bagaço de cana tratado com Líquido Iônico selecionado, sendo verificada uma maior concentração da classe de enzimas desejada na fração obtida após 50 % de saturação (0,430 ± 0,002 $FPU.mL^{-1}$).

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Celulases. Hidrólise do bagaço de cana. Açúcares fermentescíveis. Biocombustiveis.

ABSTRACT

Studies related to the attainment of new sources of enzymes have increased significantly, especially works regarding the glycosidase production, such as cellulases, xylanases, among others. In this context, this work verified the cellulase production from fungi associated with cassava stems. It also analyzed the efficiency to apply enriched extracts to this class of enzymes in the hydrolysis of sugar cane bagasse treated with the *sec*-butylammonium acetate ionic liquid (IL). For this, the cellulase production by 14 fungi isolated from cassava stems was evaluated, verifying a higher production by two fungi: the *Annulohypoxylon stygium* fungus (CA14), which showed a concentration of fermentable sugars during the microcrystalline cellulose hydrolysis of 0.83 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ and the *Phanerochaetaceae* sp. fungus (CA17), with a concentration of 0.46 ± 0.03 $mg.mL^{-1}$. Afterwards, the influence of time in the growth of these fungi (CA14 and CA17) in a liquid medium was verified. It was possible to determine an ideal growth period of 13 days for CA14 (enzymatic activity of 0.212 ± 0.002 $FPU.mL^{-1}$) and 14 days for CA17 (0.201 ± 0.002 $FPU.mL^{-1}$). Having verified the highest cellulase production by CA14, the ideal growth pH was also evaluated for this fungus (pH 4, activity of 0.427 ± 0.003 $FPU.mL^{-1}$). Following the determination of the ideal growth condition for the CA14 fungus, a new growth process was realized. The enzymatic extract obtained was applied to the hydrolysis process of the sugar cane bagasse treated with the *sec*-butylammonium acetate IL (the best ionic liquid when compared to others evaluated – imidazolium acetate, imidazolium lactate, and *sec*-butylammonium lactate). Finally, a prepurification of the enzymatic extract was carried out using an ammonium sulphate precipitation with saturations of 25, 50, and 75 %. All fractions were analyzed regarding the hydrolysis of the sugar cane bagasse treated with the selected IL, verifying a higher cellulase concentration in the fraction obtained after 50 % of saturation (0.430 ± 0.002 $FPU.mL^{-1}$).

Keywords: Endophytic fungi. Cellulase. Sugarcane bagasse hydrolysis. Fermentable sugars.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécie *Manihot esculenta* 18
Figura 2 – Maiores produtores de mandioca do mundo 19
Figura 3 – Maiores produtores de mandioca no Brasil 20
Figura 4 – Exemplos de fungos endofíticos 21
Figura 5 – Fungos endofíticos isolados nos últimos anos 22
Figura 6 – Atuação das celulases 25
Figura 7 – Ciclo de liberação e absorção de CO_2 28
Figura 8 – Processo de obtenção de bietanol 34
Figura 9 – Produção de bioetanol de segunda geração 35
Figura 10 – Complexo Lignina, celulose, hemicelulose 36
Figura 11 – Representação da cadeia da celulose 37
Figura 12 – Representação da hemicelulose 37
Figura 13 – Representação da lignina 38
Figura 14 – Foto ilustrativa da cana de açúcar 39
Figura 15 – Lignocelulósicos antes e após o pré-tratamento 41
Figura 16 – Etapas da produção de etanol de segunda geração 43
Figura 17 – Porcentagem de documentos publicados com líquidos iônicos 46
Figura 18 – Porcentagem de documentos publicados por área de estudo 46
Figura 19 – Fluxograma do processo de crescimento dos fungos 54
Figura 20 – Fluxograma da análise qualitativa 55
Figura 21 – Fluxograma da obtenção do extrato enzimático 56
Figura 22 – Fluxograma da avaliação da produção de celulases 57
Figura 23 – Fluxograma do crescimento dos fungos no meio semi-sólido 58
Figura 24 – Fluxograma da determinação da atividade enzimática 59
Figura 25 – Fluxograma do enriquecimento dos extratos em celulose 60
Figura 26 – Fluxograma da dosagem proteica 61
Figura 27 – Fluxograma da metodologia ácido dinitrosalicílico (DNS) 62
Figura 28 – Reação de neutralização ácido base 65
Figura 29 – Síntese do líquido Iônico 65
Figura 30 – Fluxograma das etapas do tratamento do bagaço de cana 66
Figura 31 – Fluxograma do tratamento de bagaço com LIs. 67
Figura 32 – Sistema de tratamento do bagaço com LIs 68

Figura 33 – Fluxograma da hidrólise enzimática do bagaço tratado com os LIs 69
Figura 34 – Hidrólise do bagaço tratado com o extrato enzimático de CA14 70
Figura 35 – Fluxograma da obtenção do teor de lignina 71
Figura 36 – Determinação do teor de lignina.....72
Figura 37 – Fluxograma da obtenção do teor de holocelulose.....72
Figura 38 – Determinação dos teores de celulose e hemicelulose 74
Figura 39 – Alguns fungos submetidos ao crescimento em meio BDA 77
Figura 40 – Avaliação qualitativa da produção de celulases 78
Figura 41 – Comparação da eficiência do processo de hidrólise 80
Figura 42 – Comparação das concentrações proteicas dos extratos.....81
Figura 43 – [Açúcares redutores] por mg de proteína 81
Figura 44 – Crescimento em médio semi-sólido 82
Figura 45 – Atividade enzimática X tempo de crescimento 83
Figura 46 – Influência do pH na produção de celulases.....84
Figura 47 – Atividade enzimática dos extratos enzimáticos 85
Figura 48 – Atividade enzimática por mg de proteína 86
Figura 49 – Gel de eletroforese do extrato enzimático e frações 86
Figura 50 – Mecanismo de formação do LI acetato de *sec*-butilamônio 87
Figura 51 – Mecanismo de formação do LI lactato de *sec*-butilamônio.....88
Figura 52 – Mecanismo de formação do LI acetato de imidazólio.....88
Figura 53 – Mecanismo de formação do LI lactato de imidazólio.....89
Figura 54 – Composição dos materiais antes e após tratamento.....91
Figura 55 – Micrografias obtidas utilizando-se um aumento de 3.000X 92
Figura 56 – Hidrólise dos materiais tratados com os LIs.....93
Figura 57 – Tempo ideal de hidrólise 94
Figura 58 – Curva de calibração da quantificação de açúcares 108
Figura 59 – Curva de calibração da quantificação de proteínas.....109
Figura 60 – Curva de calibração da determinação da influência do tempo 110
Figura 61 – Curva de calibração da influência da temperatura 111
Figura 62 – Curva de calibração da determinação dos dados 112
Figura 63 – Curva de calibração da dosagem de proteínas 113
Figura 64 – Espectro de RMN-H^1 Ácido láctico.....114
Figura 65 – Espectro de RMN-C^{13} Ácido láctico 114
Figura 66 – Espectro de RMN-H^1 Ácido acético.....115

Figura 67 – Espectro de RMN-C^{13} Ácido acético 115
Figura 68 – Espectro de RMN-H^{1} imidazol.....116
Figura 69 – Espectro de RMN-C^{13} imidazol 116
Figura 70 – Espectro de RMN-H^{1} *sec*-butilamina.....117
Figura 71 – Espectro de RMN-C^{13} *sec*-butilamina 117
Figura 72 – Espectro de RMN-H^{1} acetato de *sec*-butilamônio 118
Figura 73 – Espectro de RMN-C^{13} acetato de *sec*-butilamônio.....118
Figura 74 – Espectro de RMN-H^{1} lactato de *sec*-butilamônio 119
Figura 75 – Espectro de RMN-C^{13} lactato de *sec*-butilamônio.....119
Figura 76 – Espectro de RMN-H^{1} acetato de imidazólio 120
Figura 77 – Espectro de RMN-C^{13} acetato de imidazólio.....120
Figura 78 – Espectro de RMN-H^{1} lactato de imidazólio.....121
Figura 79 – Espectro de RMN-C^{13} lactato de imidazólio 121
Figura 80 – Curva de calibração da concentração de glicose.....122
Figura 81 – Curva de calibração do tempo de hidrólise 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de enzimas 24
Tabela 2 – Exemplos de fungos produtores de celulases 26
Tabela 3 – Tipos de produção de etanol 31
Tabela 4 – Vantagens e desvantagens de cada geração do biocombustível.....32
Tabela 5 – Produção de bioetanol a partir de diferentes matérias primas. 33
Tabela 6 – Composição química da biomassa lignocelulósica 40
Tabela 7 – Métodos de pré-tratamento do material lignocelulósico 44
Tabela 8 – Exemplos de líquidos iônicos 47
Tabela 9 – Usos de diferentes LIs no tratamento da biomassa lignocelulósica 49
Tabela 10 – Fungos utilizados na avaliação da produção de celulases.....53
Tabela 11 – Composição do gel utilizado para realização da eletroforese 63
Tabela 12 – Enzimas presentes no padrão (LMW-SDS Marker Kit) 64
Tabela 13 – Etapas para revelação do gel com Coomassie Blue G25 64
Tabela 14 – Fungos isolados a partir de caules e folhas de mandioca 76
Tabela 15 – Concentração de açúcares redutores totais após a hidrólise 79
Tabela 16 – Concentração proteica de cada extrato enzimático analisado 80
Tabela 17 – Dosagem proteica das frações obtidas 85
Tabela 18 – Deslocamentos químicos obtidos para os reagentes e para o LI 87
Tabela 19 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI.....88
Tabela 20 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI.....89
Tabela 21 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI.....89
Tabela 22 – Teores de lignina, holocelulose, celulose, hemicelulose e, cinzas 90
Tabela 23 – Dados de otimização do tempo de hidrólise.....93
Tabela 24 –Análise de produção de celulase pelos fungos 108
Tabela 25 – Determinação da concentração de proteínas dos extratos 109
Tabela 26 – Influência do tempo na produção de celulases por CA14 110
Tabela 27 – Influência do tempo na produção de celulases por CA17 111
Tabela 28 – Influência do pH na produção de celulases por CA14.....111
Tabela 29 – Dados referentes a hidrólise enzimática.....112
Tabela 30 – Dados de concentração de proteínas.....112
Tabela 31 – Dados de concentração de glicose.....122
Tabela 32 – Dados referentes ao tempo de hidrólise.....123

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Avaliação quantitativa da produção de celulases pelos fungos 108
Apêndice B – Influência do tempo e pH de crescimento 110
Apêndice C – Pré-purificação do extrato enzimático.....112
Apêndice D – Produção dos líquidos iônicos 114
Apêndice E – Hidrólise do bagaço de cana tratado com diferentes LIs 122

LISTA DE ABREVIAÇÕES

LI	Líquido iônico
FPU	Filter Paper Unit
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
BDA	Batata dextrose agar
UV/VIS	Ultravioleta/visível
NaClO	Hipoclorito de sódio
UV	Ultravioleta
N_2	Nitrogênio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
DNS	Ácido dinitrosalicílico
CMC	Carboximetilcelulose
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
3.1 MANDIOCA 18
3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS 20
3.3 ENZIMAS 22
3.3.1 Celulases 25
3.3.1.1 Endoglucanase 26
3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS 27
3.4.1 Bioetanol 29
3.4.1.1 Bioetanol de Primeira Geração 33
3.4.1.2 Segunda Geração 35
3.4.1.3 Terceira geração 38
3.4.1.4 Quarta geração 39
3.5 CANA DE AÇÚCAR 39
3.6 TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 40
3.7 TRATAMENTO DE LIGNOCELULÓSICOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS 45
3.7.1 Líquido iônico 45
3.7.2 Aplicação de líquidos iônicos no tratamento de lignocelulósicos 48
4 MATERIAIS E MÉTODOS 50
4.1 MATERIAIS 50
4.2 EQUIPAMENTOS 51
4.3 METODOLOGIAS 52
4.3.1 Obtenção de celulases a partir dos fungos 53
4.3.1.1 Crescimento dos fungos a partir dos caules de mandioca 53
4.3.1.2 Avaliação qualitativa da produção de celulase 54
4.3.1.3 Obtenção dos extratos enzimáticos 55
4.3.1.4 Avaliação quantitativa da produção de celulases 56
4.3.1.5 Crescimento dos fungos em meio específico para celulase 57
4.3.1.6 Determinação do tempo e pH ideais de crescimento do fungo 58

4.3.1.6.1 Determinação da atividade enzimática 58
4.3.1.7 Enriquecimento dos extratos enzimáticos em celulases 60
4.3.1.8 Caracterização da Celulase 61
4.3.1.8.1 Dosagem proteica..... 61
4.3.1.8.2 Determinação dos açúcares redutores totais 62
4.3.1.8.3 Avaliação da concentração de glicose via HPLC..... 63
4.3.1.8.4 Eletroforese 1D em gel de poliacrilamida 63
4.3.2 Produção e caracterização dos líquidos iônicos 65
4.3.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico e hidrólise enzimática 66
4.3.3.1 Tratamento inicial do bagaço de cana 66
4.3.3.2 Tratamento do bagaço de cana com os líquidos iônicos 67
4.3.3.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado com os LIs 69
4.3.3.4 Hidrólise do bagaço tratado com LI pelo extrato obtido de CA14 69
4.3.3.5 Caracterizações do matérial lignocelulosico 70
4.3.3.5.1 Determinação do teor de lignina 70
4.3.3.5.2 Determinação do teor de holocelulose 72
4.3.3.5.3 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose..... 73
4.3.3.5.4 Determinação do teor de cinzas 75
4.3.3.5.5 Análise via microscopia eletrônica de varredura de alta resolução 75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 76
5.1 CRESCIMENTO DOS FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES DE MANDIOCA... 76
5.2 ENSAIO QUALITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES 77
5.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULASES..... 79
5.4 CRESCIMENTO EM MEIO ESPECÍFICO PARA CELULASES 82
5.5 ENRIQUECIMENTO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM CELULASES 84
5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LÍQUIDOS IÔNICOS 87
5.7 TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA COM OS LIS..... 90
5.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO COM O EXTRATO DE CA14 93
6 CONCLUSÕES..... 95
REFERÊNCIAS..... 96

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população e da industrialização, a demanda de utilização de energia cresceu significativamente, contribuindo para a evolução da dependência por combustíveis fósseis, bem como para o maior desenvolvimento de pesquisas relacionadas a combustíveis alternativos, principalmente os renováveis como o bioetanol, que apresenta uma participação significativa na matriz energética do Brasil (ZHAO; DAMGAARD; CHRISTENSEN, 2018; JAMBO et al., 2016).

Esse fato pode ser confirmado através da análise de dados divulgados pela Empresa de Pesquisa Energética (BEN, 2018) que mostra que a matriz energética brasileira, em 2017, se concentrou 57,1% em combustíveis provenientes de fontes não-renováveis e, 42,9% em combustíveis provenientes de fontes renováveis de energia sendo que, das possíveis fontes de energia alternativas, sabe-se que a biomassa, matéria orgânica de origem vegetal e animal, podem ser usadas como fonte de energia renovável e, além disso, sua utilização reduz emissão de CO_2 devido ao consumo do mesmo no cultivo de matérias primas (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Porém, para a utilização de biomassas de origem vegetal, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar, cascas, e resíduos florestais, compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, existe a necessidade de realização de pré-tratamentos, que consistem em romper o complexo lignina-hemicelulose-celulose e, com isso, favorecer o processo de hidrólise subsequente, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis e, posterior realização do processo de fermentação (GURAGAIN et al., 2011).

Neste contexto, o pré-tratamento se mostra um dos maiores problemas de processo devido ao elevado custo para a indústria do bioetanol, já excluindo o custo da planta (GURAGAIN et al., 2011). Assim, muitos estudos têm sido realizados visando aumentar o rendimento tanto nas etapas de tratamento do material lignocelulósico para liberação da celulose e hemicelulose, como na etapa de hidrólise para obtenção dos açúcares fermentescíveis.

Assim, levando-se em consideração o contexto apresentado, o presente trabalho visa o estudo do pré-tratamento do bagaço de cana com líquidos iônicos de baixo custo visando favorecer a disponibilidade da celulose e hemicelulose e, com isso, aumentar a disponibilidade de matéria prima durante a etapa de hidrólise.

Levando-se em consideração o processo de hidrólise, no presente trabalho também pretende-se verificar a produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca visando a aplicação desses extratos enzimáticos na etapa de hidrólise e, com isso, proporcionar um maior aproveitamento da biomassa lignocelulósica e, uma redução do custo do processo devido a possibilidade de se obter uma nova fonte enzimática.

2 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a realização de diversos estudos que buscam novas fontes de enzimas bem como realização de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos, o objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho estão descritos nos itens 2.1 e 2.2.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho apresenta como objetivo o estudo do pré-tratamento do bagaço de cana com líquidos iônicos de baixo custo, bem como a verificação da produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em consideração o objetivo geral do trabalho, destacam-se como objetivos específicos:

1. Síntese dos líquidos iônicos e aplicação no tratamento do bagaço de cana;
2. Avaliação da produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca e seleção do fungo com maior produtividade;
3. Determinação das condições ideais de crescimento do fungo selecionado para a produção de celulase (tempo e pH) bem como pré-purificação do extrato enzimático visando o enriquecimento nesta classe de enzimas;
4. Avaliação hidrólise do bagaço da cana tratado como o líquido iônico selecionado com o extrato enzimático obtido a partir do fungo com maior produtividade de celulases e determinação do tempo ideal de hidrólise.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentados tópicos importantes para a compreensão do presente trabalho, que visou a produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca, bem como aplicação dos extratos enzimáticos enriquecidos nesta classe de enzimas na etapa de hidrólise de materiais lignocelulósicos submetidos ao tratamento com líquidos iônicos visando a produção futura de bioetanol.

3.1 MANDIOCA

A mandioca (Figura 1), das quais a espécie *Manihot esculenta* Crantz subespécie *Esculenta* (BOONCHANAWIWAT et al., 2011) é a mais conhecida e comercializada, consiste em uma planta perene pertencente à família das Euphorbiaceae, cultivada a mais de 10.000 anos pelos povos nativos, principalmente da região sul-americana em países como Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela, Guiana e, Suriname (TAPPIBAN et al., 2019; CAGNATO; PONCE, 2017; PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016; ALLEM, 1994).

Figura 1 – Espécie *Manihot esculenta*

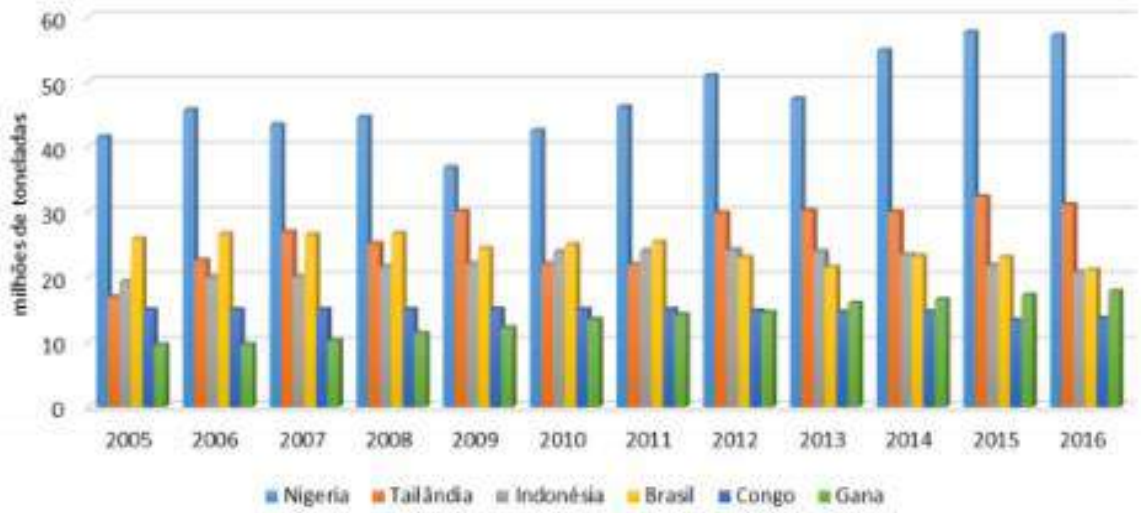
Fonte: Autor “adaptado de” Latif; Müller, 2015; Agbo, 2019.

A mandioca, também é conhecida como yucca, tapioca, ou cassaca, é proveniente de regiões tropicais, apresenta temperatura ideal de cultivo para o seu desenvolvimento entre 20 °C e 27 °C e, mostra um desenvolvimento favorável mesmo

em solos pobres (NDAM et al., 2019; MATTOS; FARIAS; FERREIRA FILHO, 2006), fator que favorece o seu desenvolvimento e faz com que a mesma seja considerada um dos principais alimentos no mundo, sendo consumida por mais de 800 milhões de pessoas, especialmente nos países em desenvolvimento e, atualmente ocupa a terceira posição em cultivos no mundo (ZENG et al., 2019; MATTOS; FARIAS; FERREIRA FILHO, 2006).

Levando-se em consideração o mercado de produção, o maior produtor de mandioca no mundo de acordo com a Organização das Nações Unidas, segundo dados de 2016, são a Nigéria, seguida pela Tailândia e Indonésia e, o Brasil, que ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores de mandioca (Figura 2) (GROXKO, 2017; SOARES; SILVA, 2016).

Figura 2 – Maiores produtores de mandioca do mundo

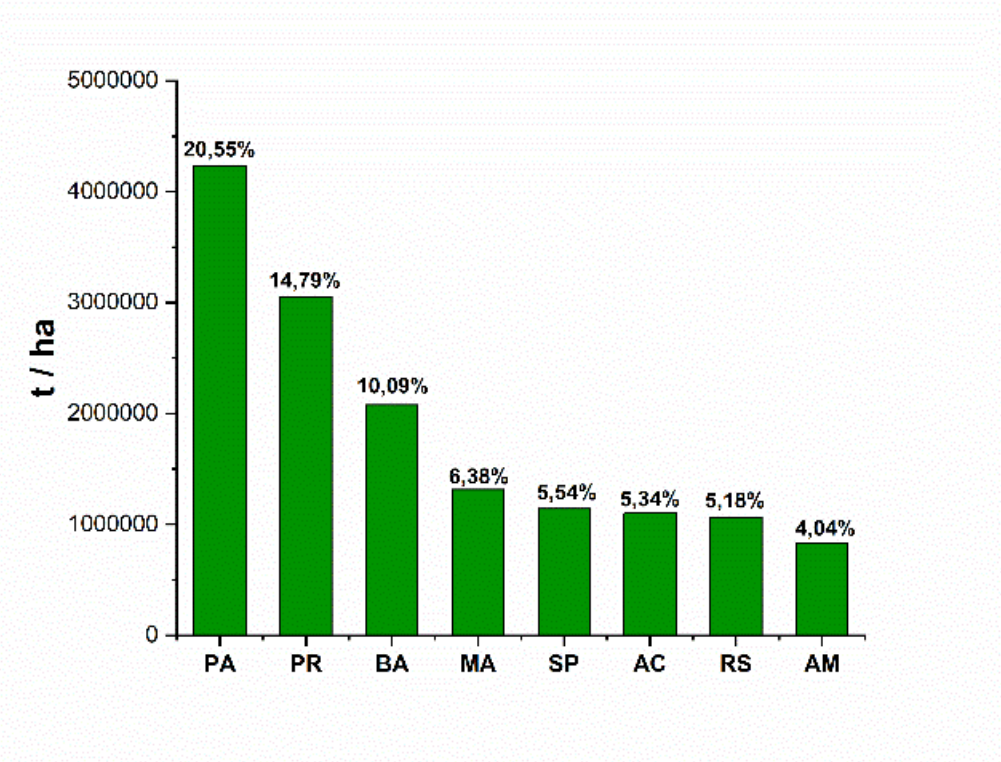


Fonte: SOARES; SILVA, 2016.

No Brasil, inicialmente a mandioca foi cultivada na região amazônica, mas, atualmente, é encontrada amplamente distribuída em diversas regiões do país, principalmente nos estados de Pará, Paraná e, Bahia (EMBRAPA, 2018).

Desses estados, destaca-se o Pará com 20,55% de produção total de mandioca do país, seguido do Paraná com 14,79%, a Bahia com 10,09%, o Maranhão 6,38% e, São Paulo 5,54%, como ilustrado na Figura 3, que mostra a participação dos estados brasileiros na produção de mandioca.

Figura 3 – Maiores produtores de mandioca no Brasil



Fonte: Autor “adaptado de” Embrapa, 2018

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos (Figura 4) representam um grupo de microrganismos existente a mais de 400 milhões de anos presentes nos tecidos internos da maioria das plantas e algas (muitas vezes em organelas específicas da planta), principalmente, do ecossistema natural, sem causar sintomas ou danos aparentes vivendo, dessa forma, em simbiose com as espécies (GUPTA et al., 2019; LI et al. 2018. SHI et al., 2016).

A sua presença é considerada muito importante para os hospedeiros uma vez que, os fungos endofíticos, auxiliam no crescimento e desenvolvimento da espécie em que eles habitam (JIA et al., 2016)

Esses microrganismos, que estão presentes em folhas, caules, raízes, sementes e, frutos são produtores de enzimas como as celulases, xilanase, amilases, pectinases, enzimas oxidativas lignolíticas, bem como de inúmeros metabólitos como alcaloides, terpenoides, fenilpropanoides, quinonas, e lactonas, considerados de grande interesse em inúmeras indústrias devido a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumoral, como imunossupressores, etc., fator que tem despertado o

interesse de pesquisadores (MANGANYI et al., 2018; MARQUES et al., 2018; FERNANDES et al., 2015).

Figura 4 – Exemplos de fungos endofíticos

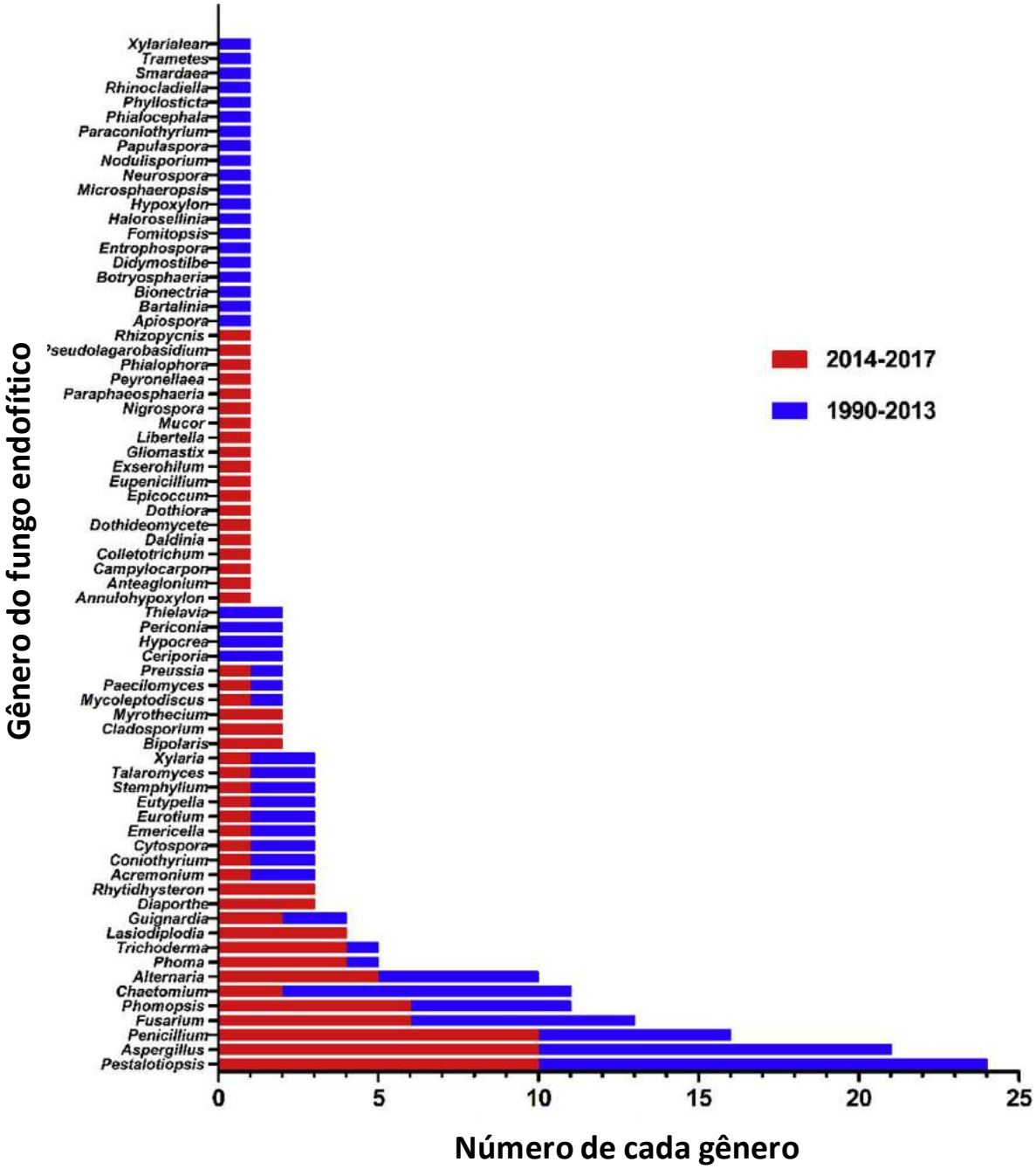
Fonte: Autor “adaptado de” Chapla; Biasetto; Araujo, 2013.

Nessa classe de microrganismos, que apresenta espécies de Ascomycotas (97%), Basidiomycotas (2%), e Mucoromycotas (1%), estão presentes mais de 300.000 espécies de hospedeiros e somam mais de um milhão de espécies, porém, somente uma pequena parte dos mesmos foram estudados e identificados (Figura 5), o que mostra a possibilidade de desenvolvimento de inúmeros trabalhos promissores que levem ao desenvolvimento de novas tecnologias industriais, principalmente relacionadas a obtenção de enzimas (LI et al. 2018; MARQUES et al., 2018; JIA et al., 2016).

Dessa forma, devido elevada capacidade de produção de diversas enzimas por esses microrganismos, os fungos endofíticos invadem e colonizam os tecidos das plantas (como folhas, caules, casca, raízes, frutas flores e sementes) (TOGHUEO et al., 2017) para obter os nutrientes necessários para sua sobrevivência (relação simbiótica).

Entretanto, esses fungos endofiticos tem sido pouco explorado em pesquisas para aplicações biotecnológicas envolvendo a utilização dessas biomoléculas em processos industriais (MARQUES et al., 2018).

Figura 5 – Fungos endofíticos isolados nos últimos anos



Fonte: Autor “adaptado de” Li et al., 2018.

3.3 ENZIMAS

Enzimas são moléculas proteicas empregadas como catalizadores de diversas reações que ocorrem em sistemas biológicos, sendo possível sua aplicação em vários processos biotecnológicos. Dessa forma, as enzimas são consideradas importantes não somente na medicina, mas, também, na indústria química, no processamento de

alimentos e, na agricultura sendo conhecidas, atualmente, mais de 5500 diferentes enzimas (NELSON; COX, 2019; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

As mesmas podem ser obtidas a partir de diversas fontes como, por exemplo, tecidos animais, plantas e, microrganismos, porém, os últimos representam a fonte mais atrativa e estudada das mais diversas classes de enzimas devido, principalmente, a sua abundância e rápido crescimento (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

As enzimas, como outras proteínas, têm pesos moleculares entre 12.000 até mais de 1 milhão de Da e, algumas características especiais. Para serem ativas, a maioria delas não requer nenhum outro grupo químico além de seus resíduos aminoácidos, porém, outras requerem estruturas químicas chamadas de cofatores. As mesmas são catalisadores biológicos que apresentam inúmeras vantagens para aplicações industriais, uma vez que raramente requerem íons metálicos tóxicos para sua atuação como catalisadores criando, assim, a possibilidade de aplicação em processos de maneira ecologicamente correta, principalmente das enzimas termoestáveis (PATEL et al., 2019).

As enzimas atuam como catalisadores de reações, produzindo aumentos na velocidade das reações na ordem de 107 a 1014. A sua aplicação em processos catalíticos biológicos foi reconhecida e descrita no início do século XIX, sobre a digestão da carne pelas secreções do estomago e, na conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Porém, na mesma década, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”; posteriormente dando nome a esses “fermentos” de enzimas (NELSON; COX, 2019; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

Perto do ano de 1930, Haldane escreveu um tratado intitulado “Enzimas”, em que foi descrito sugestões de que as interações fracas entre a enzima e seu substrato poderia ser usada para distorcer a molécula do substrato e catalisar a reação e, este conhecimento prevaleceu como conceito atual da catálise enzimática. Assim, para entender o mecanismo de ação completo de uma enzima, é necessário ter o conhecimento a respeito:

- Dá sequência temporal na qual ocorre a ligação à enzima dos intermediários da reação;
- A estrutura de cada um desses intermediários e o estado de transição;

- A velocidade de interconversão entre os intermediários;
- A relação estrutural da enzima com cada um dos intermediários e,
- As contribuições energéticas de todos os grupos reagentes e que interagem com a formação de intermediários e dos estados de transição.

Assim, levando-se em consideração os mecanismos de atuação, as enzimas são classificadas de acordo com a reação específica que ela catalisa conforme descrito na tabela 1 (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

Como verificado na tabela 1, as enzimas têm sido nomeadas pela adição do sufixo “ase” no nome do seu substrato. Porém, devido ao aumento das pesquisas que levaram a descoberta de novas enzimas, foi criado um sistema para nomear e classificar as enzimas, sendo eles divididos em seis grandes classes (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

Tabela 1 – Classes de enzimas

Classe	Definição	Tipo de reação
1. Óxido-redutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)	$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$
2. Transferases	Reações de transferência de grupos	$A{-}X + B \rightleftharpoons A + B{-}X$
3. Hidrolases	Reações de hidrolise (transferência de grupos funcionais para a água)	$A{-}B + H_2O \rightleftharpoons A{-}H + B{-}OH$
4. Liases	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos	$A{=}B + X{-}Y \rightleftharpoons \overset{X}{\overset{\vert}{A}}{-}\overset{Y}{\overset{\vert}{B}}$
5. Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	$\underset{X}{\underset{\vert}{A}}{-}\underset{Y}{\underset{\vert}{B}} \rightleftharpoons \underset{Y}{\underset{\vert}{A}}{-}\underset{X}{\underset{\vert}{B}}$
6. Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação	$A + B \rightleftharpoons A{-}B$

Fonte: Autor “adaptado de” Marzzoco; Torres, 1999.

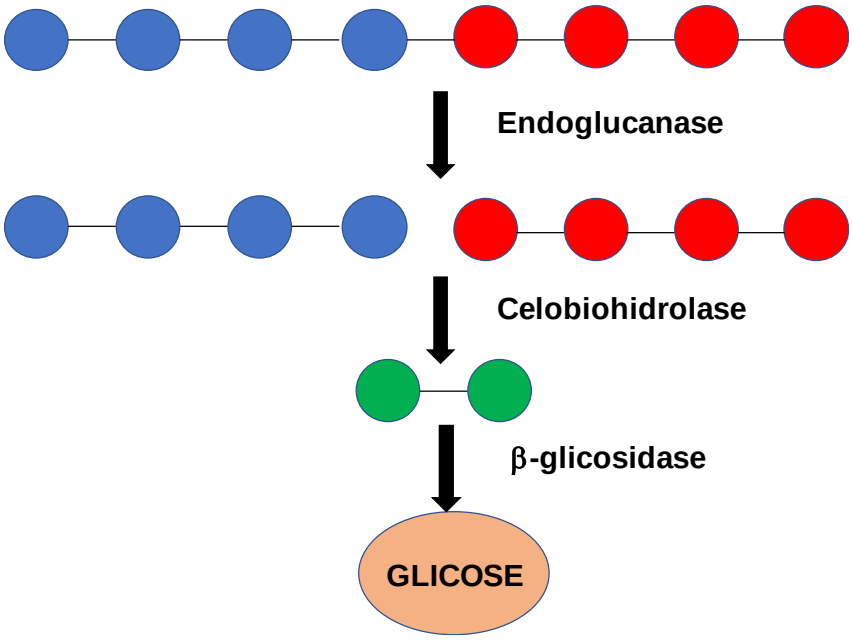
Destas classes, destacam-se as hidrolases como as proteases, que representam mais de 65 % do consumo de enzimas na indústria, as lipases e, as glicosidases, classe em que as celulases estão englobadas e que foi foco do presente trabalho (REBAH; MILED, 2013).

3.3.1 Celulases

As celulases, pertencente ao grupo das *O*-glicosídeo oxidases, são consideradas a segunda maior classe de enzimas com aplicação industrial. As mesmas são utilizadas em processos da indústria de detergentes, têxtil, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas e, atualmente, no processo de produção de bioetanol, o que pode acarretar no fato da mesma ocupar o primeiro lugar em aplicações industriais (PATEL et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2018).

As celulases, divididas em três tipos [celobiohidrolase – atuam nas regiões cristalinas da celulose favorecendo a liberação da glicose e celobiose, endoglucanase – participante da produção de celobiose devido à quebra aleatória das regiões internas da celulose, e β-glicosidase – que não atuam diretamente na celulose e, sim, em frações provenientes da quebra da celulose], são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas β-1, 4-*D*-glucana na celulose levando a produção de glicose, celobiose e, oligossacarídeos (Figura 6) (PASSOS; PEREIRA JR; PATEL et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2018).

Figura 6 – Atuação das celulases



Fonte: Autor “adaptado de” Akram et al., 2018

Essa classe de enzimas são produzidas por diversos microrganismos, principalmente fungos (Tabela 2), porém, os mais conhecidos e aplicados industrialmente na produção de celulases são os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus* sp., capazes de produzir endoglucanases, celobiohidrolases bem como β-glucosidases, que devem atuar em sinergismo visando a maior eficiência há hidrólise da celulose e produção de açúcares (HIRASAWA et al., 2019; PATEL et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2018).

Tabela 2 – Exemplos de fungos produtores de celulases

Clostridium thermocellum	*P. thermophilus,*	*P. thermoaerophilus*
Penicillium chrysogenum P33	*P. tezpurensis*	*Caldicellulosiruptor danielii*
Clostridium cellulovorans	*Clostridium clariflavum*	*Caldicellulosiruptor morganii*
Ruminiclostridium cellulolyticum	*Lactobacillus plantarum*	*Neocallimastix californiae*
Neocallimastix patriciarum J11	*P. marinum*	*Anaeromyces robustus*
Myceliophthora thermophila	*Trichoderma reesei*	*Piromyces finnis*
Aspergillus sp.		

Fonte: Autor “adaptado de” Prasad et al., 2019; Hirasawa et al., 2019

3.3.1.1 Endoglucanase

Das celulases, muitos estudos estão sendo realizados com relação a produção das endoglucanases (β-1,4-D-glucano glucanoidrolases - EC 3.2.1.4), responsáveis pela clivagem aleatória das regiões internas amorfas da celulose favorecendo a atuação das exoglucanases e, assim, a liberação das unidades glicosídicas (HILDÉN; VÄLJAMÄE; JOHANSSON, 2005; SALEEM et al., 2005).

As mesmas são divididas em 13 famílias de glicosil hidrolases (GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH12, GH44, GH45, GH48, GH51, GH61, GH74 e GH124), que atuam catalisando mecanismos específicos de reação envolvidas na clivagem da celulose e, hemicelulose, dependendo da distância entre os grupos carboxílicos envolvidos.

Destas, as endoclucanases pertencentes aos grupos GH5, GH8 e, GH45 tem despertado a atenção de pesquisadores devido ao fato das mesmas se mostrarem termoestáveis e favorecerem a aplicação em diversos processos industriais como, por exemplo, na produção de bioetanol (AKRAM et al., 2018; VLASENKO et al., 2010).

Dessa forma, no presente trabalho foi avaliada a produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca sendo avaliada, principalmente a produção de endoglucanases.

3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS

Em função das sérias mudanças climáticas, muitas propostas têm sido feitas visando a redução da emissão de gases como, por exemplo, o CO_2 e NO_x ao meio ambiente, bem como a redução da dependência da sociedade aos combustíveis fósseis, responsáveis por aproximadamente 80 % do suprimento de toda a energia global (CHOHAN et al., 2020; ZHAO; DAMGAARD; CHRISTENSEN, 2018).

Essas mudanças se devem, principalmente, aos problemas relacionados ao aquecimento global como, o aumento do nível do mar devido a diminuição do gelo do Ártico, entre outras mudanças que têm sido reportadas em alguns estudos. Diante desse problema, na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC), formado por 194 países, foi assinado um acordo cujo objetivo é manter o aumento da temperatura média global abaixo de 2°C até o final do século, com uma meta ideal de 1,5°C (MENDIARA et al., 2018).

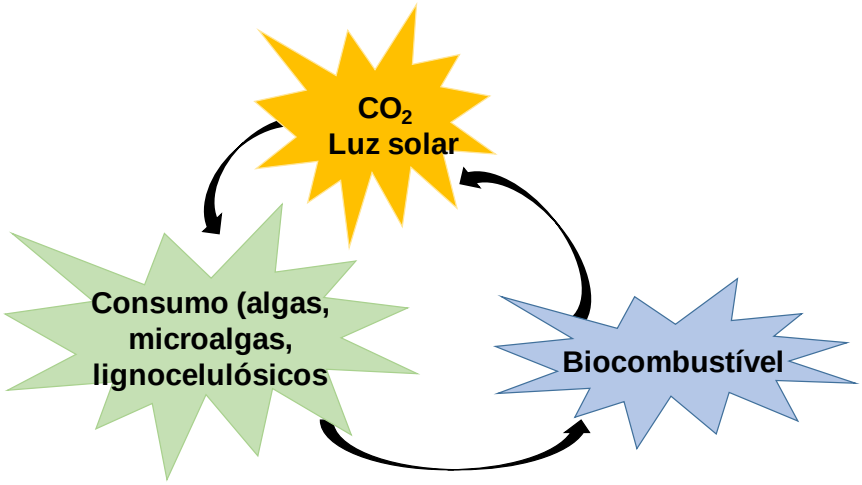
Para isso, se tem como meta a redução da poluição, principal causa da elevação da temperatura, e considerada uma consequência do grande uso de combustíveis fósseis. Neste cenário, o setor de transporte está sendo mais firme em reduzir as emissões de CO_2, por ser o mais fortemente dependente de fontes de energia fóssil, uma vez que o petróleo é a principal fonte de energia para o transporte, sendo responsável por cerca de 95% do consumo de energia do setor (ABDULLAH et al., 2019; IBARRA-GONZALEZ; RONG, 2019; MENDIARA et al., 2018).

Para chegar nesse objetivo, a solução seria a descarbonização quase que total do transporte, ou seja, substituição de combustíveis fósseis por matérias-primas alternativas neutras em CO_2 (ABDULLAH et al., 2019; IBARRA-GONZALEZ; RONG, 2019; MENDIARA et al., 2018)

Neste cenário, o setor de transporte vem buscando opções de combustíveis de fontes renováveis, pois eles podem ser produzidos a partir de uma gama de fontes de energia primária, como, por exemplo, a biomassa, que é considerada neutra em carbono pois a quantidade de CO_2 liberada durante a combustão é absorvida pela

planta durante a fotossíntese, para ser novamente emitida na atmosfera durante a combustão do biocombustível, gerando um ciclo de captura CO_2, como ilustrado na figura 7 (ABDULLAH et al., 2019; IBARRA-GONZALEZ; RONG, 2019; MENDIARA et al., 2018).

Figura 7 – Ciclo de liberação e absorção de CO_2



Fonte: Autor “adaptado de” Mendiara et al., 2018

Levando-se em consideração as necessidades ambientais, os biocombustíveis têm sido considerados uma das fontes de combustíveis mais importantes para garantir a sustentabilidade ambiental, econômica e social, uma vez que os mesmos são derivados da biomassa e são novos recursos energéticos, alternativos e limpos, muito importantes para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (MENDIARA et al., 2018).

Dentre os vários biocombustíveis disponíveis no mundo, o bioetanol e o biodiesel são os mais consumidos como combustíveis alternativos para motores a gasolina e diesel, respectivamente. Esses tipos de biocombustíveis têm mostrado aumento do uso em vários países, tais como a Índia, Brasil, EUA, Japão, Suécia etc. principalmente o bioetanol (DANDU; NANTHAGOPAL, 2019).

Os biocombustíveis são combustíveis derivados da biomassa considerados como neutros em carbono, renováveis e, abundantes. Eles são biodegradáveis e praticamente livres de enxofre e compostos aromáticos, não causando impactos elevados ao meio ambiente gerando, assim, uma sustentabilidade ambiental (MENDIARA et al., 2018).

Os mesmos podem ser produzidos a partir de processos biológicos (fermentação e digestão anaeróbica), físico-químicos (extração e transesterificação) e, termoquímicos (gaseificação e liquefação) (LI; SAKURAGI; MAKINO, 2019) e, classificados de acordo com as características físicas como biocombustíveis:

- Sólidos: biomassa de madeira e resíduos lignocelulósicos;
- Líquidos: etanol, biodiesel, dimetiléter e, óleo de pirólise;
- Gasosos: biogás, gerado pelo processo de digestão anaeróbico a partir de resíduos municipais, da pecuária e agroindustriais, voláteis produzidos a partir da torrefação de biomassa e, singás obtido a partir do processo de gaseificação de biomassa e resíduos sólidos (MENDIARA et al., 2018).

Destes biocombustíveis, o bioetanol tem tido destaque sendo que, o Brasil é considerado um dos maiores produtores do bioetanol juntamente com os EUA e, o maior produtor de bioetanol a partir da cana. Porém, a cana não é a matéria-prima exclusiva usada para a produção de bioetanol pois, em outros países tais como EUA, esse biocombustível é produzido a partir do milho e, na Europa, a partir da beterraba (MENDIARA et al., 2018). Destaca-se também a possibilidade de produção do mesmo a partir de outras fontes como materiais lignocelulósicos, macroalgas e, microalgas.

3.4.1 Bioetanol

A utilização de bioetanol como combustível é tão antiga quanto o carro sendo que, a sua aplicação iniciou na Alemanha, em 1894, quando pesquisadores tentaram aplicar álcool como combustível nos carros da época e, depois, em Paris, local em que foi realizada a primeira produção de carros movidos a álcool e, assim, se deu início a diversas pesquisas e as indústrias foram adotando este biocombustível como uma fonte alternativa (AZHAR et al., 2017).

Já, no Brasil, o bioetanol foi introduzido no começo do século XX, com as primeiras tentativas de uso de álcool combustível pela Sociedade Nacional de Agricultura e evoluiu rapidamente com o início do PROALCOOL- Programa Nacional do Álcool. Porém, a produção de bioetanol foi consolidada com a criação dos carros Flex, que favoreceu o aumento da demanda nacional significativamente (GRASSI; PEREIRA, 2019; MACHADO, 2003).

Levando-se em consideração os marcos de produção, o bioetanol começou a ser produzido no Brasil em 1925, e, na Europa e EUA em 1900 e, a atualmente, tem sido considerado o biocombustível mais promissor em resposta a diminuição dos recursos petrolíferos e, redução dos problemas ambientais relacionados, principalmente, a utilização dos combustíveis fósseis (CHOHAN et al., 2020; TRINH et al., 2019; AZHAR et al., 2017).

O bioetanol, mais conhecido como C_2H_5OH, é um dos principais produtos orgânicos sintéticos e oxigenados e possui propriedades únicas como solvente, combustível, germicida, componente de bebidas, anti-congelantes e, por último, por ser muito versátil, é utilizado com intermediário para na produção de diversos reagentes químicos (LEE, 1996). O mesmo pode ser produzido por três diferentes vias:

1) Sinteticamente a partir do etileno,
2) Como subproduto de certas operações industriais e,
3) Pela fermentação de açúcares, amidos ou celulose, processo mais utilizado mundialmente (LEE, 1996).

Dos processos de obtenção, o produto proveniente do primeiro tipo é conhecido comumente como etanol e, o produto do terceiro tipo de produção, é chamado de bioetanol (LEE, 1996).

Devido a sua aplicabilidade, a sua produção passou por diversos avanços tecnológicos que ampliaram o potencial de produção global, aumentando significativamente a produção.

Dessa forma, atualmente, existem 4 tipos de produção deste biocombustível, desde a primeira até a quarta geração (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019) (Tabela 3). Assim, verifica-se que, na produção do bioetanol de primeira geração utiliza-se biomassa proveniente de alimentos tais como cana e milho. Esse fato tem gerado controvérsia pois a sua produção leva a uma competição com as necessidades globais de alimentos.

Já, na segunda geração, verifica-se uma mudança em que bioetanol é produzido a partir de biomassa não comestível (materiais lignocelulósicos), mas ainda existem alguns problemas relacionadas à relação custo-benefício.

Na terceira geração são utilizadas algas e microalgas como matéria-prima e, a quarta geração, se concentra na modificação genética de microrganismos visando o aumento da produção (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Tabela 3 – Tipos de produção de etanol

	Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração
Fontes	Trigo, beterraba, cana de açúcar, mandioca, milho, batata doce.	Lignocelulósicos em geral	Algas e microalgas	Qualquer fonte de açúcar
Principais etapas	Moagem e fermentação	Moagem, hidrólise e fermentação	Moagem, hidrólise e fermentação	Moagem e fermentação ou Moagem, hidrólise e fermentação dependendo da fonte de açúcar
Porcentagem de carboidratos	59-70 %	69-72 %	51-60 %	-
Rendimento em etanol	0,21-0,34%	0,29-0,30 %	0,23-0,43%	-

Fonte: Autor “adaptado de” Alalwan; Alminshid; Aljaafari, 2019; Dave et al., 2019.

Dessa forma, na tabela 4 estão descritas, de maneira resumida, algumas das vantagens e desvantagens de cada uma das gerações de biocombustíveis.

Destaca-se também que, para essa produção alcançar níveis máximos de produção, existem vários trabalhos de pesquisas que relatam mudanças na produção de bioetanol primeira geração usando diferentes matérias primas, fermentos, variação de parâmetro como pH, temperatura, velocidade de agitação, entre outros (Tabela 5) (AZHAR et al, 2017; AYODOLE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2019).

Destas fontes, resíduos de cana de açúcar tem se mostrado promissores como fonte de produção de etanol de segunda geração devido a elevada demanda existente no Brasil e, dessa forma, tem sido um dos mais utilizados no país.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens de cada geração do biocombustível.

Tópico	Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração
Competição alimentos-biocombustíveis	Produzido a partir do óleo comestível e da matéria-prima amilácea	Não há conflito entre alimentos-energia	Não há conflito entre alimentos-energia	Não há conflito entre alimentos-energia
Pegada da terra	Requer terras cultiváveis	Requer terras cultiváveis ou florestas	Não é necessário terras cultiváveis	Não é necessário terras cultiváveis
Conversão para biocombustíveis	Conversão fácil	Necessita de processamento sofisticado devido ao alta quantidade de hemiceluloses e lignina	Fácil conversão devido ao aumento da hidrólise e / ou eficiência da fermentação	Fácil conversão devido ao aumento da hidrólise e / ou eficiência da fermentação
Pegada da água	É necessário água potável para cultivo	É necessário água potável para cultivo	Pode ser utilizada resíduos, solução salina e água não potável	Pode ser utilizada resíduos, solução salina e água não potável
Responsabilidade socioambiental	O uso de pesticidas e fertilizantes é a principal preocupação	Sem gastos com fertilizantes ou pesticidas; no entanto, o desmatamento é uma preocupação	Há vantagens como a fixação de CO_2, tratamento de águas residuais e não há gastos com fertilizantes, mas há desvantagens como as preocupações ecológicas da eutrofização marinha	Há vantagens como a fixação de CO_2 e tratamento de águas residuais, mas há desvantagens como a liberação dos microrganismos geneticamente modificadas
Comercialização	Produzido comercialmente	Produzido comercialmente	Produção insuficiente da biomassa para comercialização	Produção insuficiente da biomassa para comercialização
Colheita	A colheita é feita à mão ou com máquinas	A colheita é feita à mão ou com máquinas	A colheita de microalgas é cara e complicada	A colheita de microalgas é cara e complicada
Regulamento	Existem regulamentos e eles são bem claros	Existem regulamentos e eles são bem claros	Não há regulamentação disponível para o cultivo marinho	Não há regulamentação disponível para o cultivo marinho, além disso, há uma regulamentação rigorosa para liberação dos microrganismos geneticamente modificadas
Questões financeiras	O custo do capital é razoavelmente baixo	O custo do capital é razoavelmente baixo	O custo inicial para o cultivo em larga escala é muito alto	O custo inicial para o cultivo em larga escala é muito alto
Condição ambiental	Parâmetros como temperatura e a umidade devem estar dentro de uma condição adequada	Parâmetros como temperatura e a umidade devem estar dentro de uma condição adequada	Pode ser cultivado em condições ambientais variadas como pH, salinidade e intensidades de luz elevadas	Pode ser cultivado em condições ambientais variadas como pH, salinidade e intensidades de luz elevadas

Fonte: Adaptado de Abdullah et al. 2019.

Tabela 5 – Produção de bioetanol a partir de diferentes matérias primas.

Matéria prima	Microrganismo	Condições do fermentador	Tempo de fermentação (h)	Quantidade total de açúcar adicionada ao fermentador (g/L)	Quantidade total de açúcares consumidos no fermentador(g/L)	Produção de etanol (%)
Caldo de cana	Saccharomyces cerevisiae	Ph 3.86, temperatura 30ºC, agitação estática	32	Açucar total 173	169.4	92
Suco de sorgo	Saccharomyces cerevisiae	Ph-4.5, temperatura 30 °C, agitação 100 rpm	72	Sacarose 124,05, glicose 20,85, frutose 16,80, Melaço- 8 .	Sacarose 124,05, glicose 20,85, frutose-16,80, Melaço-72,02.	46
Suco de melancia	Saccharomyces cerevisiae	Ph-5, temperatura 32°C agitação 100 rpm	36-160	Sacarose 20, Glucose 20, Frutose36, Melaço 210	Sacarose-20, Glucose-20, Frutose-36, Melaço130	80.1
Suco de beterraba	Saccharomyces cerevisiae	Ph-5, temperatura 30°C agitação 150 rpm	72	Sacarose 200, glicose não relatada, frutose não relatada	182.09	84.78 – 85.62
Suco de caju	Saccharomyces cerevisiae	Ph-4.5, temperatura 30°C agitação 150 rpm	120	100	80	93.3

Fonte: Autor “adaptado de” Ayodele; Alsaffar; Mustapa, 2019.

3.4.1.1 Bioetanol de Primeira Geração

O bioetanol de primeira geração é produzido a partir da biomassa de material comestível: amido (batata, trigo, cevada e milho) ou açúcares (cana de açúcar, beterraba e, sorgo doce). O uso dessa matéria-prima se mostrou promissora em minimizar a combustão de combustíveis fósseis, reduzindo a emissão de CO_2, que são consumidos pelas culturas agrícolas à medida que cresce o plantio (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Contudo, surgem controvérsias sobre o uso das biomassas comestíveis como matéria-prima e os impactos nas áreas de cultivo, biodiversidade e suprimento de alimentos uma vez que, atualmente, a produção dos biocombustíveis de primeira

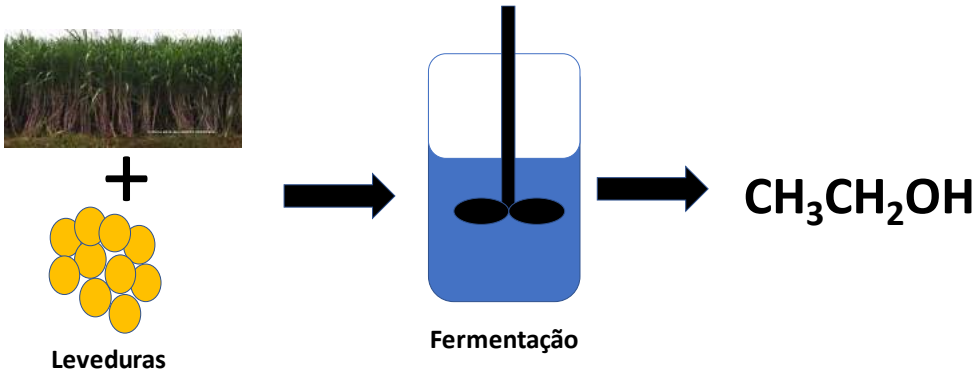
geração comercial chega a aproximadamente 50 bilhões de litros por ano, incluindo biodiesel (bioésteres) e bioetanol, bem como biogás (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

A produção de bioetanol de primeira geração depende da matéria prima inicial, açúcar ou amido. Assim, as fases da produção de bioetanol a partir açúcar são moagem, fermentação e destilação. Já, as fases da produção a base de amido incluem moagem, gelatinização, hidrólise (rompimento das cadeias de carboidratos do amido para liberação das unidades de glicose), fermentação, e destilação (AYODOLE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2019).

A produção de bioetanol a partir de cana de açúcar em comparação com o de milho apresenta uma maior capacidade de substituir o combustível fóssil, devido ao baixo custo de produção, maior rendimento em litros por hectare e, a principal característica, baixa emissão de carbono.

Essa rentabilidade pode ser evidenciada a partir da avaliação de dados de produção. Por exemplo, no Brasil, durante a moagem da cana de açúcar, cerca de 95% do açúcar extraído é solúvel, deixando o bagaço praticamente seco para seu uso como combustível por meio da queima e cogeração de eletricidade. Após a extração, o suco da cana passa por uma clarificação antes de ser fermentado, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para se obtenção do bioetanol (Figura 8).

Figura 8 – Processo de obtenção de bietanol



Fonte: Autor

O caldo fermentado é separado e destilado para a obtenção do bioetanol hidratado 95% ou, após a realização da destilação azeotrópica, se obtém o etanol

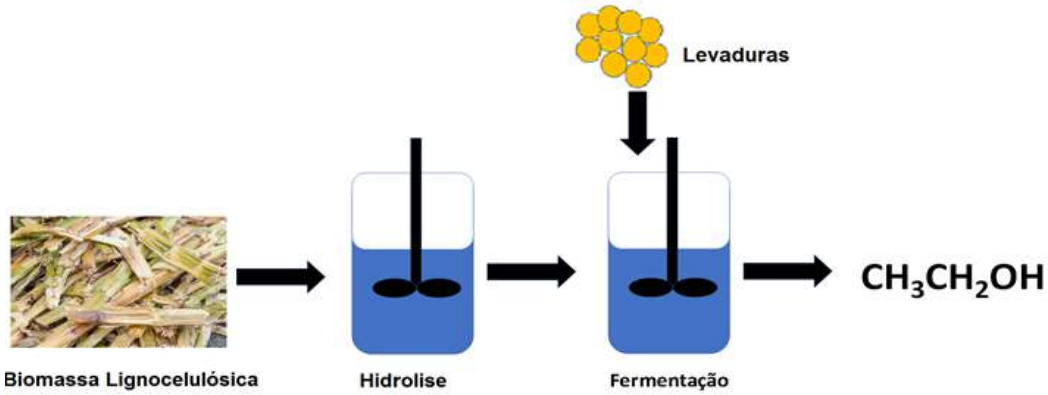
anidro (99 %) (THANGAVELU; AHMED; ANI, 2016; AYODOLE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2019).

Não obstante das conquistas extraordinárias da produção e comercialização do bioetanol, existem algumas limitações em sua produção, como a disputa alimento versus biocombustível, alto custo de matéria-prima, alto impacto ao meio ambiente, com exceção do bioetanol a partir de cana de açúcar. Essas limitações apontam para novas pesquisas para obtenção deste biocombustível a partir de matérias primas alternativas, como biomassa lignocelulósica e, dessa forma, produção do bioetanol de segunda geração (COOPER et al., 2020; GURAGAIN et al., 2011).

3.4.1.2 Segunda Geração

Devido aos problemas relacionados a produção de etanol de primeira geração, surge como alternativa a produção de etanol de segunda geração (Figura 9). Neste processo, um método mais sustentável é usado para produzir biocombustíveis.

Figura 9 – Produção de bioetanol de segunda geração



Fonte: Autor

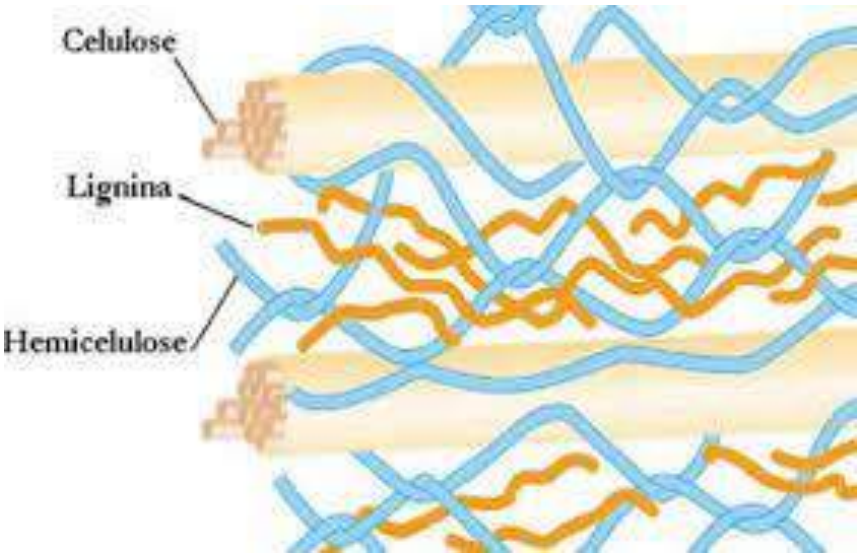
As biomassas lignocelulósicas, consideradas abundantes e economicamente sustentáveis, podem ser provenientes de qualquer material vegetal como: palha de arroz, palha de trigo, algodão, palha de milho, bagaço de cana, resíduos de papéis, entre outras. Essas matérias primais são descartadas durante o desenvolvimento de atividades agrícolas em abundância e, portanto, têm sido consideradas promissoras para a produção de bioetanol de segunda geração (CHOHAN et al., 2020; PRASAD et al., 2019; TRINH et al., 2019).

O carbono emitido e/ou consumido na combustão é neutro ou até negativo. A matéria-prima mais utilizada é o material lignocelulósico, composto por materiais mais abundante de biomassa não comestível disponível a partir de diversas plantas. Porém, a rentabilidade nessa geração de biocombustíveis ainda necessita de muitas pesquisas e desenvolvimento visando a redução dos custos de processo (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019; JAMBO et al., 2016).

Neste cenário, o uso de resíduos vegetais tem despertado atenção dos pesquisadores por grande variedade de fontes, tais como matérias-primas que gerem calor e eletricidade por queima direta ou que seja designado para tratamento de águas residuais. Assim, uma grande variedade de materiais descartados pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, como os resíduos agrícolas, álamos, salgueiro, eucalipto, capim, cana de açúcar e, madeira, que consistem principalmente de componentes polissacarídeos (75%) (DAVE et al., 2019).

Estes polissacarídeos contêm um alto teor de açúcar que é ideal para a produção de biocombustíveis. Esses materiais são compostos de lignina (10 a 40% da composição do material), celulose (40 a 45 % da composição) e, hemicelulose (25 a 50 % da composição), cujas estruturas são grandes e complexas (Figura 10) sendo unidas através de forças intermoleculares como ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, entre outras (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019; AKRAM et al., 2018).

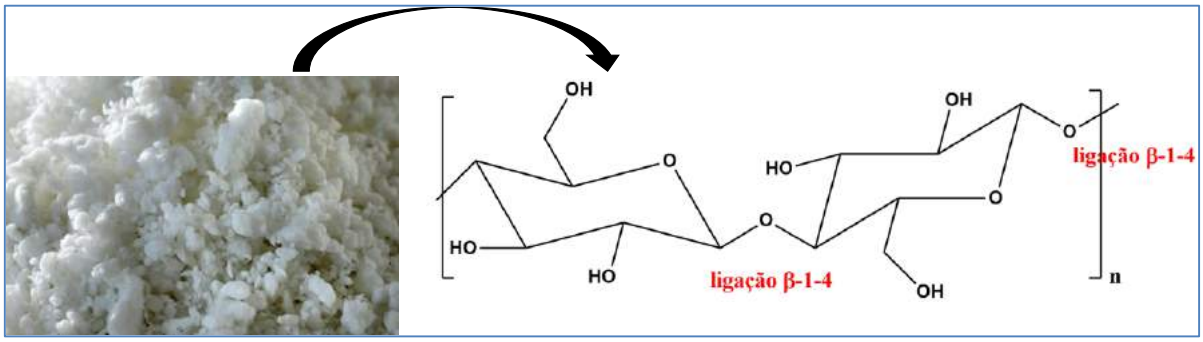
Figura 10 – Complexo Lignina, celulose, hemicelulose



Fonte: CORREIA et al., 2011

Destes componentes, a celulose é considerada o polímero linear homogêneo, insolúvel e cristalino mais abundante na natureza. Esse polímero é constituído por unidades glicosídicas unidas através de ligações β1-4 e, repletas de interações de van der Waals e, ligações de hidrogênio (Figura 11) (PRASAD et al., 2019).

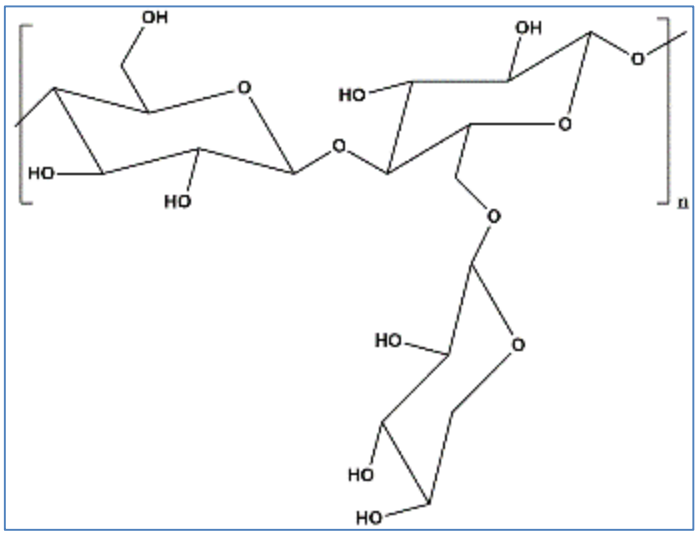
Figura 11 – Representação da cadeia da celulose



Fonte: Autor “adaptado de” Jornal Diário do Comércio

Já, a hemicelulose é considerada um polímero heterogêneo compostos, principalmente, de unidades de glicose, xilose, galactose, entre outras unidas através de ligações glicosídicas 1→3, 1→6 e, 1→4 (Figura 12) (PRASAD et al., 2019; ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

Figura 12 – Representação da hemicelulose

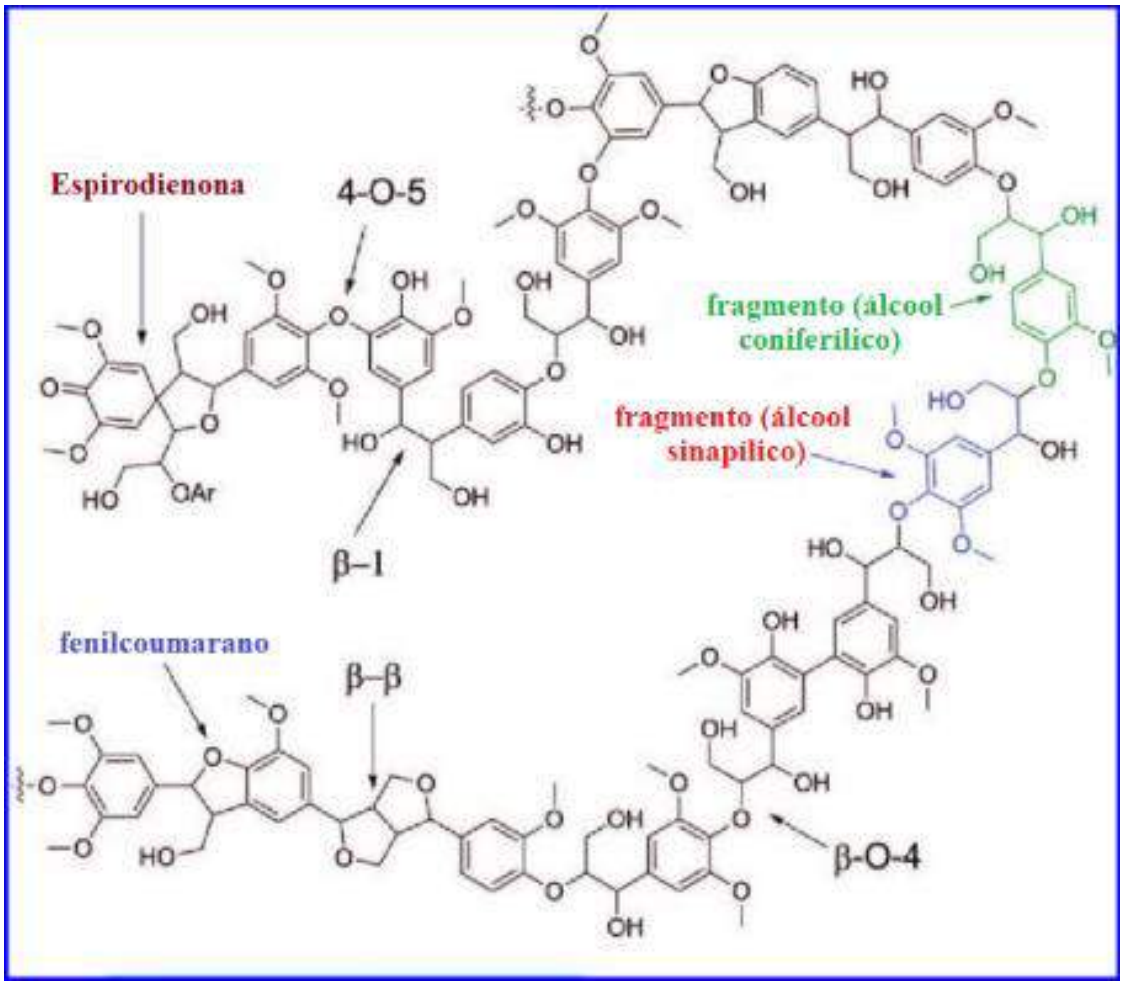


Fonte: Autor

O último componente, a lignina, é um polímero fenilpropanoídico responsável pela resistência do material vegetal, formado, principalmente pela união de unidades

guaiacílica, *p*-hidroxifenólicoas e, siringila presentes em diferentes proporções dependendo da espécie envolvida (Figura 13) (PRASAD et al., 2019).

Figura 13 – Representação da lignina



Fonte: Autor “adaptado de” Zakzeski et al., 2010.

3.4.1.3 Terceira geração

Devido, principalmente, ao elevado custo do processo de produção do bioetanol de segunda geração, surge como alternativa a produção do bioetanol de terceira geração. O foco desse processo é utilizar vários tipos de organismos marinhos como a macroalgas e microalgas como fontes de açúcares (JAMBO et al., 2016).

Essas espécies apresentam como vantagem a ausência de lignina e o rápido crescimento, o que torna o processo ideal para a conversão a bioetanol visando a redução dos custos do processo (DAVE et al., 2019).

3.4.1.4 Quarta geração

A tecnologia na produção de biocombustível tem evoluído até chegar nos microrganismos geneticamente modificados capazes de utilizar como fontes de açúcares lignocelulósicos, microalgas, algas e, até mesmo, cianobactérias.

Nesta etapa os microrganismos são capazes de converter CO_2 em combustível através da fotossíntese. Este processo tem algumas vantagens como a alta taxa de crescimento das microalgas e a baixa complexidade estrutural, aumentando as aplicações comerciais (ABDULLAH et al., 2019; ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

3.5 CANA DE AÇÚCAR

A cana de açúcar (gênero *Saccharum*) (Figura 14), uma monocotiledônea perene, foi descoberta na Nova Guine e é considerada essência da doçura. De lá foi levada para Índia, local que se tem os primeiros registros da existência e, atualmente, é cultivada em 104 países e ocupa aproximadamente 26 milhões de hectares sendo considerada uma das principais comodities do mundo (GRASSI; PEREIRA, 2019).

Figura 14 – Foto ilustrativa da cana de açúcar

Fonte: BHOSALE, 2019

No Brasil, a cana de açúcar foi introduzida em meados de 1530 por Martin Alfonso de Sousa, que iniciou o cultivo na Capitania de São Vicente na região de São Paulo, local em que ele construiu o primeiro engenho de açúcar. Porém, foi no Nordeste do Brasil que os engenhos se multiplicaram, sendo nessa região

concentrados os principais exportadores na época para Europa durante quatro séculos (XVI ao XVII) (PAZUCH et al., 2017; MACHADO, 2003).

Aos poucos, seu cultivo foi sendo ampliado e, atualmente, o Brasil se tornou o principal produtor de cana de açúcar, sendo responsável por aproximadamente 40 % de toda a produção, o que equivale a aproximadamente 2,5 milhões de toneladas por ano (MOREIRA et al., 2018; ARIF; CLARK; LAKE, 2017).

A cana é um insumo muito importante na produção de açúcar para o consumo humano. Além disso, ela pode ser utilizada na obtenção de bioetanol mediante a fermentação destes açúcares. Porém, outros vegetais podem ser utilizados como a beterraba, mandioca, milho e, celulose extraída de biomassa que vem sendo foco de inúmeras pesquisas relacionadas a produção de etanol de segunda geração.

Porém, para se utilizar essa biomassa, existe a necessidade da reação de pré-tratamentos. Assim, dentre as diversas alternativas, o tratamento com líquidos iônicos vem se mostrando eficiente devido, principalmente as características do mesmo bem como a redução de resíduos industriais.

3.6 TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O processo de produção de bioetanol de segunda geração, também conhecido como bioetanol lignicelulósico, se baseia nas deficiências de produção do de primeira geração. Esse processo tem como matéria prima resíduos lignocelulósicos provenientes, principalmente, de processos agroindustriais (DIAS et al., 2012).

Sua produção engloba uma variedade de métodos de pré-tratamento da biomassa, o que leva ao desenvolvimento de muitos fluxogramas de operação, principalmente devido a variação da composição da biomassa (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição química da biomassa lignocelulósica

Tipo de lignocelulose	Composição química		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Palha de milho	38-40	24-26	7-19
Folhas e grama	15,3	10,5	43,8
Bagaço da cana-de-açúcar	42-48	19-25	20-42
Palha de trigo	33-38	26-32	17-19
Bagaço de sorgo doce	34-45	18-27	14-21

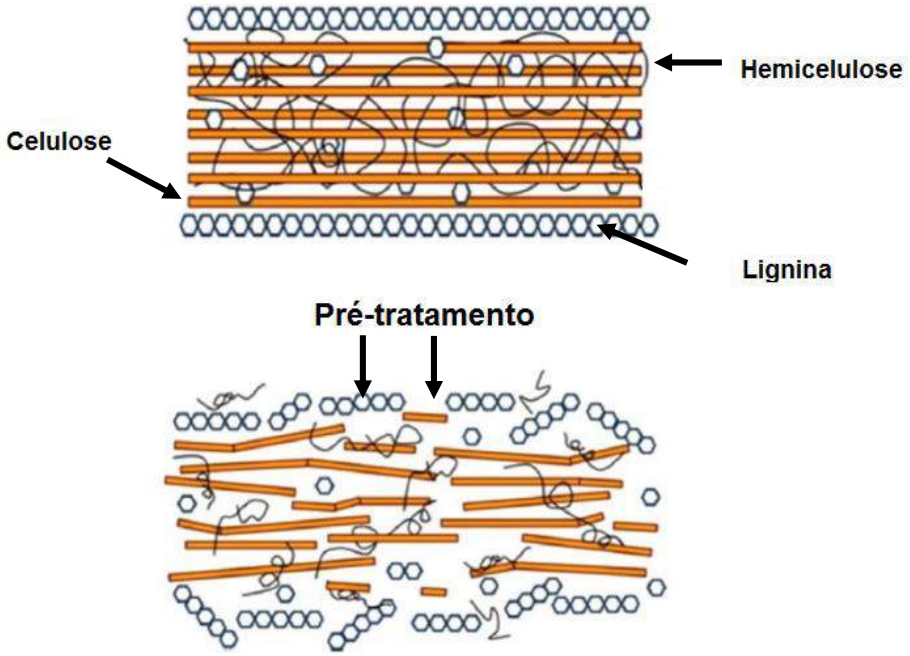
Fonte: Autor “adaptado de” Ayodele; Alsaffar; Mustapa, 2019.

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo, entretanto, é essencial para garantir um ótimo rendimento da produção do açúcar a partir dos polissacarídeos, pois a produção destes a partir da hidrólise enzimática sem o pré-tratamento tem um rendimento de 20% sendo que, com o pré-tratamento, esse rendimento aumenta para mais de 90% (OJEDA; SANCHEZ; KAFAROV, 2011).

Logo, o desafio do processo de produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica é o pré-tratamento da matéria-prima que consiste na quebra da matriz da celulose – hemicelulose que são envolvidas pela lignina (Figura 15).

Neste processo, muitas vezes, ocorre redução da cristalinidade da celulose e aumento da fração da celulose amorfa, o que facilita a reação enzimática (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

Figura 15 – Lignocelulósicos antes e após o pré-tratamento



Fonte: Autor “adaptado de” Mood et al., 2013

O processo de separação destes componentes químicos da biomassa torna-se complexo devido ao fato de a celulose estar geralmente interligada com a hemicelulose e envolvida pela lignina, dificultando a liberação de açucares fermentescíveis por hidrólise. Assim, para a produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, existem 4 grandes etapas envolvidas:

- Etapa 1: pré-tratamento da biomassa que consiste em quebrar o complexo formado pela lignina-hemicelulose-celulose para que este seja suscetível a hidrólise.
- Etapa 2: hidrólise da celulose e a hemicelulose visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.
- Etapa 3: fermentação desses açúcares para obtenção do etanol.
- Etapa 4: recuperação e concentração do produto pela destilação (GURAGAIN et al., 2011).

Cada uma dessa etapas do processo de produção necessitam de muitos desafios visando o aumento da produtividade sendo que, dentre eles, o pré-tratamento é o maior dos problemas de processo devido ao elevado custo para a indústria do bioetanol, já excluindo o custo da planta (GURAGAIN et al., 2011).

Dessa forma, levando-se em consideração a composição da biomassa lignocelulósica, atualmente, as pesquisas relacionadas a produção de bioetanol de segunda geração estão concentradas na aplicação de eficientes tecnologias para o pré-tratamento a fim de romper o complexo lignina-celulose –hemicelulose.

Assim, ocorrer a separação da celulose e hemicelulose, da lignina para, na etapa posterior, se realizar a conversão desses materiais poliméricos em açucares fermentescíveis mediante realização de processos de hidrólise como, por exemplo, os enzimáticos.

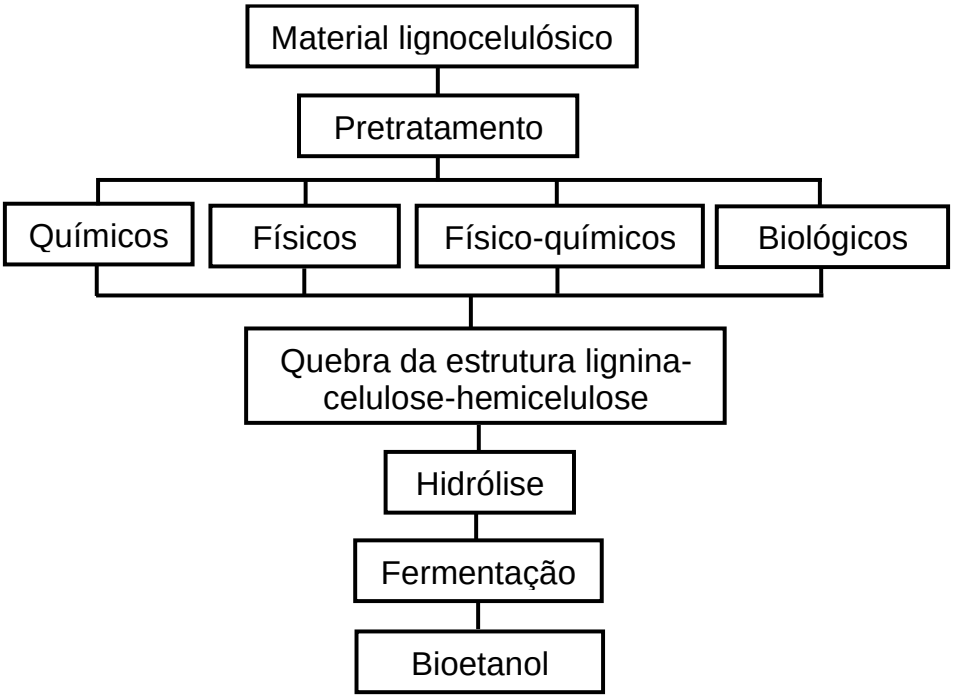
Para isso, são descritos muitos métodos de pré-tratamento a partir da biomassa lignocelulósica para a produção do bioetanol sendo, alguns deles, somente tratamentos iniciais do material e, outros, de hidrólise e fermentação, etapas necessárias para a produção do biocombustível (Figura 16) (PRASAD et al., 2019).

A etapa de pré-tratamento é fundamental no processo, uma vez que, a eficiência desse processo leva a um rendimento direto dos açucares fermentescíveis, evitando a degradação espontânea dos açucares formados.

Um processo eficiente também evita a formação de inibidores e, diminui o custo e demanda de energia em geral (ADITIYA, 2016; THANGAVELU, 2019). Dessa forma, é possível serem destacados como objetivos principais da realização do pré-tratamento na produção de bioetanol:

- Favorecimento da exposição dos componentes (hemicelulose, celulose) antes da hidrólise para atingir um amento nos teores de açucares redutores.
- Redução de tamanho do material físico (moagem).
- Favorecimento do acesso da celulose e hemicelulose à hidrolise.
- Diminuição do grau de cristalinidade da matriz de celulose (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA,2019; ADITIYA, 2016)

Figura 16 – Etapas da produção de etanol de segunda geração



Fonte: Autor “adaptado de” Prasad et al., 2019.

Dessa forma, existem vários tipos de pré-tratamento sendo que, na tabela 7 são descritos os principais métodos disponíveis de pré-tratamento que podem ser aplicados na produção de bioetanol de segunda geração, além das vantagens e desvantagens destes métodos. (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA,2019; ADITIYA, 2016).

Destes métodos, destacam-se os biológicos como a digestão anaeróbica e aeróbica e; os físico-químicos como os métodos de oxidação, hidrólise, entre outros, sendo importante salientar que todos os métodos visam, principalmente, reduzir a interação lignina-celulose-hemicelulose (COOPER et al., 2020; PRASAD et al., 2019; ZHAO; DAMGAARD; CHRISTENSEN, 2018).

Tabela 7 – Métodos de pré-tratamento do material lignocelulósico

Método	Procedimento	Exemplos de materiais pré-tratados
1) Métodos físicos		
Redução do tamanho mecânico	Corte e moagem	Madeira, palha, palha de milho, alfafa, bagaço da cana e, do sorgo
Pirólise	T > 300ºC, despois esfria e condensa	Madeira, resíduos de algodão, palha de milho
2) Métodos físico-químicos		
Explosão ao vapor	Vapor saturado a 160-290ºC, p = 0,69-4,85 Mpa por alguns segundos a alguns minutos, depois ocorre a descompressão até atingir a pressão atmosférica	Álamos, eucalipto, caule do milho, palha de trigo, palha de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, e alfafa
Líquido com água quente (LHW)	Água quente pressurizada, p > 5Mpa, T = 170-230ºC, 1-46 min; carga sólida de até 20%	Bagaço, palha de milho, polpa de azeitona, e fibra de alfafa
Explosão da fibra com amônia (AFEX)	1-2Kg de amônia/ Kg de biomassa seca, 90ºC, 30 min., p = 1,12-1,36 MPa	Lascas de madeira, bagaço, palha de trigo, palha de cevada, casca de arroz, palha de milho, e alfafa.
Explosão com CO_2	4 Kg de CO_2/Kg de fibra, p = 5,62 MPa	Bagaço, alfafa, e papel reciclado
Ozonólise	Ozônio, temperatura ambiente e pressão	Álamo, serragem, pinho, bagaço, palha de algodão, feno verde, e amendoim
Hidrólise com ácido diluído	0,75%-5% H_2SO_4, HCl ou HNO_3, p = 1 Mpa. Processo contínuo para carga baixa de sólidos (5 – 10% em massa de substrato/mistura); T = 160-200ºC; processo em batelada para carga alta de sólidos (10 – 40% em massa de substrato/mistura); T = 120-160ºC	Bagaço da madeira do álamo, resíduo de milho, palha de trigo, palha de centeio, e casca de arroz
Hidrólise com ácido concentrado	10-305 H_2SO_4, 170-190ºC, 1:1,6 de proporção de solido-líquido; 21-60% de ácido peracético; sistema tipo silo	Serragem de álamo e bagaço
Hidrólise alcalina	NaOH diluído, 24h, 60ºC; $Ca(OH)_2$, 4h, 120ºC; pode ser complementado com a adição de H_2O_2 (0,5-2,15% em volume) a baixa temperatura (35ºC)	Madeira dura, bagaço, resíduos de milho, palhas contendo pouca lignina (10-18%), e folhas de cana
Processo Organosolv	Solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, etileno glicol, trietileno glicol) ou as suas misturas com 1% de H_2SO_4 ou HCl. 185-198ºC, 30-60 min., pH = 2,0-3,4	Mistura de madeira de álamo com madeira leve (picea, pinho, abeto)
3) Métodos biológicos		
Pré-tratamento com fungos	Fungo lignolítico; produção de celulase e hemicelulase pela fermentação da biomassa em fase sólida	Resíduos de milho e palha de trigo
Pré-tratamento com Bioorganosolv	*Ceriporiopsis subvermispora* por 2-8 semanas, seguido de etanólise a 140-200ºC por 2h	Madeira de faia

Fonte: Autor “adaptado de” Saini; Saini; Tewari, 2015

3.7 TRATAMENTO DE LIGNOCELULÓSICOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS

A realização de tratamentos de materiais lignicelulósicos com líquidos iônicos tem sido estudada por diversos pesquisadores sendo necessária uma compreensão da sua definição e aplicabilidade.

3.7.1 Líquido iônico

A química verde tornou-se um dos principais focos na indústria, e surgiu como umas das principais aplicações em ciência e engenharia, na qual prioriza essencialmente a redução de uso de solventes e reagentes tóxicos. Por esse motivo, diversos pesquisadores ao longo do tempo têm focado suas pesquisas em solventes verdes sendo, os líquidos iônicos (LIs) considerados ecologicamente corretos no uso em processos químicos, reduzindo a exposição a vapores tóxicos e minimizando o desperdício de solventes (LAWAL et al.,2019; SAS et al., 2018).

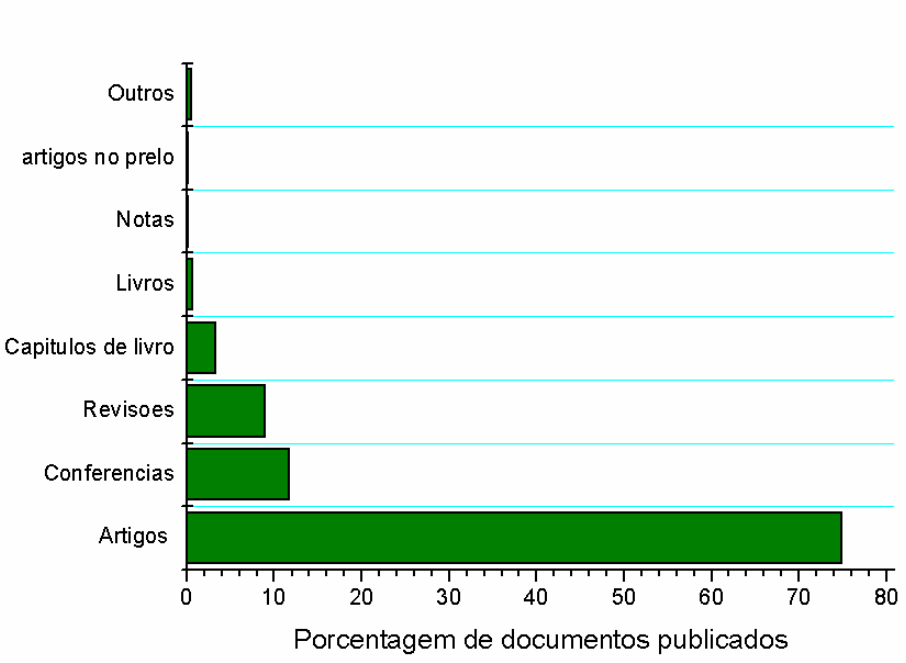
Os LIs têm chamado a atenção de pesquisadores desde 1960, ano em que foi reportada a primeira síntese e aplicação nos EUA em eletrólitos de baterias térmicas. Porém, nos últimos anos ganharam maior atenção como solventes ecológicos devido a algumas propriedades como: elevada polaridade, alta solubilidade, baixa toxicidade, alta condutividade e, estabilidade térmica, miscibilidade em água e solventes orgânicos e, baixas pressões de vapor e combustibilidade (VERMA et al., 2019; LAWAL et al.,2019; SAS et al.,2018).

Os líquidos iônicos são definidos como sais orgânicos que apresentam pontos de fusão iguais ou inferiores a 100ºC. Eles são formados por cátions orgânicos relativamente grandes e, ânions orgânicos ou inorgânicos, relativamente pequenos. Devido as inúmeras possibilidades de combinação, representam um grupo significativo de compostos que possuem propriedades físico-químicas únicas dependendo da combinação de cátions e ânions (BORUŃ, 2018; SAJID et al.,2019, EGOROVA; ANANIKOV, 2018; SOARES, 2018).

Eles podem ser encontrados como líquido em uma faixa de temperatura mais ampla. Dessa forma, um elevado números de LIs podem ser sintetizados apenas alterando as combinações entre cátions e ânions, em uma estimativa de mais de 10^{18} LIs diferentes. Assim, ao longo dos anos, o número publicações com diferentes

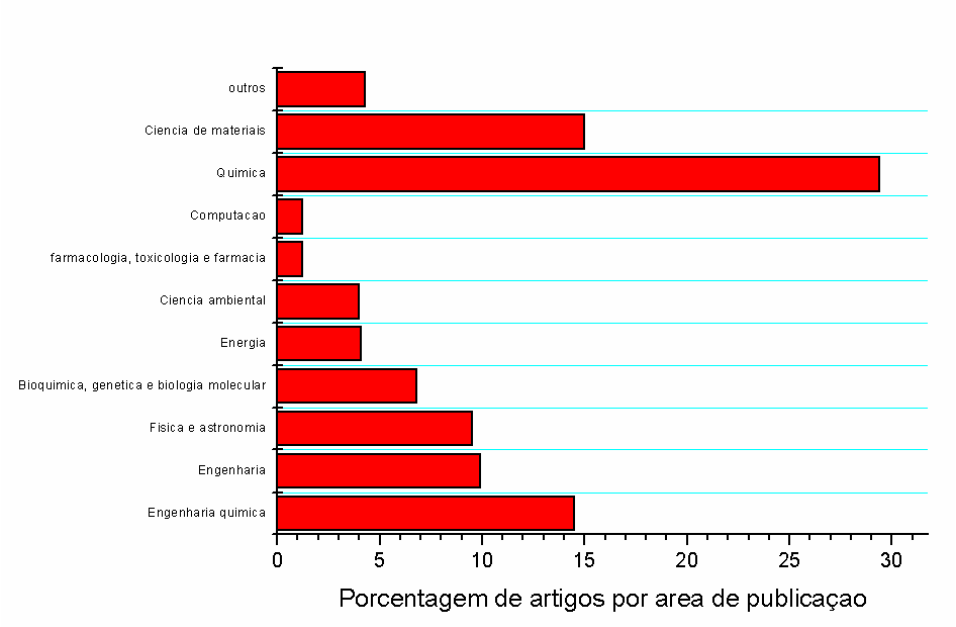
aplicações dos LIs tem aumentado muito, como ilustrado nas Figura 17 e 18, atualmente, chega a mais de 7000 (Tabela 8) destacando-se os artigos de aplicações na área química e ciências de materiais.

Figura 17 – Porcentagem de documentos publicados com líquidos iônicos



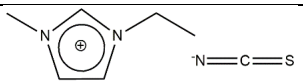
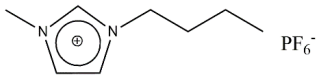
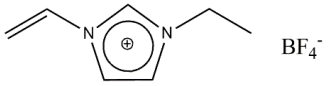
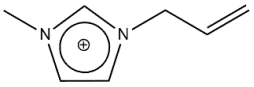
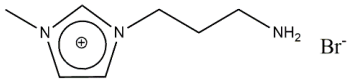
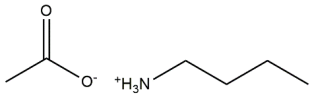
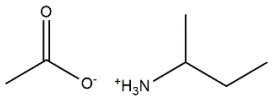
Fonte: Autor “adaptado de” Lawal et al.,2019

Figura 18 – Porcentagem de documentos publicados por área de estudo



Fonte: Autor “adaptado de” Lawal et al.,2019

Tabela 8 – Exemplos de líquidos iônicos

Líquido iônico	Nome	Abreviação
	tiocianato de 1-etil-3metil imidazólio	emim.SCN
	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio	bmim.PF6
	tetrafluoroborato de 1-vinil-3-etil imidazólio	veim.BF4
	cloreto de 1-alil-3-metil imidazólio	amim.Cl
	brometo de 1-aminopropil-3-metil imidazólio	apmim.Br
	acetato de n-butilamônio	nba.Ac
	acetato de sec-butilamônio	sba.Ac

Fonte: Autor “adaptado de” Soares, 2018; Andrade Neto et al., 2016.

Também cresceu o número de utilizações na indústria, destacando-se a utilização em catálises, processos eletroquímicos, na medicina, como solventes, processos analíticos e de separação, como método alternativo para extrações e purificações, em processos de polimerização, entre outros (LAWAL et al., 2019; SAJID et al.,2019; BORUŃ, 2018; EGOROVA; ANANIKOV,2018; NULWALA; MIRJAFARI; ZHOU; 2018; SOARES, 2018). Destes, os mais utilizados são os que apresentam como cátion o íon imidazólio porém, muitos avanços têm sido realizados na síntese de novos líquidos iônicos de baixo custo.

Por causas das sínteses relativamente fáceis, os líquidos iônicos são uma excelente classe de solventes de extração, assim, eles são considerados mais "verdes" em comparação aos solventes voláteis e inflamáveis convencionais e, dessa forma, os LIs estão sendo cada vez mais utilizados em campos da ciência e tecnologia como na indústria (SAJID et al., 2019).

Os LIs são classificados em diferentes grupos como: imidazólio, piridínio, tetralquilamônio, tetraalquilfosfônio e, assim, por diante. Os mais usados e estudados por serem mais estáveis são os que apresentam o grupo de imidazólio porém, os que apresentam o grupo acetato também vêm ganhando destaque devido ao baixo custo

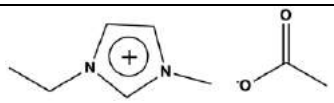
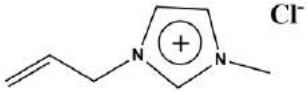
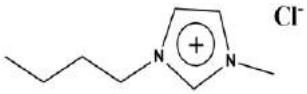
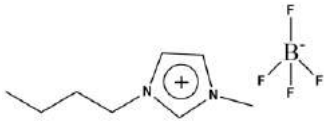
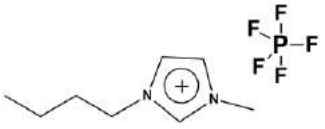
(ANDRADE NETO et al., 2016). A estrutura e o tipo de ânions e cátions ajudam a determinar a hidrofilicidade e a hidrofobicidade dos LIs bem como o tamanho das cadeias laterais. Assim, cadeias mais curtas resultam em maior hidrofilicidade dos LIs, enquanto cadeias laterais de mais longas resultam em maior hidrofobicidade (LAWAL et al., 2019).

3.7.2 Aplicação de líquidos iônicos no tratamento de lignocelulósicos

Nas últimas décadas, houve um interesse crescente na aplicação de líquidos iônicos no desenvolvimento de novas tecnologias em transformações químicas e biológicas, separações e, recentemente, no pré-tratamento de biomassa, como solventes para o processamento dessa biomassa lignocelulósica com o objetivo de desenvolver alternativas para o pré-tratamento lignocelulósico (MORA-PELE et al., 2011).

Esses estudos visam favorecer a quebra do complexo lignina-celulose-hemicelulose, uma vez que a recalcitrância da lignocelulose apresenta desafios para a conversão química e biológica em energia utilizável. Por tanto, a fase de pré-tratamento é crítica para o processo geral, pois deve aumentar a acessibilidade e a reatividade dos polissacarídeos desconstruindo a estrutura tridimensional do material lignocelulósico e quebrando a celulose e a hemicelulose semicristalina, sem degradação significativa dos polissacarídeos (MORA-PELE et al., 2011). Neste contexto, diversos líquidos iônicos têm se mostrado favoráveis (Tabela 9), o que mostra a importância do presente trabalho que teve como foco a utilização de LIs de baixo custo na etapa de tratamento do bagaço de cana.

Tabela 9 – Usos de diferentes LIs no tratamento da biomassa lignocelulósica

Líquido iônico	Estrutura	Aplicação
Acetato de 1 - etil - 3 - metilimidazólio		Dissolução da celulose, extração de lignina da farinha de madeira de bordo, dissolução de uma variedade de carboidratos, como açúcares, amido e celulose.
Cloreto de 1 - etil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose.
Cloreto de 1 - alil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose, dissolução de madeira dura e madeira macia, extração de lignina da farinha de madeira de bordo.
Cloreto de 1 - butil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose, pré-tratamento de celulose para melhorar a hidrólise enzimática, dissolução de madeira dura e madeira macia, extração de lignina da farinha de madeira de bordo.
Brometo de 1 - butil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose, dissolução da lignina.
Tetrafluoroborato de 1 - butil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose, extração de lignina da farinha de madeira de bordo.
Hexafluorofofato de 1 - butil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose, extração de lignina da farinha de madeira de bordo.
Cloreto de 1 - octil - 3 - metilimidazólio		Dissolução de celulose.

Fonte: Autor “adaptado de” MORA-PELE et al., 2011

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais, os equipamentos e as metodologias adotadas na parte experimental.

4.1 MATERIAIS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi necessária a utilização de:

a) Batata dextrose agar - BDA (Sigma Aldrich);
b) Etanol 95% (Dinâmica);
c) Sulfato de gentamicina (Sigma Aldrich);
d) Albumina bovina (Sigma Aldrich);
e) Polivinilpolipirrolidona – PVPP (Sigma Aldrich);
f) Glicose (Sigma Aldrich);
g) Agar-agar (Sigma Aldrich);
h) Carbonato de sódio (Dinâmica);
i) Vermelho Congo (Sigma Aldrich);
j) Coomassie Blue G25 (Sigma Aldrich);
k) *Sec*-butilamina (Sigma Aldrich);
l) Ácido Lático (Sigma Aldrich);
m) Imidazol (Sigma Aldrich);
n) Acetona (Synth);
o) Clorito de Sódio (Sigma Aldrich);
p) Óleo de Silicone (Synth);
q) Tetrahidrofurano P.A.(Cinética);
r) Ácido Acético Glacial (Neon);
s) Ácido Sulfúrico (Dinâmica);
t) 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich);
u) Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma Aldrich);
v) Azul de bromofenol (Sigma Aldrich);
w) Hidróxido de sódio (Dinâmica);
x) Ácido Cítrico Anidro (Dinâmica);
y) Celulase proveniente de *Trichoderma reesei* - ATCC 26921 (Sigma Aldrich);
z) Peptona (Sigma Aldrich);

aa) Extrato de levedura (Sigma Aldrich);
bb) Extrato de malte (Sigma Aldrich);
cc) Sulfato de amônio (Sigma Aldrich);
dd) Fosfato monobasico potássio (Dinâmica);
ee) Sulfato de magnésio (Sigma Aldrich);
ff) Cloreto de cálcio (Dinâmica);
gg) Ureia (Dinâmica);
hh) Sulfato de ferro (Dinâmica);
ii) Sulfato de manganês (Dinâmica);
jj) Sulfato de zinco (Dinâmica);
kk) Citrato de sódio (Dinâmica);
ll) Formaldeído (Dinâmica);
mm) Glicina (Sigma Aldrich);
nn) Acrilamida (Sigma Aldrich);
oo) *N,N*-Metileno-bisacrilamida (Sigma Aldrich);
pp) Persulfato de amônio (Sigma Aldrich);
qq) Agarose (Sigma Aldrich);
rr) Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma Aldrich);
ss) Metanol (Dinâmica);
tt) Dodecilssulfato de sódio – SDS (Sigma Aldrich);
uu) Ácido clorídrico (Dinâmica);
vv) Tris (Hidroximetil) Aminometano (Sigma Aldrich);
ww) Ácido sulfúrico (Dinâmica);
xx) Ácido fosfórico (Dinâmica);
yy) Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma Aldrich);
zz) Ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma Aldrich);
aaa) Ácido tricloroacético (TCA) (Dinâmica).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram:

a) Moinho de facas tipo Willye (TE-6500 da Tecnal) para realização da moagem;
b) Estufa modelo 515ª da Fanem, para realização das secagems;

c) Autoclave horizontal (SOC. FABBE LTDA) para esterilização dos materiais e meios de cultura;
d) Centrífuga refrigerada de bancada Universal 32 R da Hettich para a realização das centrifugações;
e) Freezer -80°C Panassonic para armazenamento dos extratos enzimáticos e frações pré-purificadas;
f) Câmara climatizada Panassonic para realização do crescimento dos fungos endofíticos;
g) Espectrofotômetro UV/VIS da Quimis para a realização das dosagens proteicas bem como determinação da atividade enzimáticas;
h) Capela de fluxo laminar Veco para a realização dos cortes vegetais, inoculações e repiques dos meios.
i) Shaker orbital Shaker Innova 43-Incubator Shaker Series para a realização das reações e, também, do crescimento em meio líquido dos fungos endofíticos;
j) Ultrasson Ultraclear modelo USC 1600 A para auxiliar na solubilização da solução de sais;
k) Bomba t-Station 75 Edwards para realização das filtrações;
l) Pipeta eletrônica Brand 0,5-5 mL para a realização das quantificações;
m) Sistema de eletroforese (Cuba eletroforese vertical OWL P8DS+ Fonte EC300 XL) Thermo para realização das análises dos extratos enzimáticos e frações;
n) Cromatógrafo Shimadzu composto por bombas LC-20AD, detector de Índice de Refração RID-10A, Detector UV SPD-20A, Forno para coluna CTO-20A e controlador CBM-20A; para a realização das quantificações;
o) Coluna Aminex ® HPX-87H, 300 mmX7,8 mm (BioRad) para a realização das análises cromatográficas;
p) Microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-7500F para avaliação das morfologias dos materiais.

4.3 METODOLOGIAS

A seguir, nos itens 4.3.1 até 4.3.3, estão descritas as metodologias aplicadas no presente trabalho.

4.3.1 Obtenção de celulases a partir dos fungos

Para a obtenção de celulases a partir dos fungos endofíticos associados a caules de mandioca foram utilizados os procedimentos descritos nos itens 4.3.1.1 a 4.3.1.8.

4.3.1.1 Crescimento dos fungos a partir dos caules de mandioca

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente foi realizado o crescimento em meio batata dextrose ágar (BDA) de fungos associados a caules de mandioca isolados e identificados durante a realização de trabalhos anteriores conduzidos por Morandim-Giannetti e colaboradores (Tabela 10).

Tabela 10 – Fungos utilizados na avaliação da produção de celulases

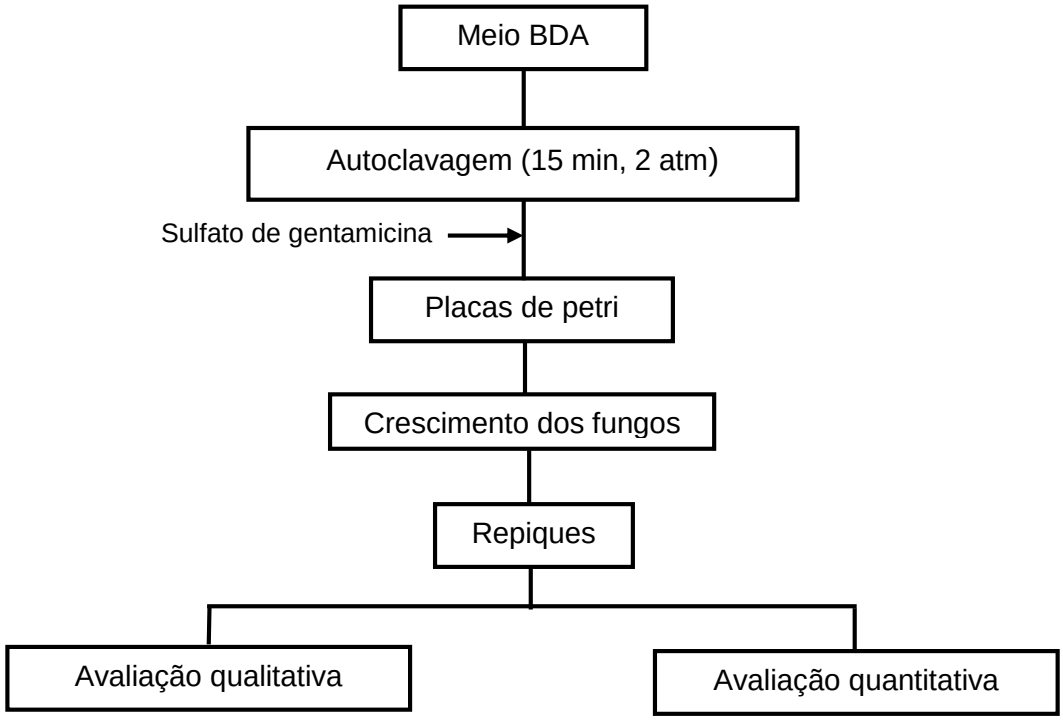
Fungo	Identificação
Microdochium lycopodinum	CA1
Colletotrichum sp.	CA2
Cladosporium sp.	CA3
Alternaria sp.	CA5
Phomopsis sp.	CA7
Diaporthe phaseolorum	CA8
Diaporthe endophytica	CA9
Vouchered mycorrhizae	CA10
Phanerochaete australis	CA11
Diaporthe caatingaensis	CA12
Stenocarpella maydis	CA13
Annulohypoxylon stygium	CA14
Sordariomycetes sp.	CA15
Phanerochaetaceae sp.	CA17

Fonte: Autor

Dessa forma, foi realizado o preparo do meio utilizando-se uma concentração de 39 $g.L^{-1}$ de BDA. Este meio foi autoclavado durante 15 min sob pressão de 2 atm. Após essa etapa, foi adicionado ao meio a solução de sulfato de gentamicina de 30$\mu g.mL^{-1}$ para prever futuro crescimento de bactérias, sendo esta mistura adicionada em placas de petri. Todos os fungos isolados e armazenados em tubos lacrados

contendo meio BDA a 4ºC foram submetidos ao crescimento nas placas durante uma semana, sendo realizados 3 repiques consecutivos. Posteriormente ao terceiro repique, todos os fungos foram submetidos a avaliação qualitativa da presença de celulases (Figura 19).

Figura 19 – Fluxograma do processo de crescimento dos fungos



Fonte: Autor

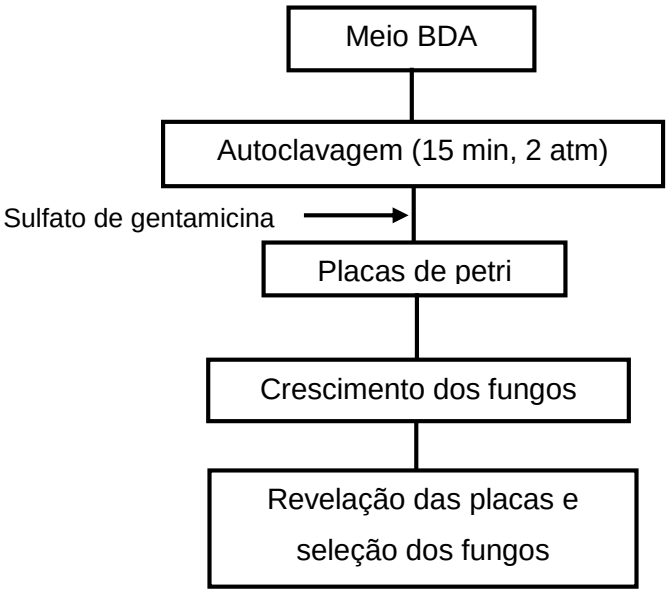
4.3.1.2 Avaliação qualitativa da produção de celulase

Posteriormente a realização do crescimento dos fungos em meio BDA e subsequentes repiques, foi realizada a avaliação qualitativa da produção de celulases pelos mesmos. Para isso, foi preparado um meio de cultura composto de glicose (10 $g.L^{-1}$), extrato de malte (0,1 $g.L^{-1}$), peptona (0,5 $g.L^{-1}$), amido (2 $g.L^{-1}$), ágar (16 $g.L^{-1}$) e, carboximetilcelulose (0,5 %).

Após a realização do processo de autoclavagem e adição do antibiótico sulfato de gentamicina, os fungos foram submetidos ao crescimento neste meio e, após 5 dias foi realizada a revelação das placas com uma solução do corante vermelho Congo (0,2 %) e, após essa etapa, foi realizada a adição de solução de cloreto de sódio 1 $mol.L^{-1}$ por 15 min (Figura 20). Após a revelação das placas, foram

selecionados os fungos que mostraram a presença de um halo castanho escuro devido a produção de celulases e, esses fungos, foram submetidos ao processo de extração enzimática para análise quantitativa da produção de celulases.

Figura 20 – Fluxograma da análise qualitativa



Fonte: Autor

4.3.1.3 Obtenção dos extratos enzimáticos

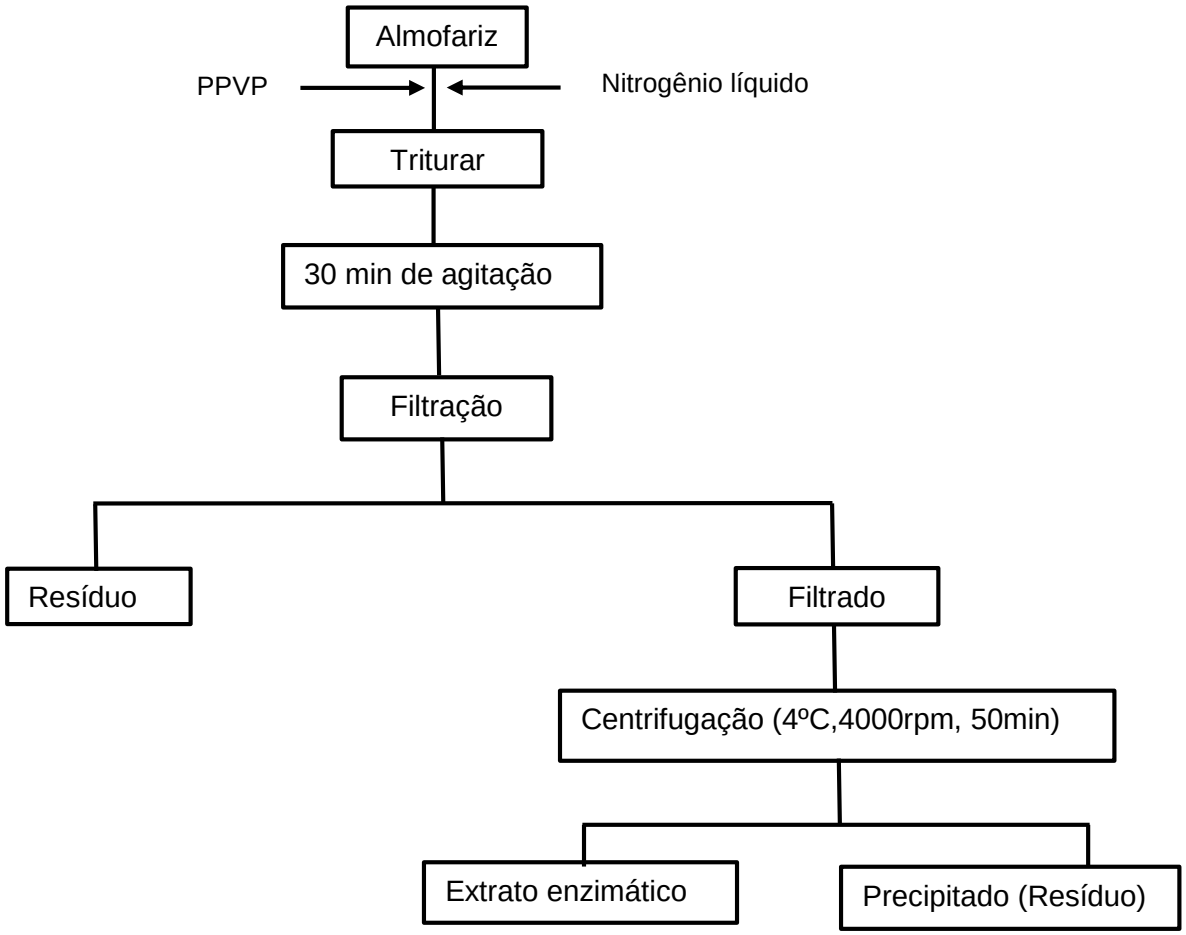
Após a avaliação qualitativa da produção de celulase pelos fungos endofíticos, foi realizada a avaliação quantitativa da produção de celulase por esses microrganismos. Para isso, realizou-se, inicialmente, o processo de extração enzimática. Assim, para cada um dos fungos selecionados anteriormente, foi realizada a avaliação quantitativa da produção de celulases, utilizando-se o processo ilustrado no fluxograma na Figura 21.

Durante a avaliação, os fungos foram submetidos ao processo de congelamento com nitrogênio líquido, seguido do processo de trituração em almofariz com pistilo, na presença de 1g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para facilitar o rompimento celular. Em seguida, foram adicionados, pouco a pouco, 30 mL de solução tampão citrato de sódio 0,1 $mol.L^{-1}$ pH 4,8 sendo obtido o extrato enzimático.

Essa mistura foi transferida para um béquer de 250 mL e submetida ao processo de agitação por 30min em banho de gelo, a fim de evitar uma desnaturação enzimática. Após os 30 min de agitação em banho de gelo, a mistura foi filtrada com

auxílio de gazes de algodão e, o filtrado submetido ao processo de centrifugação durante 40 min a 4ºC e 4000 rpm. Após essa etapa, o extrato enzimático foi utilizado na verificação da presença de celulases.

Figura 21 – Fluxograma da obtenção do extrato enzimático



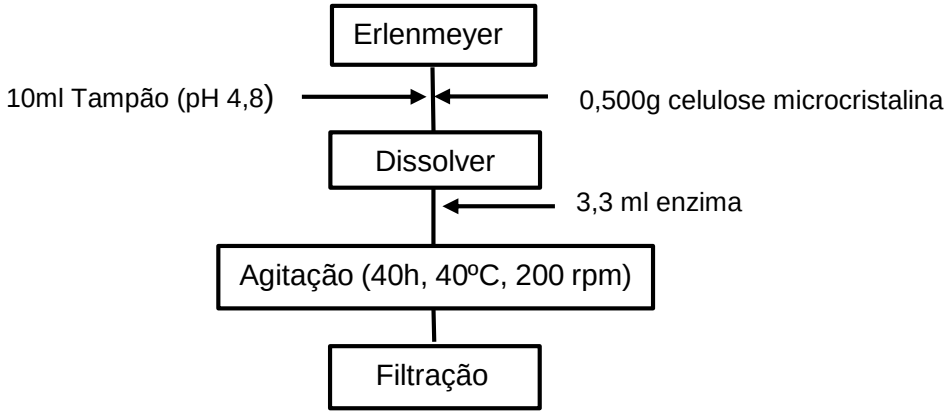
Fonte: Autor

4.3.1.4 Avaliação quantitativa da produção de celulases

Os testes quantitativos da produção de celulases nos extratos enzimáticos foram realizados de acordo o fluxograma apresentado na Figura 22. Para isso, 0,5 g de celulose microcristalina, 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 4,8 e, 3,3 mL de cada um dos extratos enzimáticos obtidos foram adicionados em erlenmeyers de 125 mL e submetidos ao processo de reação a 40ºC durante 40 h e 200 rpm. Após esse período, os materiais foram filtrados e analisados para determinação da

concentração de açúcares fermentescíveis via espectroscopia na região do visível/ultravioleta utilizando-se a metodologia do DNS, descrito no item 4.3.1.8.2.

Figura 22 – Fluxograma da avaliação da produção de celulases



Fonte: Autor

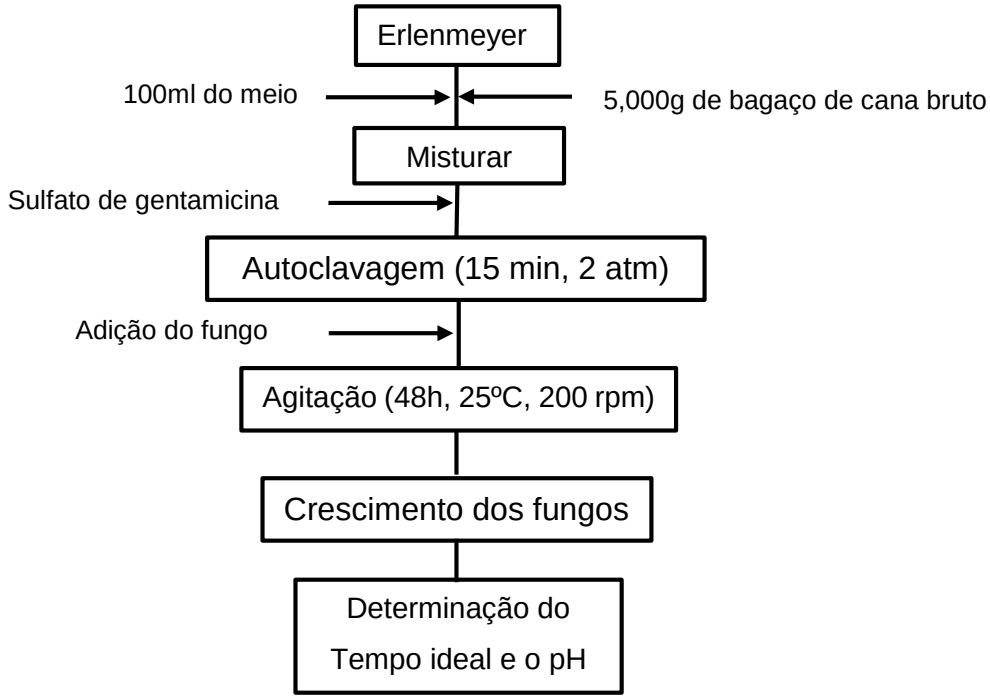
4.3.1.5 Crescimento dos fungos em meio específico para celulase

Após a seleção dos fungos com maior potencial de produção de celulases (CA14 e CA17), esses microrganimos foram submetidos ao processo de crescimento em meio semi-sólido como ilustrado no fluxograma da Figura 23.

No preparo do meio semi-sólido, foram adicionados em um erlenmeyer de 250ml 5 g de bagaço-de-cana e 100 mL de um meio líquido composto por: $(NH_4)_2SO_4$ 3,5 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 3,0 $g.L^{-1}$, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 $g.L^{-1}$, $CaCl_2$ 0,5 $g.L^{-1}$, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,20%, ureia 0,03% e, 0,1 % de uma mistura de sais composta por $FeSO_4.H_20$ 5 $mg.L^{-1}$, $MnSO_4.H_2O$ 1,6 $mg.L^{-1}$, $ZnSO_4.7H_2O$ 1,4 $mg.L^{-1}$.

Esse meio foi autoclavado durante 15 min sob pressão de 2 atm. Após essa etapa, foi adicionado ao meio o sulfato de gentamicina. Os fungos selecionados (CA14 e CA17) foram adicionados ao meio e os sistemas mantidos sob agitação em um shaker orbital por 48h a 28ºC e 100 rpm. Em seguida, os sistemas foram colocados numa câmara climatizada a 28ºC sendo esse procedimento utilizado durante a determinação do tempo ideal de crescimento para produção de celulases bem como determinação do pH ideal.

Figura 23 – Fluxograma do crescimento dos fungos no meio semi-sólido



Fonte: Autor

4.3.1.6 Determinação do tempo e pH ideais de crescimento do fungo

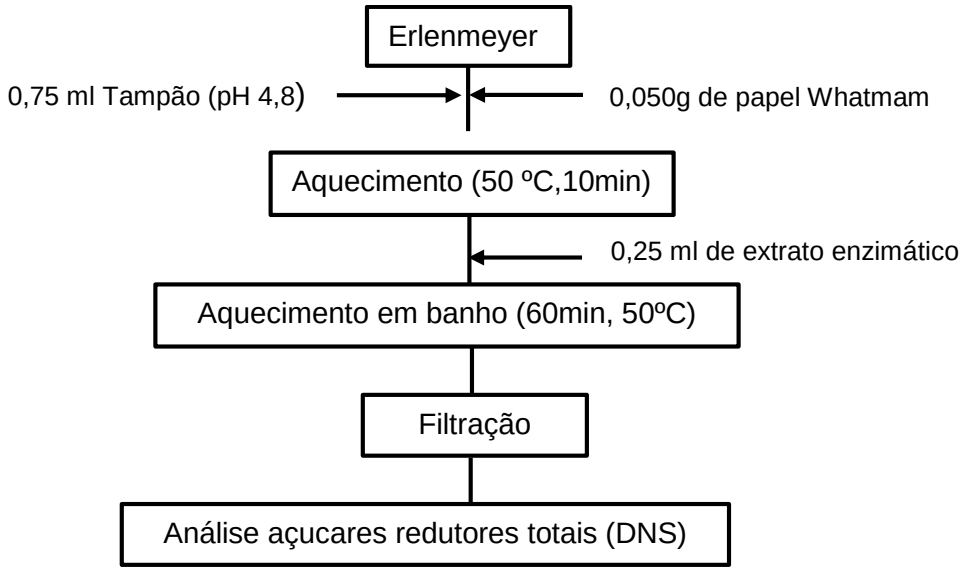
Após a seleção dos fungos com maior potencial para a produção de celulase (CA14 e CA17), esses microrganismos foram submetidos ao crescimento em meio semi-sólido por diferentes tempos (4, 6, 11, 13, 15 e, 18 dias) visando a determinação do tempo ideal de crescimento. Posteriormente, foi realizado um estudo dos pHs 3, 4, 5, 6, 7 para o fungo que mostrou maior produtividade (CA14), já que este tipo de fungo tem como preferência meios ácidos. Nesta etapa, os pHs foram ajustados utilizando-se soluções de ácido clorídrico ou, hidróxido de sódio 0,1 mol.L^{-1}. Para todos os extratos obtidos foi determinada a atividade enzimática por mL de extrato enzimático (FPU.mL^{-1}).

4.3.1.6.1 Determinação da atividade enzimática

Durante a determinação da atividade enzimática foi utilizado a metodologia descrita no fluxograma descrito na Figura 24. Durante a análise foi pesado 0,05 g de papel Whatmam nº 1 como fonte de celulose, e o mesmo foi adicionado em um tudo de ensaio contendo 0,75 mL de tampão citrato de sódio a 0,05 mol.L^{-1} pH 4,8 sendo

o sistema aquecido durante 10 min em banho a 50ºC visando o equilíbrio térmico do sistema. Após esse período, 0,25 mL de cada extrato enzimático foram adicionados ao sistema, separadamente, sendo a reação de hidrólise processada a 50ºC durante 1 h.

Figura 24 – Fluxograma da determinação da atividade enzimática



Fonte: Autor

Finalizado o processo, a concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do DNS sendo a atividade enzimática determinada utilizando-se a equação 1. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

$$FPU.mL^{-1} = \frac{\frac{[AR]}{180} x1000xV_{total}}{V_{enzima}xt_{reação}} \; [\mu mol.min^{-1}.mL^{-1}] \quad (1)$$

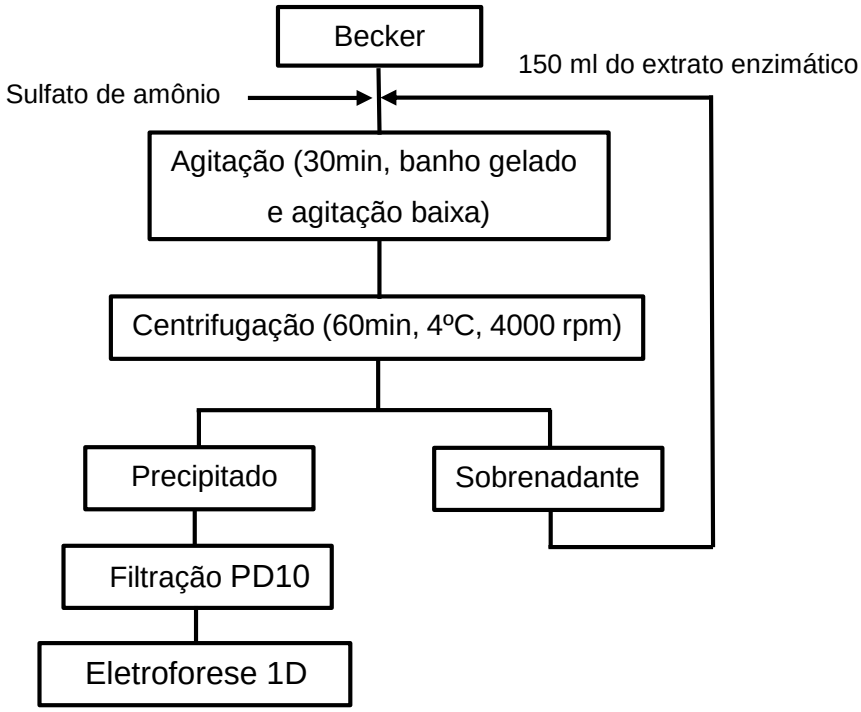
em que: $FPU.mL^{-1}$ representa a atividade enzimática por mL de extrato; [AR] a concentração de açúcares redutores total, V_{total} o volume total de solução (V_{enzima} + $V_{tampão}$), V_{enzima} representa o volume de extrato enzimático utilizado e, $t_{reação}$ o tempo de reação (60 min).

4.3.1.7 Enriquecimento dos extratos enzimáticos em celulases

Após a determinação do tempo e dos pHs ideais de crescimento do fungo CA14, o mesmo foi submetido ao crescimento no mesmo meio semi-sólido descrito no item 4.3.1.5, porém, em maiores quantidades com o objetivo de futuros testes e análises.

Após a etapa de crescimento e obtenção dos extratos enzimáticos, o mesmo foi analisado para determinação da atividade de celulases. Em seguida, visando a realização da pré-purificação das celulases, o extrato enzimático obtido foi submetido ao processo de precipitação salina utilizando-se sulfato de amônio, que foi adicionado em concentrações de 25, 50 e, 75 % de saturação (Figura 25).

Figura 25 – Fluxograma do enriquecimento dos extratos em celulose



Fonte: Autor

Todas as frações foram dessalinizadas em coluna PD10 e analisadas através da determinação da atividade de celulases bem como determinação da concentração proteica e via eletroforese 1D utilizando-se gel de poliacrilamida.

4.3.1.8 Caracterização da Celulase

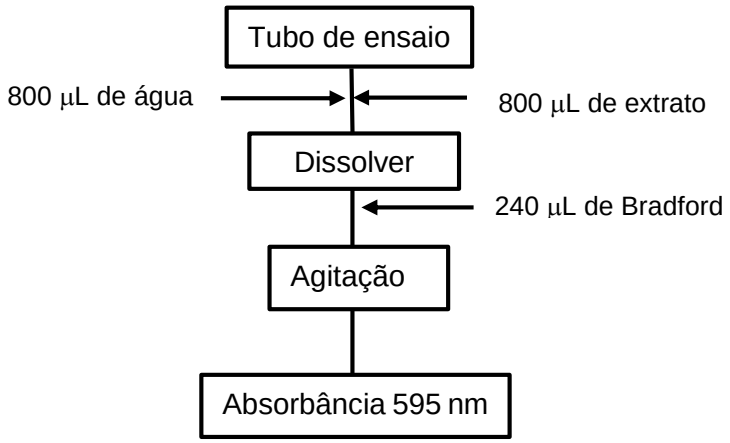
Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram realizados procedimentos de determinação da dosagem de proteínas, determinação da concentração de açúcares redutores total via espectrofotometria na região do ultravioleta/visível, determinação da concentração de glicose via HPLC e, avaliação do extrato enzimático mais ativo e frações provenientes da pré-purificação via eletroforese 1D.

4.3.1.8.1 Dosagem proteica

A concentração de proteínas presentes nos extratos enzimáticos foi realizada utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para isso, 800 μL de cada um dos extratos e/ou frações analisadas foram misturados com 800 μL de água e, 240 μL do reagente de Bradford como se explica no fluxograma da Figura 26:

Figura 26 – Fluxograma da dosagem proteica



Fonte: Autor

As misturas foram agitadas e analisadas em um espectrofotômetro UV/visível utilizando-se um comprimento de onda de 595 nm. Para obtenção da curva de calibração foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de albumina bovina.

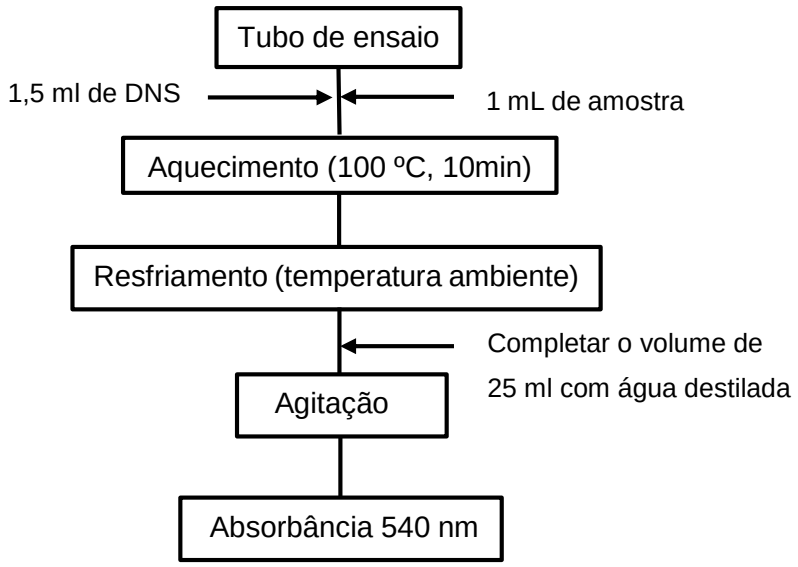
4.3.1.8.2 Determinação dos açúcares redutores totais

Durante a determinação da concentração de açúcares redutores totais foi realizada a análise via espectrofotometria na região do ultravioleta/visível utilizando-se a metodologia do DNS ilustrada no fluxograma da Figura 27.

Para isso, em um tubo de ensaio de 25 mL com tampa foram adicionados 1 mL de cada amostra, separadamente e 1,5 mL de uma solução de ácido dinitrosalicílico (DNS).

Posteriormente, a mistura foi submetida ao aquecimento, sob ebulição, durante 10 min e, após esse período, a amostra foi resfriada e diluída para 25 mL. A determinação da concentração de açúcares foi realizada a 540 nm sendo necessário, para isso, a construção de uma curva de calibração utilizando-se soluções de glicose com diferentes concentrações. Um branco foi preparado utilizando-se água no lugar da solução de açúcares.

Figura 27 – Fluxograma da metodologia ácido dinitrosalicílico (DNS)



Fonte: Autor

Para a determinação quantitativa dos açucares redutores totais foi utilizada a metodologia colorimétrica usando o ácido dinitrosalicílico, como reagente oxidante. Esse método consiste em analisar a cor resultante da reação entre o óxido do DNS e o grupo carbonílico livre dos açucares redutores (SANTOS et al., 2017).

4.3.1.8.3 Avaliação da concentração de glicose via HPLC

Análise da concentração de glicose foram realizadas via HPLC. Para isso foi utilizada uma coluna Aminex ® HPX-87H, 300 mmX7,8 mm (BioRad), um fluxo de 0,7 $mL.min^{-1}$, detector de índice de refração e, como fase móvel uma solução de ácido sulfúrico 0,005 $mol.L^{-1}$. Para realização das quantificações, foi obtida uma curva de calibração utilizando-se soluções de glicose com diferentes concentrações.

4.3.1.8.4 Eletroforese 1D em gel de poliacrilamida

O extrato enzimático obtido a partir de CA14 bem como as frações obtidas após a realização da pré-purificação via precipitação com sulfato de amônio foram inicialmente dessalinizadas através da eluição em PD10 e analisadas via eletroforese 1D utilizando-se gel de poliacrilamida 12,5 % (Tabela 11). Todas as frações foram comparadas com o padrão peso molecular descrito na tabela 12 sendo determinado o peso molecular aproximado da enzima de interesse.

Tabela 11 – Composição do gel utilizado para realização da eletroforese

Solução	Quantidade
Gel de separação	
Solução A (30 % acrilamida, 0,8 % bis-acrilamida)	4,2 mL
Solução B (750 mL de tampão TRIS/HCl pH 8,8, 2 $mol.L^{-1}$, 40 mL de SDS 10%, 210 mL de água)	2,5 mL
Água	3,3 mL
Persulfato de amônio 10%	50 μL
TEMED	5 μL
Gel de empacotamento	
Solução A (30 % acrilamida, 0,8 % bis-acrilamida)	0,67 mL
Solução C (500 mL de tampão TRIS/HCl pH 6,8, 1 $mol.L^{-1}$, 40 mL de SDS 10%, %, 210 mL de água)	1,0 mL
Água	2,3 mL
Persulfato de amônio 10%	37 μL
TEMED	5 μL

Fonte: Autor

O tampão utilizado durante a realização da análise foi o TRIS/glicina com adição de SDS. Já, as amostras e padrão peso molecular, foram preparados utilizando-se uma proporção 4:1 (amostra/tampão). Para isso, um tampão composto por 0,6 mL de tampão TRIS/HCl 1 mol.L^{-1} pH 6,8, 5 mL de uma solução de glicerina 50 %, 2 mL de SDS 10 %, 0,5 mL de 2-mercaptoetanol, 1 mL de azul de bromofenol 1 % e 0,9 mL de água foi preparado. Todas as amostras foram submetidas ao aquecimento por 5 minutos a 100 ºC e centrifugadas a 4000 rpm, antes da aplicação no gel de eletroforese.

Tabela 12 – Enzimas presentes no padrão (LMW-SDS Marker Kit)

Enzima	Pesos moleculares (Daltons)
Fosforilase b	97.400
Albumina sérica	66.200
Ovoalbumina	45.000
Anidrase carbônica	31.000
Inibidora de tripsina	21.500
α-lactalbumina	14.437

Fonte: Autor

No gel foram aplicados 20 μL de cada amostra e 10 μL do padrão peso molecular, sendo a corrida realizada utilizando-se uma corrente de 20 mA e uma voltagem de 120 V. Todos os géis foram revelados utilizando-se as etapas descritas na tabela 13. Após a revelação do gel foi determinada a possível banda referente a celulase envolvida na hidrólise do bagaço de cana e, seu peso molecular aproximado foi determinado.

Tabela 13 – Etapas para revelação do gel com Coomassie Blue G25

Etapas	**Tempo**
Fixação (Solução de ácido tricloroacético 10 % em etanol)	10 min
Coloração do gel (Solução Metanol - 40mL, Água - 50mL, Ácido Acético Glacial - 200mL, Coomassie Blue G25 – 0,6g)	20 min
Descolorante (Etanol - 400mL, Água - 400mL, Ácido Acético Glacial - 100mL)	15 min
Revelador (Solução de ácido acético glacial 5%)	*Overnight*

Fonte: Autor.

4.3.2 Produção e caracterização dos líquidos iônicos

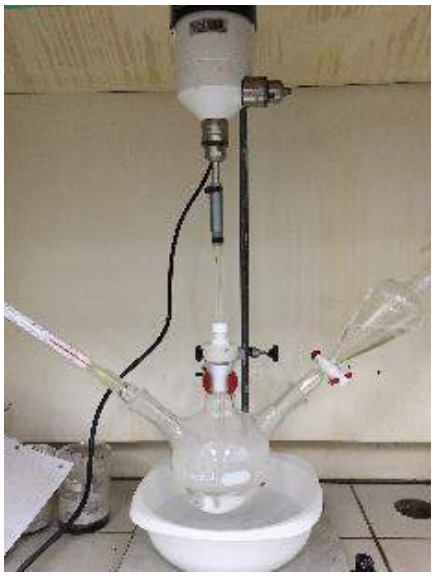
A síntese dos Líquidos Iônicos (LIs): o acetato de *sec*-butilamônio, o acetato de imidazólio, o lactato de *sec*-butilamônio e, o lactato de imidazólio, foi realizada utilizando-se uma reação de neutralização ácido-base (Figura 28). Para isso, realizou-se a mistura do ácido lático ou ácido acético em *sec*-butilamina ou imidazólio.

Durante a síntese dos líquidos iônicos acetato de *sec*-butilamônio e lactato de *sec*-butilamônio, adicionou-se a amina (*sec*-butilamina) ao balão de três bocas e, foi adicionado aos poucos o ácido (ácido láctico ou ácido acético), em proporções estequiométricas de 1:1 como se ilustrado na Figura 289. Já, no caso da síntese dos LIs o acetato de imidazólio e o lactato de imidazólio, foi realizada a adição da amina ao ácido lentamente devido ao fato da mesma ser sólida. Após o término das adições, o sistema foi mantido sob agitação por mais duas horas para se completar a reação.

Figura 28 – Reação de neutralização ácido base

Fonte: Autor

Figura 29 – Síntese do líquido Iônico



Fonte: Autor

Para comprovar a formação estrutural dos líquidos iônicos, realizou-se a caracterização via Ressonância Magnética Nuclear de carbono (^{13}C-RMN) e hidrogênio (^{1}H-RMN). As amostras foram preparadas adicionando 10mg do LI em um tubo próprio para RMN dissolvidas em 600 µL de clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e analisadas no espectrômetro Bruker, modelo Avance III 600 HD (600 MHz de prótons e 150 MHz de carbono) a qual foi realizada no Instituto de Química da UNESP, no Campus de Araraquara.

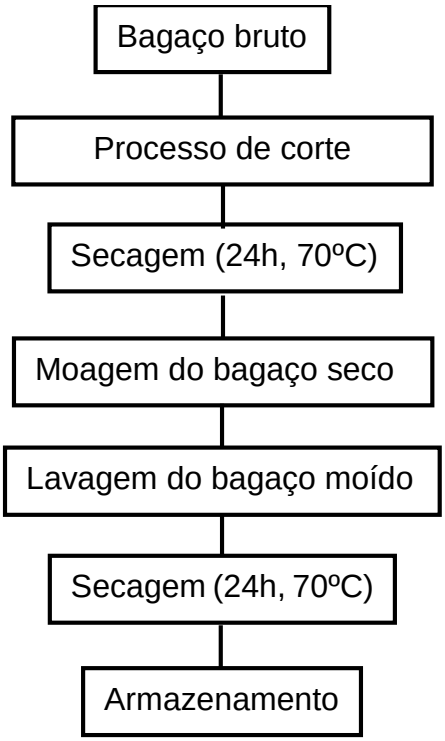
4.3.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico e hidrólise enzimática

Nos itens 4.3.3.1 até 4.3.3.4 estão descritos os procedimentos para o tratamento e o pré-tratamento do bagaço com o líquido iônico.

4.3.3.1 Tratamento inicial do bagaço de cana

O tratamento do bagaço de cana foi realizado conforme descrito no fluxograma representado na Figura 30.

Figura 30 – Fluxograma das etapas do tratamento do bagaço de cana



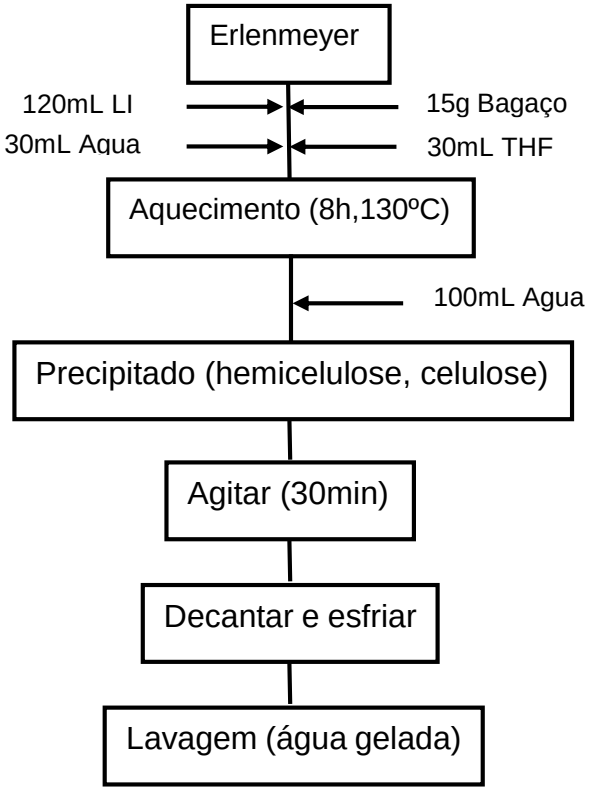
Fonte: Autor

Inicialmente o bagaço foi cortado manualmente em pedaços menores para depois serem secos a 70ºC por 24 h na estufa. Após essa etapa, o bagaço seco foi triturado em um moinho de facas tipo Wilye. O material triturado lavado com água em abundância para eliminação de açúcares residuais visando a eliminação de interferentes. Após essa etapa, o material foi transferido para uma bandeja de alumínio e secado em estufa, na mesma condição citada anteriormente. O produto foi armazenado em um recipiente próprio a uma temperatura controlada de 25ºC sendo, posteriormente, utilizado nas etapas de pré-tratamento.

4.3.3.2 Tratamento do bagaço de cana com os líquidos iônicos

Durante o tratamento do bagaço de cana com os LIs, foi utilizado o procedimento descrito no fluxograma da Figura 31.

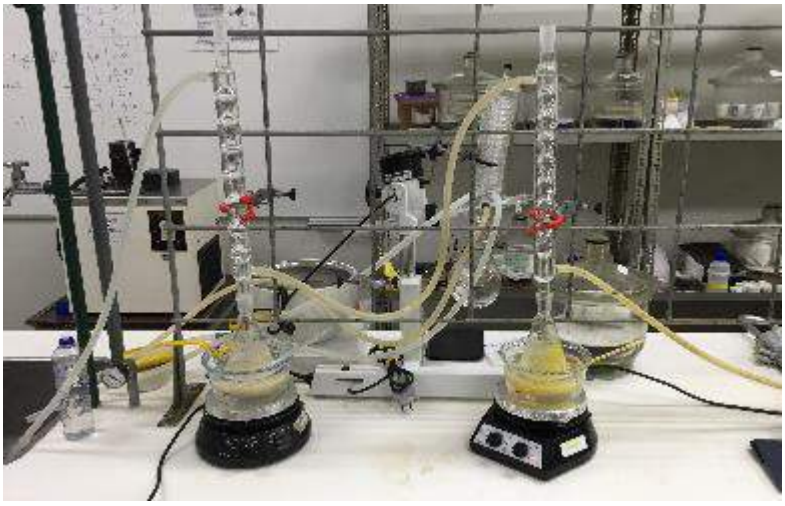
Figura 31 – Fluxograma do tratamento de bagaço com LIs.



Fonte: Autor

Em um erlenmeyer foram adicionados 15 g de bagaço, 120 ml de cada um dos líquidos iônicos separadamente (acetato de *sec*-butilamônio, acetato de imidazólio, lactato de *sec*-butilamônio e lactato de imidazólio) e, 30 ml de água destilada, em uma proporção de 40:10. Também foram adicionados aproximadamente 30 ml de Tetrahidrofurano (THF) para ajudar na fluidez da mistura. O Erlenmeyer contendo a mistura foi conectado em um sistema de refluxo e imergidos no banho de óleo de silicone. O sistema foi mantido sob agitação magnética e aquecimento a 130ºC durante 8h (Figura 32).

Figura 32 – Sistema de tratamento do bagaço com LIs



Fonte: Autor

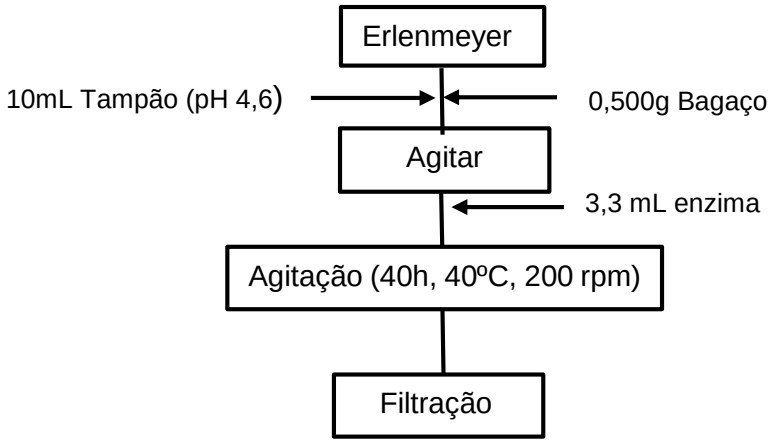
Posteriormente foram adicionados 100 ml de água destilada ao sistema sendo o mesmo mantido sob agitação por mais 30 min. Após esse período, realizou-se a lavagem sendo o material seco em estuda a 70º C por 24 h.

Também foi realizada uma segunda metodologia de tratamento do bagaço de cana com o líquido iônico para comparar e verificar a eficiência de cada uma, na qual a segunda se mostrou mais eficiente (acetato de *sec*-butilamônio) utilizando-se uma autoclave. Para isso, 115 g de bagaço foram colocados em contato com 150 mL do LI e submetidos ao processo de aquecimento em autoclave durante 2 h a 137ºC e 2 atm de pressão. Após a redução da pressão, o material foi retirado da autoclave sendo adicionados 100 mL de água. Posteriormente foi realizada a filtração, lavagem e, o material foi seco em estufa a 70ºC.

4.3.3.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado com os LIs

Na etapa da hidrólise enzimática, foi utilizada a metodologia descrita no fluxograma apresentado na Figura 33. Para cada procedimento foram pesados 0,5000 g do bagaço tratados com os diferentes LIs em erlenmeyer de 250 ml sendo que, em cada um dos erlenmeyers foram adicionados 10 mL de tampão citrato (pH 4,6) e 3,3 mL de uma solução 2g.L^{-1}da enzima celulase obtida de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (comercial) para obter um padrão. Todos os erlenmeyers foram colocados sob agitação de 200 rpm por 40h a 40ºC e, ao término dessa etapa, cada solução foi filtrada sendo o filtrado analisado via HPLC para determinação da concentração de glicose presente após o processo de hidrólise.

Figura 33 – Fluxograma da hidrólise enzimática do bagaço tratado com os LIs

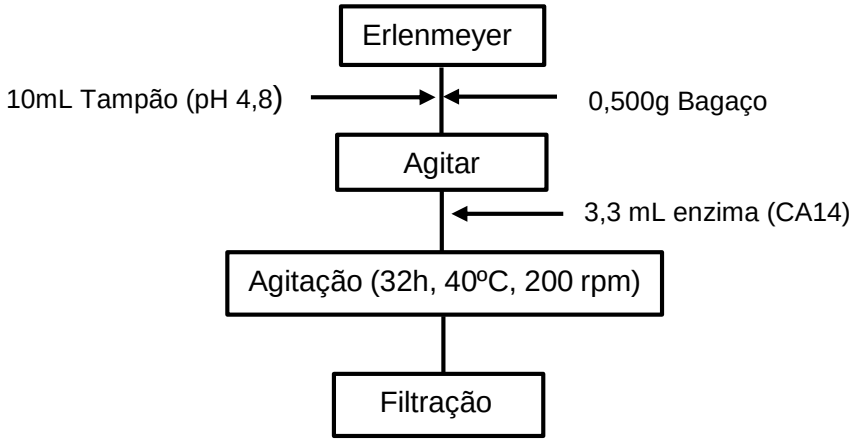


Fonte: Autor

4.3.3.4 Hidrólise do bagaço tratado com LI pelo extrato obtido de CA14

Após a seleção do melhor LI para ser utilizado no processo de tratamento do bagaço com o LI, bem como do extrato e enzimático com maior acúmulo de celulases (CA14), realizou-se a hidrólise enzimática do bagaço submetido ao tratamento com o LI acetato de *sec*-butilamônio em autoclave utilizando-se o extrato enzimático proveniente do fungo CA14, conforme descrito no fluxograma da Figura 34.

Figura 34 – Hidrólise do bagaço tratado com o extrato enzimático de CA14



Fonte: Autor

Assim, 0,5 g do bagaço de cana tratado com o LI acetato de *sec*-butilamônio foram submetidos ao tratamento com 3,3 mL do extrato enzimático (CA14) com concentração de proteínas de 0,06 $mg.mL^{-1}$, na presença de 10 mL de tampão 0,1 mol pH 4,8. A mistura foi, então, submetida ao processo de hidrólise a 40ºC durante 40h, tempo determinado anteriormente como ideal para a hidrólise. Após esse período, o material foi filtrado e, o teor de açúcares redutores total determinado via espectroscopia utilizando-se a metodologia do DNS.

4.3.3.5 Caracterizações do matérial lignocelulosico

Todos os materiais lignocelulósicos foram caracterizados através das técnicas descritas nos itens 4.3.3.4.1 até 4.3.3.4.6.

4.3.3.5.1 Determinação do teor de lignina

Para a determinação do teor de lignina foi utilizada a metodologia descrita pela norma TAPPI T222 os-76 (1976) que está representada no fluxograma descrito na Figura 35 e Figura 36.

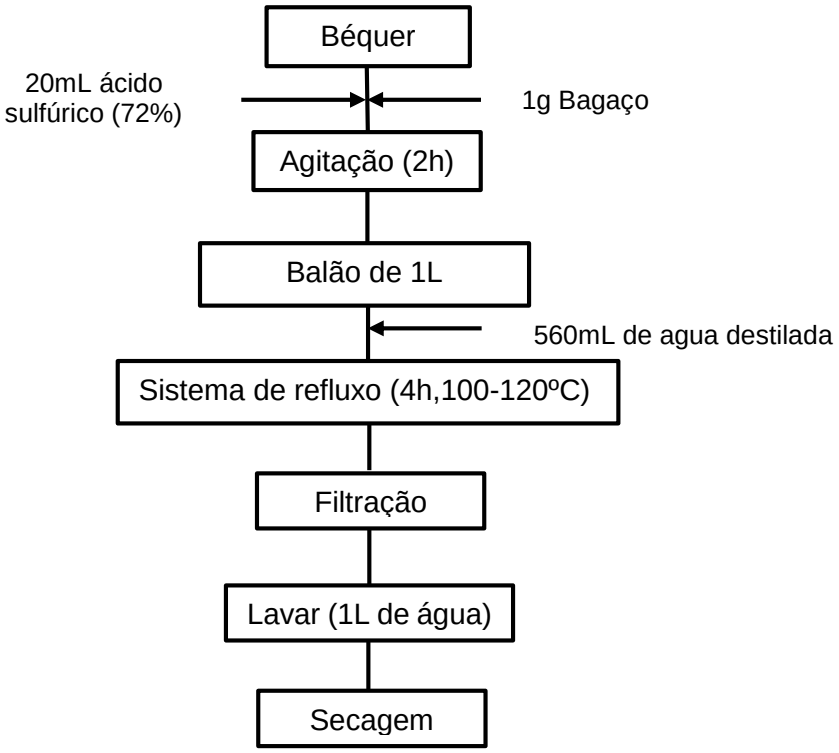
Assim, 1g de bagaço tratado (m_t) foi pesado em um béquer de 150ml. Ao mesmo foram adicionados 20 ml de ácido sulfúrico (72% de pureza) e, o sistema permaneceu sob agitação moderada a temperatura ambiente por 2 h. Após esse tempo, a mistura foi diluída em 560mL de água e levado para um sistema de refluxo

em um balão de uma boca de 1000 mL por 4h, a uma temperatura aproximada de 100ºC. Concluído esse período, deixou-se o sistema esfriar e, em seguida, realizou-se a filtração, lavagem com água e etanol e, secagem a 70ºC. Após a secagem, o funil foi pesado para obter (m_{lig}), sendo este o teor de lignina usado no cálculo da concentração de lignina conforme equação 2:

$$\%Lig = \left(\frac{m_{lig}}{m_t} * 100\right) \quad (2)$$

Em que: %Lig é o teor de lignina, m_{lig} é massa de lignina, m_t é massa inicial utilizada.

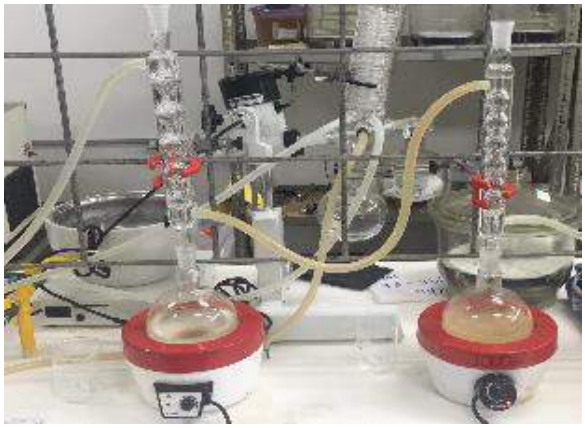
Figura 35 – Fluxograma da obtenção do teor de lignina



Fonte: Autor

O valor obtido apresenta a concentração de lignina insolúvel e, também, de cinza. Assim, o mesmo foi calculado e subtraído do valor total para determinação da concentração real de lignina em cada amostra.

Figura 36 – Determinação do teor de lignina

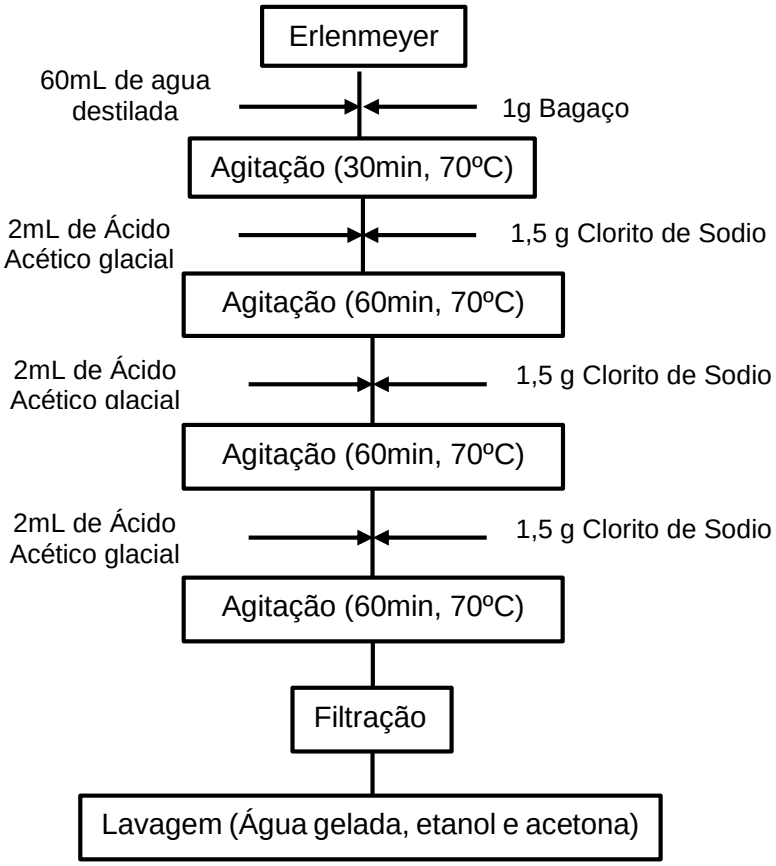


Fonte: Autor

4.3.3.5.2 Determinação do teor de holocelulose

A determinação do teor de holocelulose foi avaliado por meio da metodologia descrita por de Wise; Murby, conforme ilustrado na Figura 37.

Figura 37 – Fluxograma da obtenção do teor de holocelulose



Fonte: Autor

Para isso, 1,0g de bagaço foi pesado em um erlenmeyer de 250 mL (m_t) e misturados com 60mL de água destilada. O sistema foi colocado sob agitação constante a 70ºC durante 30 min. Em seguida, adicionou-se ao sistema 1,5g de clorito de sódio e, 2mL de ácido acético glacial e, o sistema foi mantido sob agitação por mais 30 mim. Essa operação foi repetida mais duas vezes. Finalizado o processo, a mistura foi filtrada seguindo a lavagem com água destilada gelada, acetona, etanol. O funil com o sólido foi colocado em um suporte e secado em estufa a 75 ºC por aproximadamente 24h. Após esse período, foi realizada a determinação do teor de holocelulose (m_{holo}), seguindo a equação 3.

$$\%\text{Holo} = \left(\frac{\mathrm{m_{holo}}}{\mathrm{m_t}} * 100\right) \quad (3)$$

em que: %Holo é o teor de holocelulose, m_{holo}é massa de holocelulose e m_t é a massa inicial de bagaço.

4.3.3.5.3 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose

O teor de celulose e hemicelulose foi determinado utilizado a metodologia descrita pela norma TAPPI T203 cm-99 (1979), conforme fluxograma apresentado na Figura 38.

Para isso foi necessário pesar 1,0g da massa de holocelulose obtida no processo descrito no item 4.3.3.5.2 em um erlenmeyer de 125 mL. Após a pesagem, foram adicionados 15mL de uma solução de hidróxido de potássio 24% em massa e, a mistura submetida a reação sob agitação em um shaker a 250 rpm durante 15 h a temperatura ambiente. Após as 15h, o sistema foi retirado, filtrado, lavado com etanol, seco em estufa e, pesado para determinação do teor de celulose pela equação 4:

$$\%\mathrm{Cel_{Holo}} = \left(\frac{\mathrm{m_{cel}}}{\mathrm{m_{holo}}} * 100\right) \quad (4)$$

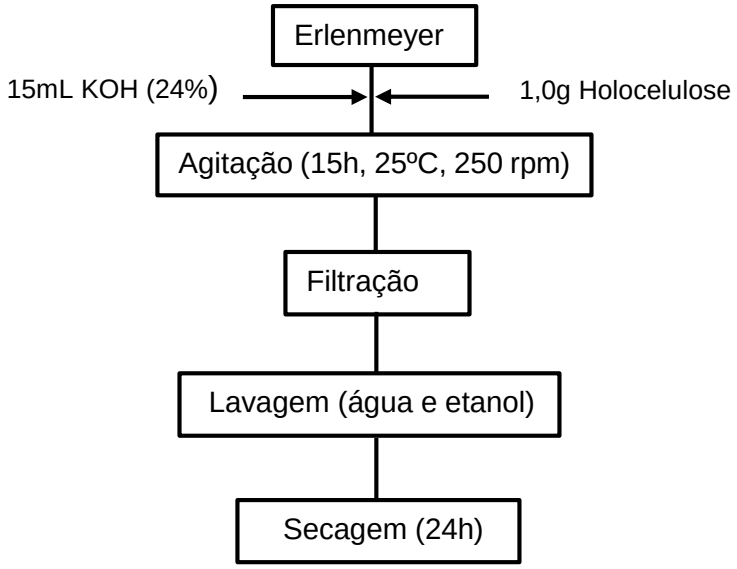
em que: $\%Cel_{holo}$ é o teor de celulose em relação a massa de holocelulose, m_{cel} é massa de celulose obtida e m_{holo} é a massa de holocelulose utilizada.

Com a finalidade de determinar o teor de celulose em relação a massa de amostra obtida inicialmente na quantificação da holocelulose, foi utilizada a equação 5:

$$\%\text{Cel} = \frac{\%Cel_{\text{Holo}} \text{ x } \%\text{Holo}}{100} \quad (5)$$

em que: %Cel é o teor de celulose corregido em relação a massa de amostra inicial, $\%Cel_{holo}$ é o teor de celulose em relação a massa de holocelulose e $\%Holo$ é o teor de holocelulose.

Figura 38 – Determinação dos teores de celulose e hemicelulose



Fonte: Autor

Uma vez que, a holocelulose é a soma de hemicelulose mais celulose, e uma vez determinando o teor de celulose pode-se obter, pela diferença, o teor de hemicelulose pela equação 6:

$$\%\text{Hemi} = 100 - \%\text{Cel} \quad (6)$$

em que: %Hemi é o teor de hemicelulose e %Cel é o teor de celulose.

4.3.3.5.4 Determinação do teor de cinzas

Durante a determinação do teor de cinzas, foram adicionados em um cadinho, previamente calcinado a 600 °C por 30 min resfriado em dessecador e pesado, aproximadamente 1,5 g do bagaço de cana bruto e submetido ao tratamento com os líquidos iônicos. Posteriormente, o material foi aquecido em um forno mufla de uma temperatura ambiente até 600 °C utilizando-se uma rampa de aquecimento de 9,6 °C/min em 60 minutos, sendo essa temperatura mantida por três horas. Finalizada a etapa de calcinação, a temperatura foi reduzida para 200 °C e, o cadinho transferido para um dessecador para realização do resfriamento final. O teor de cinzas foi calculado utilizando-se a equação 7 (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010)

$$\%C = \frac{m_c}{m_A} x100 \quad (7)$$

em que: m_c representa a massa de cinzas após a calcinação, m_a a massa de amostra antes da calcinação e, %C o teor percentual de cinzas (%).

4.3.3.5.5 Análise via microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

Tanto o bagaço de cana bruto, ou submetido ao tratamento com os líquidos iônicos foram submetidos a análise via microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG). Para isso, foi utilizando o microscópio eletrônico de varredura de alta eficiência JEOL modelo JSM-7500F com emissão de elétrons por canhão de aplicação de campo elétrico. As imagens foram obtidas aplicando-se uma voltagem de aceleração 2,00 kV e, para possibilitar a obtenção das imagens foi utilizada uma deposição com fio de carbono.

As micrografias foram avaliadas utilizando elétrons secundários, aumentos de 3.000 e 5.000x com resolução de 1 µm visando a avaliação de mudanças morfológicas nos materiais após os tratamentos. A análise foi realizada em parceria com o Instituto de Química – UNESP – Araraquara.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos itens 5.1 até 5.8 estão descritos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho que visou a avaliação da produção de celulases por fungos associados a caules de mandioca bem como verificação da influência do tratamento do bagaço de cana com diferentes líquidos iônicos na obtenção de açúcares redutores via hidrólise enzimática.

5.1 CRESCIMENTO DOS FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES DE MANDIOCA

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente, foi realizado o crescimento dos fungos associados a caules de mandioca e mantido em meio BDA a 24ºC. Para isso, placas de petri contendo batata dextrose ágar e, como antibiótico sulfato de gentamicina, foram inoculadas com cada um dos 14 fungos armazenados (Tabela 14, Figura 39)

Tabela 14 – Fungos isolados a partir de caules e folhas de mandioca

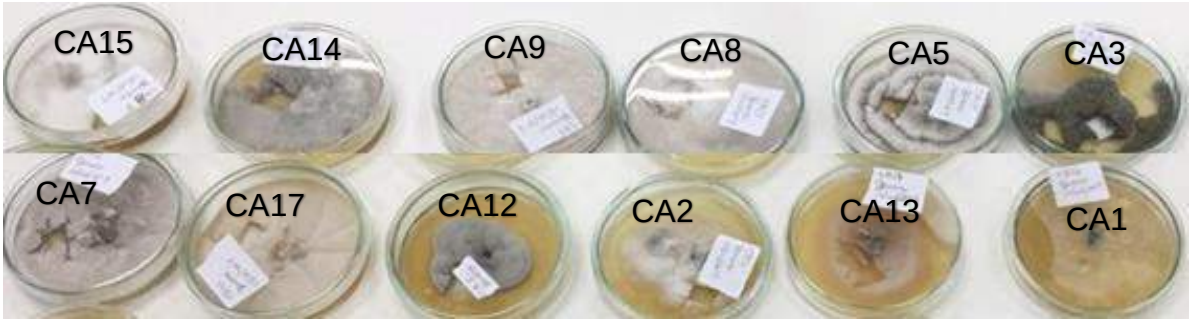
Fungo	**Identificação**
Microdochium lycopodinum	CA1
Colletotrichum sp.	CA2
Cladosporium sp.	CA3
Alternaria sp.	CA5
Phomopsis sp.	CA7
Diaporthe phaseolorum	CA8
Diaporthe endophytica	CA9
Vouchered mycorrhizae	CA10
Phanerochaete australis	CA11
Diaporthe caatingaensis	CA12
Stenocarpella maydis	CA13
Annulohypoxylon stygium	CA14
Sordariomycetes sp.	CA15
Phanerochaetaceae sp.	CA17

Fonte: Autor

Após a realização do crescimento bem como de dois repiques visando a ativação do sistema enzimático de cada fungo, os microrganismos foram submetidos

ao crescimento em meio CMC para avaliação qualitativa da produção de celulases e realização de uma pré-seleção visando a continuidade do trabalho.

Figura 39 – Alguns fungos submetidos ao crescimento em meio BDA



Fonte: Autor

5.2 ENSAIO QUALITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES

Durante a avaliação qualitativa da produção de celulases, cada um dos fungos foi inoculado em meio sólido específico para a avaliação da produção de celulase e submetido ao crescimento durante 5 dias. Após esse período, foi realizada a revelação de cada uma das placas com vermelho congo sendo verificada a formação de um halo castanho no meio para os fungos produtores de celulase.

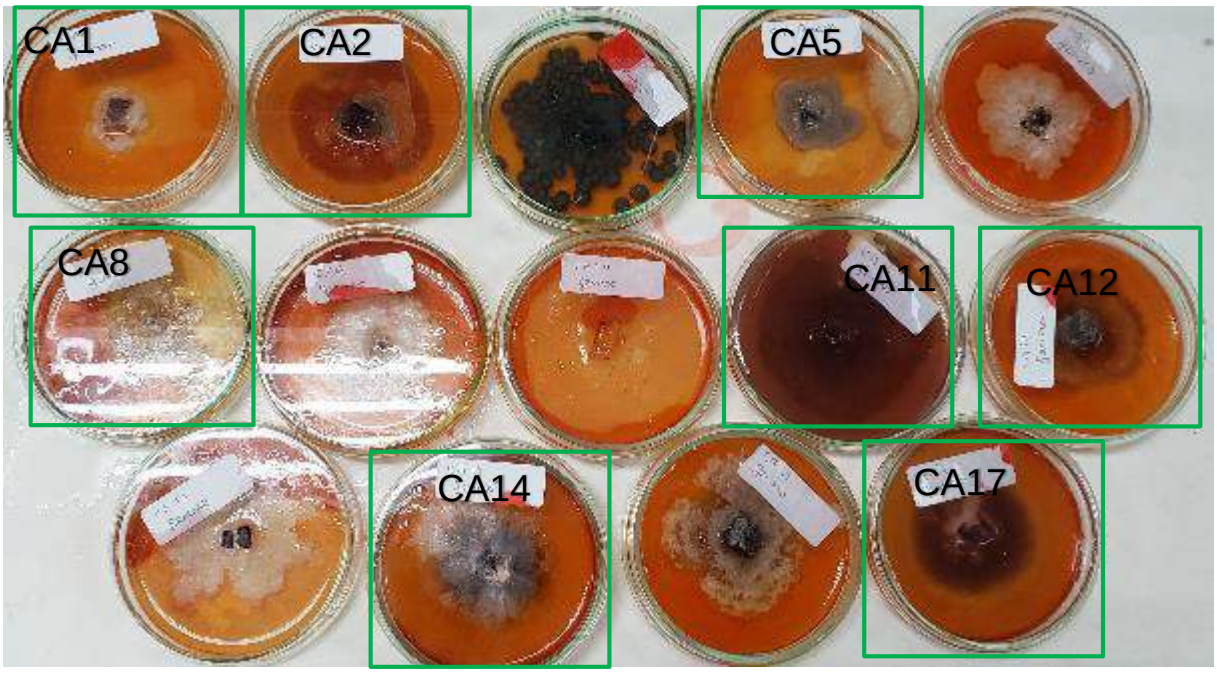
Analisando-se os resultados, verifica-se maior produtividade de celulases pelos fungos CA1 (*Microdochium lycopodinum*), CA2 (*Colletotrichum* sp.), CA5 (*Alternaria* sp.), CA8 (*Diaporthe phaseolorum*), CA11 (Phanerochaete australis), CA12 (*Diaporthe caatingaensis*), CA14 (*Annulohypoxylon stygium*) e, CA17 (*Phanerochaetaceae* sp.) (Figura 40)

Comparando-se os resultados obtidos com dados da literatura, não foram verificados relatos de produção de glicosidases pelos fungos *Microdochium lycopodinum* e *Phanerochaetaceae* sp. Porém, para os demais fungos que mostraram produção de celulases após a realização do teste qualitativo (*Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Diaporthe phaseolorum*, *Phanerochaete australis*, *Diaporthe caatingaensis*, e *Annulohypoxylon stygium*) foram encontrados relatos de produção de algum tipo de glicosidases.

Como exemplos, podem ser citados trabalhos realizados por Ayob e Khanom Simarani (2016) que evidenciaram a produção de celulases pelos fungos filamentosos *Colletotrichum* sp*., Macrophomina phaseolina, Nigrospora sphaerica* e *Fusarium*

solani bem como trabalhos realizados por Ingle e colaboradores (2017) que compararam a atuação de celulases obtidas a partir de *Alternaria alternata* antes e após a imobilização no processo de hidrólise de biomassa lignocelulósica.

Figura 40 – Avaliação qualitativa da produção de celulases



Fonte: Autor

Também existem relatos da produção de celulases por *Diaporthe* sp. Isolados de *Terminalia catappa* e *Cananga odorata* (TOGHUEO et al., 2017) e, da produção de enzimas lignolíticas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* (KAMESHWAR; QIN, 2018). Destacam-se também os trabalhos realizados por Robl e colaboradores (2015) que obtiveram β-glucosidase e pectinase a partir de *Annulohypoxylon stygium* e, também, trabalhos realizados por Paës e colaboradores (2012) que verificaram a produção de xilanases por *Annulohypoxylon stygium* HB63.

Dessa forma, visando a confirmação dos resultados obtidos após a realização da análise qualitativa e levando-se em consideração os relatos da literatura, foi realizado o processo de hidrólise da celulose microcristalina com os extratos enzimáticos obtidos a partir dos fungos selecionados durante a realização dos testes qualitativos para a verificação da produção de celulases e, quantificação.

5.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULASES

Durante a avaliação da produção de celulases pelos fungos selecionados (CA1, CA2, CA5, CA8, CA11, CA12, CA14 e, CA17), foram realizados experimentos de hidrólise da celulose microcristalina. Para isso, cada extrato enzimático foi utilizado durante o processo, separadamente, sendo os resultados referentes a concentração de açúcares redutores totais avaliados por espectroscopia na região do ultravioleta (Tabela 15, Figura 41, Apêndice A). Todos os resultados foram comparados com os dados obtidos utilizando-se celulase comercial. Também foram realizadas análises da concentração proteica em cada um dos extratos enzimáticos obtidos (Tabela 16, Figura 42, Apêndice A).

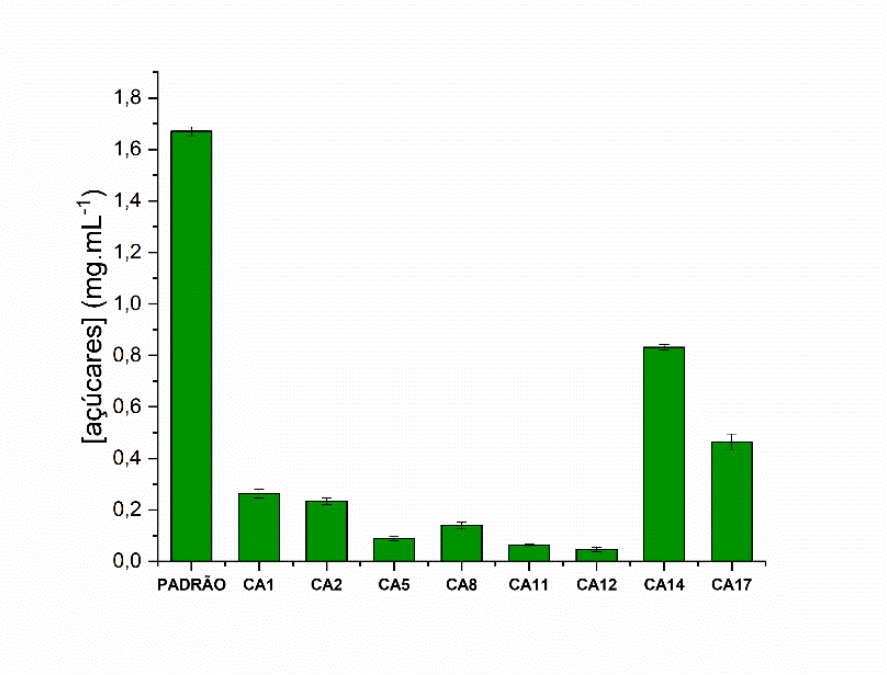
Tabela 15 – Concentração de açúcares redutores totais após a hidrólise

Fonte de celulase	C ($mg.mL^{-1}$)	Desvio padrão
Celulase comercial	1,67	0,02
CA1	0,26	0,02
CA2	0,23	0,01
CA5	0,09	0,01
CA8	0,14	0,01
CA11	0,06	0,00
CA12	0,05	0,01
CA14	0,83	0,01
CA17	0,46	0,03

Fonte: Autor

Avaliando-se os resultados de concentração de açúcares redutores totais por miligrama de proteína (Figura 43), verifica-se um maior potencial pelos fungos CA14 (*Annulohypoxylon stygium*) e CA17 (*Phanerochaetaceae* sp.) que mostraram uma concentração de açúcares fermentescíveis de 0,83 ± 0,01 e, 0,46 ± 0,03, respectiamente. Dessa forma, esses fungos foram submetidos ao processo de crescimento em meio específico para a produção de celulases e avaliação da melhor condição de crescimento para produção dessa classe de enzimas levando-se em consideração o tempo de crescimento e, o pH de crescimento.

Figura 41 – Comparação da eficiência do processo de hidrólise



Fonte: Autor

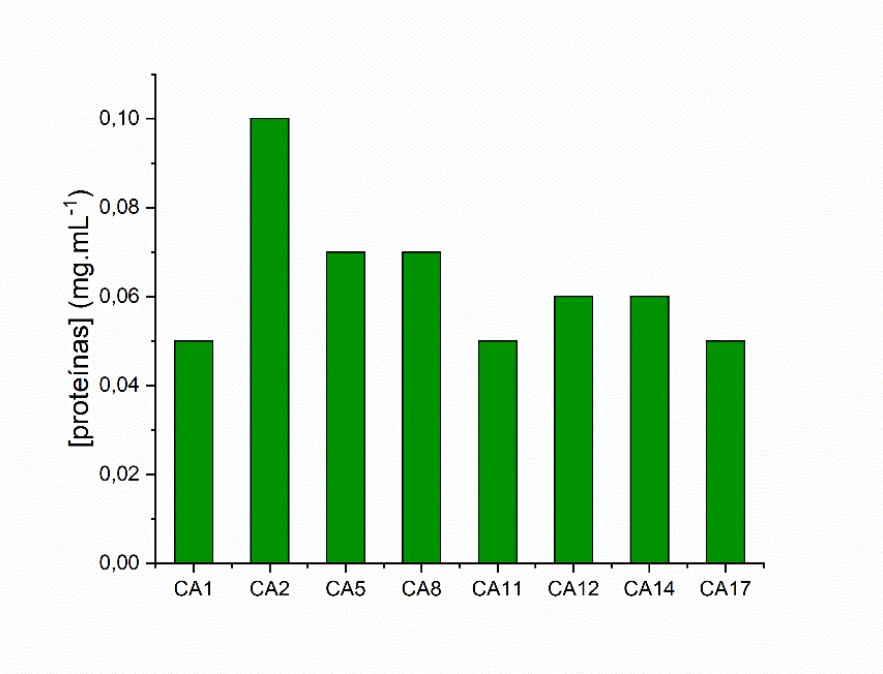
Tabela 16 – Concentração proteica de cada extrato enzimático analisado

Fonte de celulase	C ($mg.mL^{-1}$)	Desvio padrão
CA1	0,05	0,000
CA2	0,10	0,001
CA5	0,07	0,000
CA8	0,07	0,000
CA11	0,05	0,000
CA12	0,06	0,001
CA14	0,06	0,001
CA17	0,05	0,001

Fonte: Autor

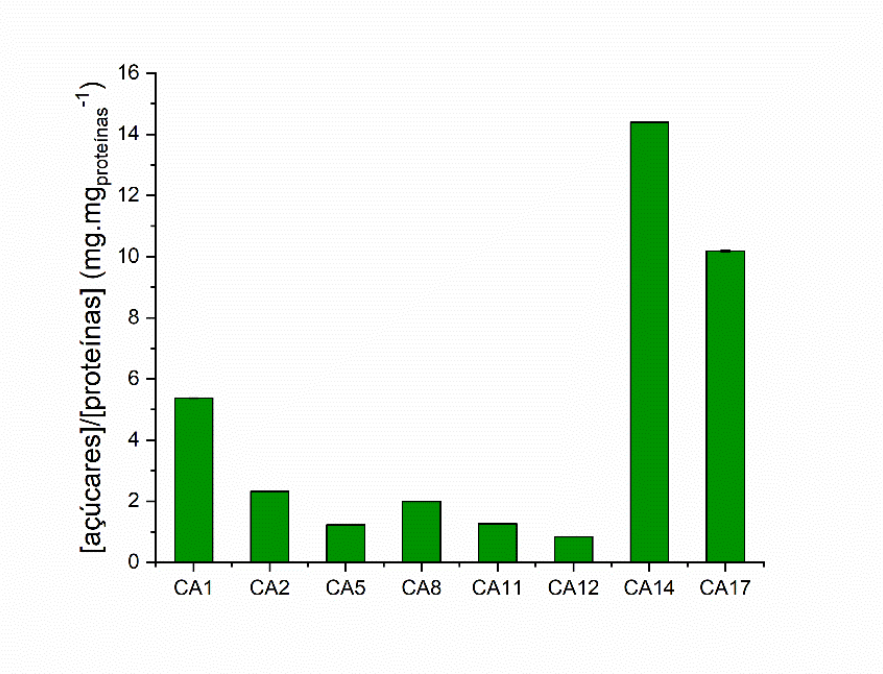
Verifica-se também, um baixo potencial de produção de celulases pelos demais fungos. Assim, CA14 e, CA17 foram selecionados para o desenvolvimento das etapas de otimização das condições de produção de celulases visando a realização da hidrólise enzimática do bagaço de cana.

Figura 42 – Comparação das concentrações proteicas dos extratos



Fonte: Autor

Figura 43 – [Açúcares redutores] por mg de proteína



Fonte: Autor

5.4 CRESCIMENTO EM MEIO ESPECÍFICO PARA CELULASES

Após a determinação dos fungos com maior potencial para a produção de celulases: (CA14 (*Annulohypoxylon stygium*) e, CA17 (*Phanerochaetaceae* sp.), esses fungos foram submetidos ao processo de crescimento em meio semi-sólido visando o aumento da produção de celulases, principalmente endoglucanases, enzimas responsáveis pela primeira etapa da hidrólise de materiais lignocelulósicos. Para isso, foi avaliado o melhor tempo e pH de crescimento (Figura 44).

Figura 44 – Crescimento em médio semi-sólido

Fonte: Autor

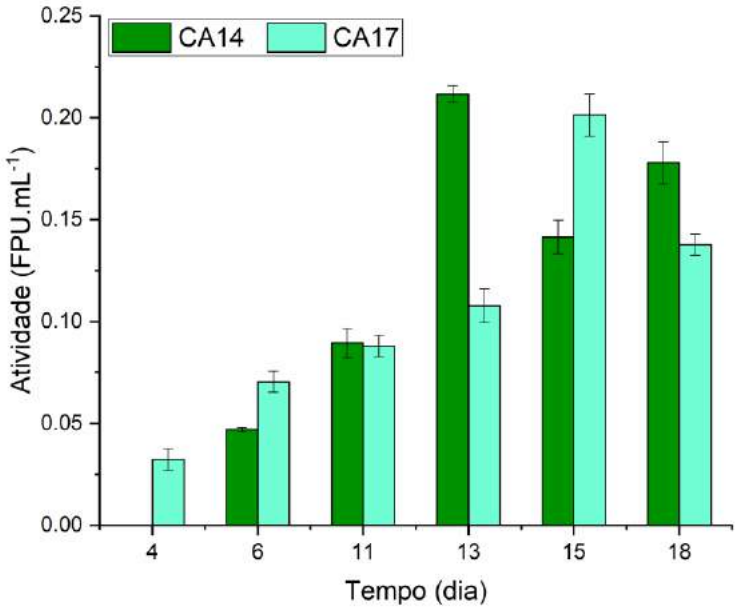
Analisando-se os resultados obtidos, ao variar-se o tempo, verifica-se que 13 dias se mostrou o período ideal de crescimento para CA14 (Atividade enzimática de 0,212 $FPU.L^{-1}$) e,15 dias para CA17 (Atividade enzimática de 0,201 $FPU.L^{-1}$) (Figura 45, Apêndice B). Observa-se também uma maior produtividade pelo fungo CA14.

Dessa forma, o microrganismo *Annulohypoxylon stygium* foi escolhido para desenvolvimento das demais etapas do trabalho. Assim, após a determinação do tempo ideal para realização do crescimento do fungo visando a maior produtividade de celulases, foi avaliado o pH ideal do meio (Figura 46, Apêndice B) sendo verificado como 4 o pH ideal (atividade enzimática de 0,549 $FPU.mL^{-1}$).

Resultados semelhantes foram observados por Syuan et al. (2018), que encontraram um tempo ideal de crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* de 10 dias em meio sólido para a produção de celulases utilizando um pH de 4,8 e, temperatura de 30ºC bem como trabalhos realizados por Mohapatra et al. (2018) que reportam um pH ideal de crescimento do fungo *Asperigellus fumigatus* em meio líquido em pHs ácidos em estudos realizados durante 10 dias a 30ºC.

Devem ser destacados também resultados obtidos por Marques et al., (2018), que relata um pH ideal de crescimento dos fungos *Cladosporium* c*ladosporioides*, *Phomopsis stipata*, *Trichoderma viridae* e, *Botryosphaeria* sp. entre 4,5 e 6, durante a produção de celulases em meio sólido em processos realizados a 28ºC durante uma semana.

Figura 45 – Atividade enzimática X tempo de crescimento

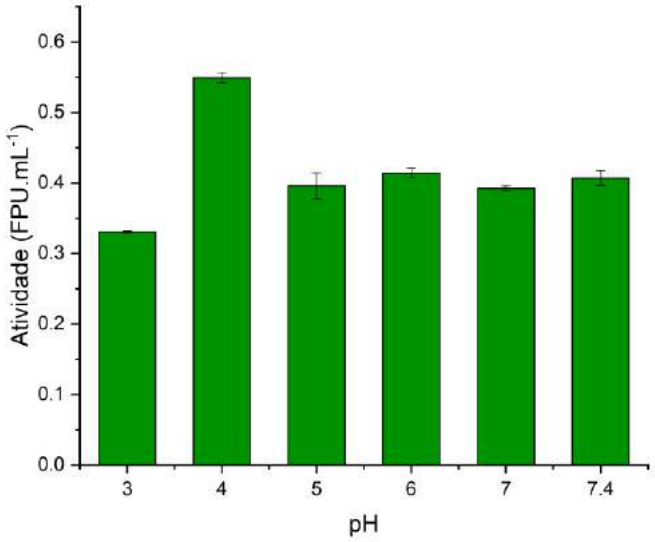


Fonte: Autor

Souza et al. (2018) também relatam que o pH ideal para o crescimento do fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em meio sólido de Bagaço de cana foi de 3 – 5, sendo a maior atividade obtida em pH 3 e valores semelhantes nos pHs 4 e 5. Nesse estudo, a temperatura foi de 50ºC. Esses relatos demonstras a maior atividade da enzima em meio ácido.

Dessa forma, determinado o tempo ideal de crescimento bem como selecionado o fungo para a realização da etapa de tratamento do bagaço de cana (CA14) e determinado o pH ideal de crescimento para o mesmo, foi realizada uma etapa de enriquecimento do extrato enzimático em celulases visando a obtenção de resultados significativos na etapa posterior.

Figura 46 – Influência do pH na produção de celulases



Fonte: Autor

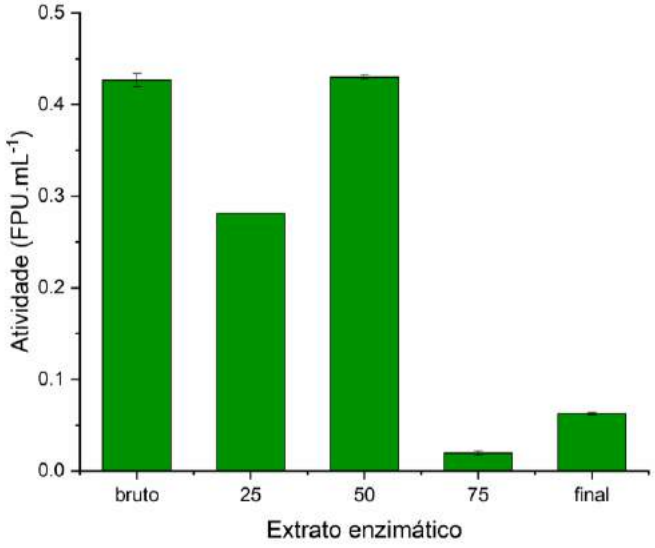
5.5 ENRIQUECIMENTO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM CELULASES

Verificada a maior produtividade pelo fungo CA14, bem como determinados o pH e o tempo ideais de crescimento foi realizada uma pré-purificação via precipitação com sulfato de amônio visando o enriquecimento do extrato enzimático com celulases. Dessa forma, foram realizadas saturações de 25, 50 e 75 % sendo que, a fração saturada com 50 % de sal mostrou um aumento significativo na atividade enzimática (Figura 47, Apêndice C).

Mohapatra et al. (2018) também evidenciaram atividade enzimática de celulases após a precipitação com sulfato de amônio em frações submetidas a saturação com 25 a 48 % desde sal, corroborando com os dados observados durante o desenvolvimento do presente trabalho.

É importante salientar trabalhos realizados por Benoliel et al. (2013) que, em estudos referentes a atividade enzimática de celulases e perfil da proteína de interesse, verificaram que a enzima de interesse mostrou um peso molecular de aproximadamente 50.000 Daltons usando a análise via eletroforese SDS – PAGE.

Figura 47 – Atividade enzimática dos extratos enzimáticos



Fonte: Autor

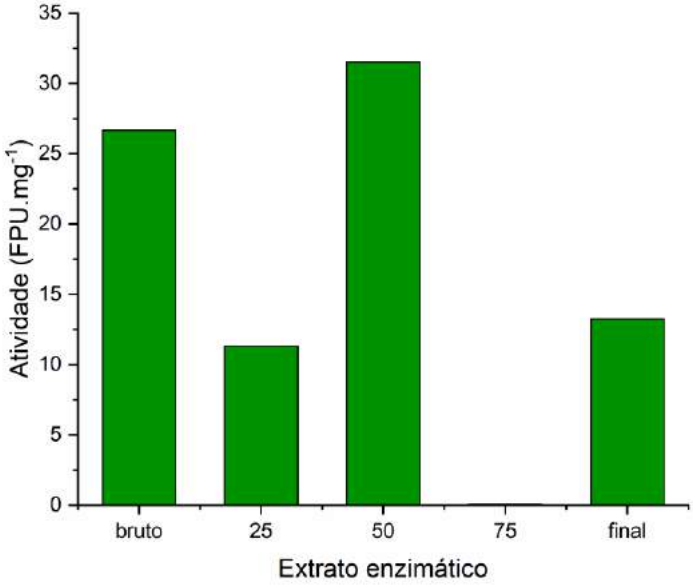
Verifica-se também que a fração saturada com 75 % de sulfato de amônio mostrou a presença da maior parte das proteínas presentes no extrato (Tabela 17) e que, a precipitação salina possibilitou o enriquecimento em celulases e o aumento da atividade enzimática em 18,2 %, levando-se em consideração a atividade por miligrama de proteína, bem como uma boa purificação das enzimas de interesse (Figuras 48 e 49, Apêndice C). Constata-se também um peso molecular aproximado de 73.000 Daltons para a celulase pré-purificada, possivelmente uma endoglucanase.

Tabela 17 – Dosagem proteica das frações obtidas

Amostras	C ($mg.mL^{-1}$)	DP
Bruto	0,016	0,000
25	0,025	0,000
50	0,014	0,001
75	0,261	0,002
final	0,040	0,01

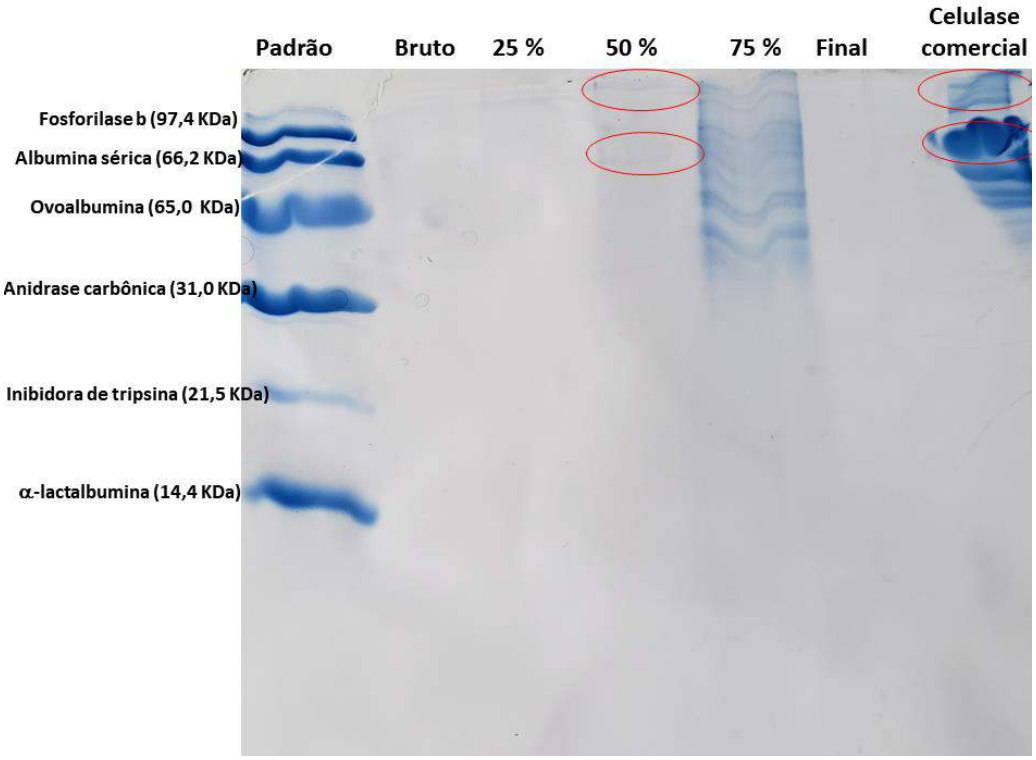
Fonte: Autor

Figura 48 – Atividade enzimática por mg de proteína



Fonte: Autor

Figura 49 – Gel de eletroforese do extrato enzimático e frações



Fonte: Autor

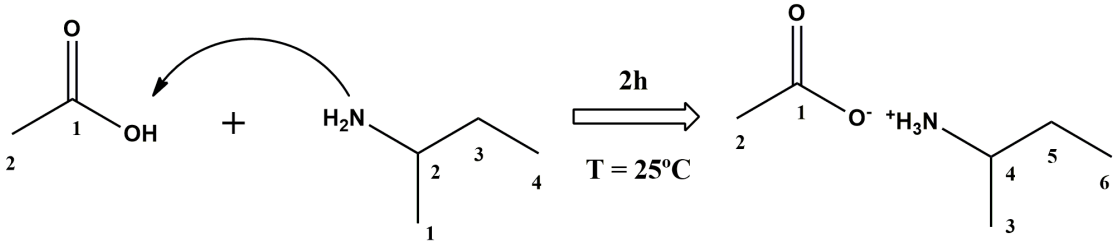
5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LÍQUIDOS IÔNICOS

Para a realização do tratamento do bagaço de cana com os líquidos iônicos (acetato de *sec*-butilamônio, lactato de *sec*-butilamônio, acetato de imidazólio e, lactato de imidazólio), foi necessária, a síntese e caracterização via RMN dos mesmos.

Dessa forma, foi realizada a síntese do líquido iônico acetato de *sec*-butilamônio (Figura 50). Através da caracterização doa RMN-H^1 (Tabela 18, Apêndice D), verifica-se a mudança na integração do sinal referente ao grupo NH_2 após protonação e formação do grupo NH_3^+ bem como mudança no deslocamento químico que foi de 1,22 ppm para 7,67 ppm. Os demais sinais corroboram com a formação do LI desejado, acetato de *sec*-butilamônio bem como a análise dos espectros de RMN-C^{13} e com os dados obtidos por Andrade Neto et al. (2016).

Já, para o LI lactato de *sec*-butilamônio (Figura 51) observa-se a mudança de deslocamento químico referente ao sinal do grupamento amino (1,22 ppm) após protonação e formação do grupo amônio (6,10 ppm) bem como sinais referentes aos outros prótons e carbonos presentes na estrutura (Tabela 19, Apêndice D)

Figura 50 – Mecanismo de formação do LI acetato de *sec*-butilamônio



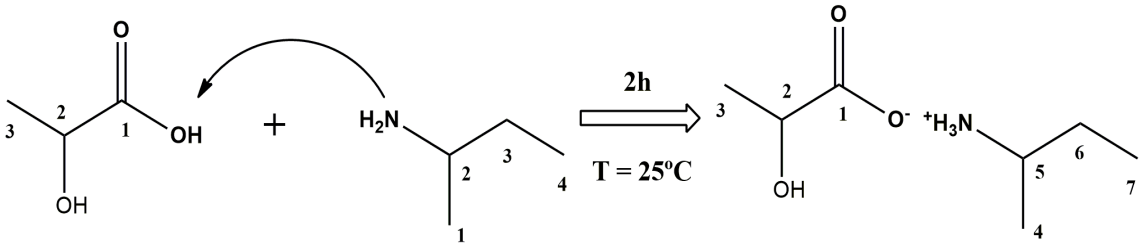
Fonte: Autor

Tabela 18 – Deslocamentos químicos obtidos para os reagentes e para o LI

Posição	Ácido acético		Sec-butilamina		acetato de sec-butilamônio	
	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	177,92	1,01 (d, 3H)	23,24	-	178,87
2	2,10 (s, 3H)	20,75	2,76 (m, 1H)	48,20	2,99 (s, 3H)	24,98
3			1,32 (dm, 2H)	32,41	1,18 (d, 3H)	18,53
4			0,86 (t, 3H)	10,93	1,85 (m, 1H)	48,15
5					1,45 e 1,64 (dm, 2H)	28,27
6					0,90 (t, 3H)	9,98
NH_2/NH_3^+			1,22 (s, 2H)	-	7,67 (s, 3H)	

Fonte: Autor

Figura 51 – Mecanismo de formação do LI lactato de *sec*-butilamônio



Fonte: Autor

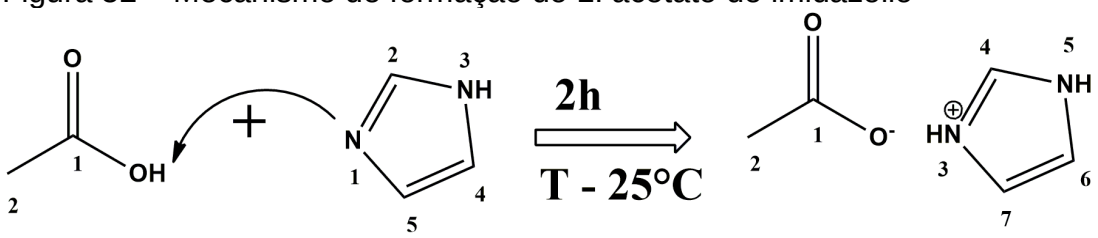
Tabela 19 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI

Posição	Ácido láctico		Sec-butilamina		Lactato de sec-butilamônio	
	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	179,69	1,01 (d, 3H)	23,24	-	182,11
2	4,37 (q, 1H)	66,78	2,76 (m, 1H)	48,20	3,96 (q, 1H)	68,86
3	1,49 (d, 3H)	20,13	1,32 (dm, 2H)	32,41	1,29 (d, 3H)	21,03
4			0,86 (t, 3H)	10,93	1,21 (d, 3H)	18,60
5					3,07 (m, 1H)	48,79
6					1,48 e 1,67 (dm, 2H)	28,31
7					0,93 (t, 3H)	10,33
NH_2/NH_3^+			1,22 (s, 2H)	-	6,10 (s, 3H)	

Fonte: Autor

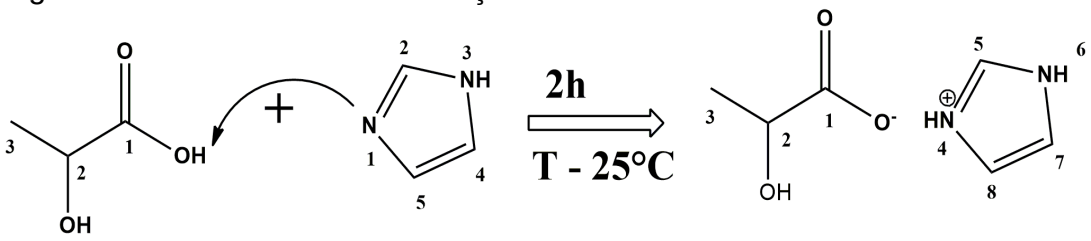
Considerando a síntese dos líquidos iônicos com o cátion imidazólio, verifica-se a protonação somente em um dos grupos aminos presentes na estrutura em ambos os casos, formação do acetato de imidazólio (Figura 52) e, lactato de imidazólio (Figura 53).

Figura 52 – Mecanismo de formação do LI acetato de imidazólio



Fonte: Autor

Figura 53 – Mecanismo de formação do LI lactato de imidazólio



Fonte: Autor

Esses dados podem ser confirmados através da análise dos espectros de RMN (Apêndice D, Tabelas 20 e 21), nas quais estão representadas todas as atribuições dos deslocamentos químicos e multiplicidades dos sinais de prótons bem como as atribuições dos sinais de carbono para cada um dos compostos analisados.

Tabela 20 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI

Posição	Ácido acético		imidazol		Acetato de imidazólio	
	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	177,92	-	-	-	177,81
2	2,10 (s, 3H)	20,75	7,71 (s, 1H)	135,28	2,06 (s, 3H)	22,92
4			7,12 (d, 1H)	122,04	8,00 (s, 1H)	134,84
5			7,12 (d, 1H)	122,04	-	-
6					7,13 (d, 1H)	120,45
7					7,13 (d, 1H)	120,45
NH/NH^{+}			7,12 (s, 1H)	-	14,31 (s, 1H)	-

Fonte: Autor

Tabela 21 – Deslocamentos químicos para os reagentes e para o LI

Posição	Ácido láctico		imidazol		lactato de imidazólio	
	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	179,69	-	-	-	180,69
2	4,37	66,78	7,71	135,28	3,72 (m, 1H)	58,50
3	1,49	20,13	-		1,26 (d, 3H)	20,85
4			7,12	122,04	-	-
5			7,12	122,04	7,25 (s, 1H)	119,46
6					-	-
7					10,29 (d, 1H)	134,31
8					10,29 (d, 1H)	134,31
NH/NH^{+}			7,12 (s, 1H)	-	3,42 (s, 1H)	-

Fonte: Autor

5.7 TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA COM OS LIS

Atualmente, muitos tratamentos são realizados em materiais lignocelulósicos visando o aumento da eficiência durante a etapa de hidrólise. Neste contexto, o tratamento com líquidos iônicos tem sido muito explorado por diversos pesquisadores. Neste sentido, foram realizados tratamento do bagaço de cana com quatro líquidos iônicos de baixo custo diferentes (acetato de *sec*-butilamônio - A, acetato de imidazólio - B e, lactato de *sec*-butilamônio - C, lactato de imidazólio - D) visando verificar a efetividade na realização desse tratamento na etapa posterior de hidrólise. Todas as etapas de hidrólise foram realizadas utilizando-se celulase proveniente de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921).

Para isso, foi realizada a caracterização do bagaço de cana via determinação do teor de celulose, lignina, hemicelulose e, morfológica via MEV, antes a após a realização de cada um dos tratamentos com os líquidos iônicos visando a verificação de mudanças na composição nos materiais bem como modificações na morfologia do bagaço de cana (Tabela 22, Figuras 54-56, Apêndice E).

Salienta-se que, devido ao fato do LI acetato de *sec*-butilamônio se mostrar mais eficiente nos tratamentos iniciais, também foi realizado um novo tratamento com o mesmo em autoclave visando a determinação do método mais eficiente de tratamento.

Tabela 22 – Teores de lignina, holocelulose, celulose, hemicelulose e, cinzas

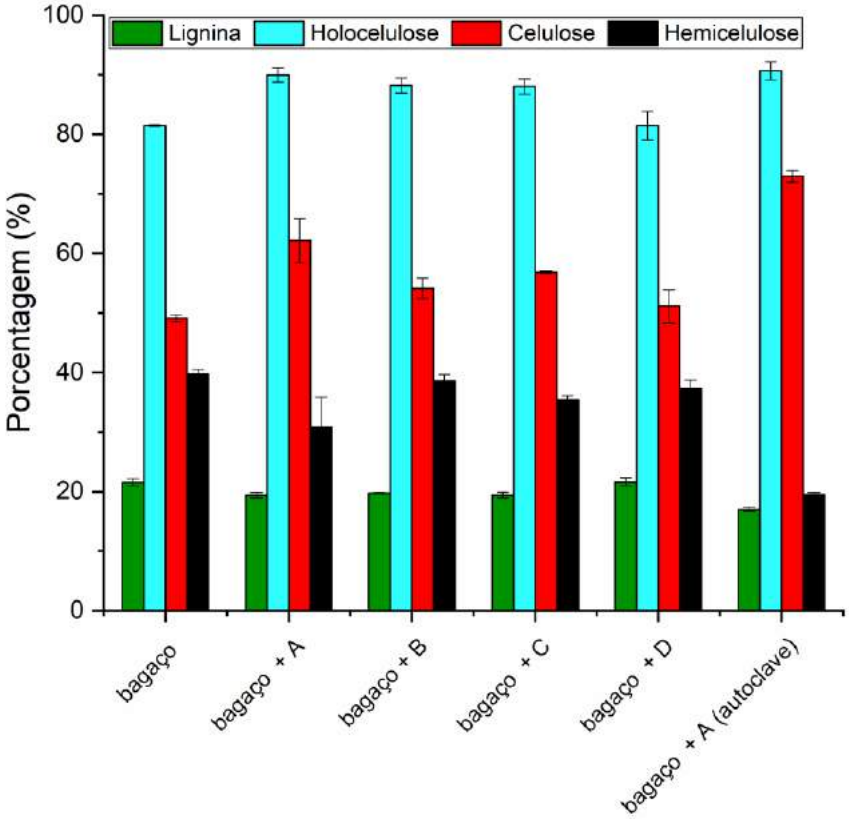
Material	Lignina (%)	Holocelulose (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)
Bagaço de cana	21,56 ± 0,64	81,48 ± 0,15	49,10 ± 0,60	39,73 ± 0,88	0,56 ± 0,03
Bagaço de cana tratado com A	19,40 ± 0,48	89,94 ± 1,18	62,17 ± 3,67	30,85 ± 4,97	0,49 ± 0,02
Bagaço de cana tratado com A em autoclave	17,53 ± 0,30	90,66 ± 1,52	72.93 ± 0.96	17,73 ± 0,99	0,52 ± 0,01
Bagaço de cana tratado com B	19,78 ± 0,08	88,19 ± 1,25	54,14 ± 1,70	38,63 ± 1,05	0,54 ± 0,03
Bagaço de cana tratado com C	19,41 ± 0,50	88,02 ± 1,25	56,83 ± 0,21	35,43 ± 0,68	0,45 ± 0,02
Bagaço de cana tratado com D	21,64 ± 0,64	81,48 ± 2,43	51,12 ± 2,79	37,29 ± 1,55	0,45 ± 0,02

Fonte: Autor

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que o tratamento com o líquido iônico acetato de *sec*-butilamônio levou ao maior aumento da concentração de celulose. Esses dados justificam o fato de se ter observado uma maior concentração

de glicose durante a hidrólise do material tratado com o respectivo líquido iônico utilizando-se a celulase proveniente de *Trichoderma reesei* em análise via HPLC (Figura 56, Apêndice E).

Figura 54 – Composição dos materiais antes e após tratamento



Fonte: Autor

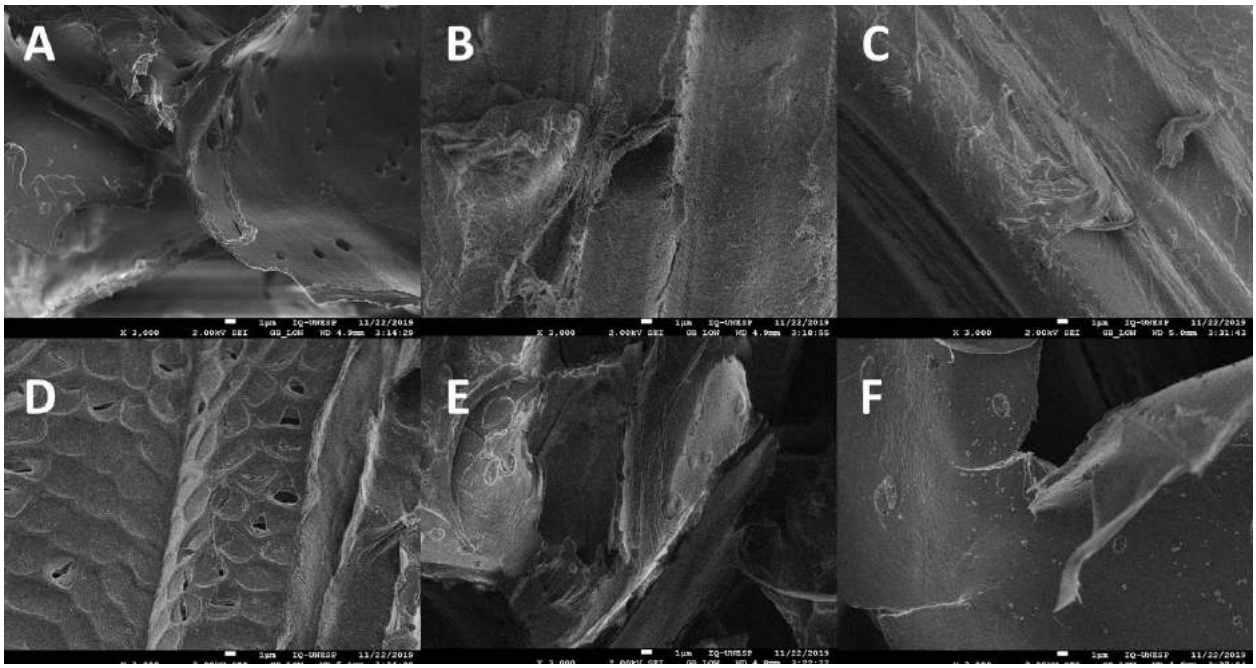
Com relação a eficiência das duas metodologias adotadas: refluxo e autoclave, ao analisar-se os resultados, verifica-se que, ao realizar-se o tratamento em autoclave, o teor de celulose aumentou significativamente (17,30 %) indo de 62,17 ± 3,67 para 72.93 ± 0.96 e, também, deve-se levar em consideração a redução no tempo de tratamento e a possibilidade de não se utilizar o THF, necessário no processo inicial de tratamento em banho de óleo de silicone, o que favorece a otimização das condições de tratamento.

Com relação ao teor de lignina, não foi verificada uma redução de 12,32 % (19.40 ± 0.48 para durante o tratamento sob aquecimento e, 17.01 ± 0.30 durante o tratamento em autoclave), o que também favorece o aumento do rendimento durante a hidrólise. Verifica-se também, através da análise das micrografias a presença das fibrilas de celulose mais disponíveis após a realização do tratamento com o LI acetato

de *sec*-butilamônio em autoclave, corroborando com os dados de hidrólise observados durante a realização das reações de hidrólise.

É possível verificar, através da análise das micrografias, uma maior separação da matriz celulose-hemicelulose-lignina (Figura 55C) evidenciado pelas fibrilas de celulose presentes na estrutura, corroborando com os dados de composição obtidos.

Figura 55 – Micrografias obtidas utilizando-se um aumento de 3.000X

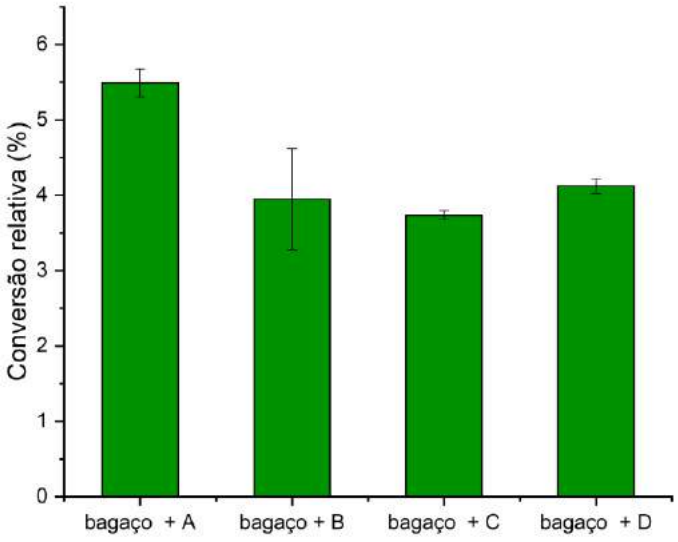


* Bagaço tratado com diferentes líquidos iônicos: (A) Bagaço bruto; (B) acetato de *sec*-butilamônio em banho; (C) acetato de *sec*-butilamônio em autoclave, (D) acetato de imidazólio, (E) lactato de sec-butilamônio , (F) lactato de imidazólio

Fonte: Autor

Dessa forma, verificada a maior eficiência da realização do tratamento com o LI acetato de *sec*-butilamônio utilizando-se a autoclave, foi realizado o tratamento do bagaço com o mesmo e, com o material, foi realizada a hidrólise enzimática utilizando-se o extrato enzimático obtido a partir de CA14 (*Annulohypoxylon stygium*) submetido ao crescimento em pH 4 durante 13 dias sendo determinado o tempo ideal de hidrólise do material.(Figura 56).

Figura 56 – Hidrólise dos materiais tratados com os LIs



Fonte: Autor

5.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO COM O EXTRATO DE CA14

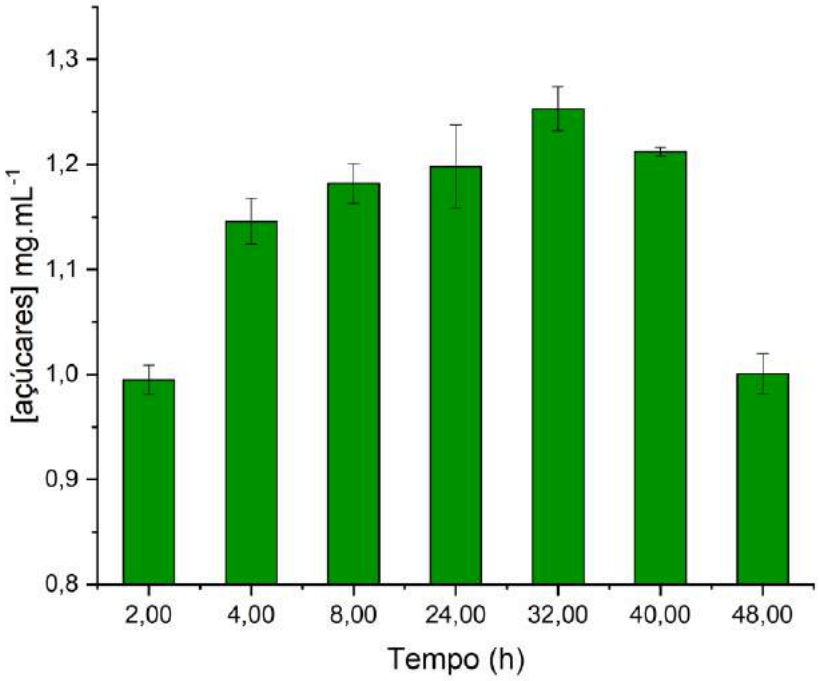
Ao avaliar-se a eficiência da hidrólise enzimática do bagaço de cana submetido ao tratamento com o LI acetato de *sec*-butilamônio utilizando-se o extrato enzimático obtido a partir de CA14, verifica-se que o tempo ideal de hidrólise foi de 32 h (Tabela 23, Figura 57, Apêndice E).

Tabela 23 – Dados de otimização do tempo de hidrólise

Tempo (h)	% média de hidrólise	DP
2,00	0,995 ±	0,014
4,00	1,146 ±	0,022
8,00	1,182 ±	0,019
24,00	1,198 ±	0,040
32,00	1,253 ±	0,091
40,00	1,212 ±	0,004
48,00	1,001 ±	0,190

Fonte: Autor

Figura 57 – Tempo ideal de hidrólise



Fonte: Autor

Verifica-se também que, após 32 h ocorre uma redução da atividade possivelmente devido a presença de açúcares que acaba inibindo a ação da enzima. Dessa forma, foi estabelecido o tempo ideal para o processo de hidrólise visando a realização da etapa de fermentação em projetos futuros e sua otimização.

6 CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho verificou-se a eficiência de fungos endofíticos associados a caules de mandioca em produzir celulases bem como uma maior eficiência pelo fungo CA14 (*Annulohypoxylon stygium*). Para esse fungo foi possível também estabelecer o pH ideal de crescimento (pH 4) e, o tempo ideal (13 dias) sendo que, em tempos maiores começa a ocorrer uma competição Fungo X nutrientes e, dessa forma, ocorre redução na produção de celulases.

Determinada a melhor condição de crescimento, foi possível o enriquecimento do extrato enzimático em celulases e, com isso, verifica-se um aumento na atividade de celulases de 18,19 %, em relação ao extrato bruto e, também, a obtenção de um extrato com boa purificação.

Paralelamente, também foi avaliada a eficiência da realização do pré-tratamento do bagaço de cana com líquidos iônicos de baixo custo sendo verificada uma maior efetividade ao utilizar-se o LI acetato de *sec*-butilamônio e, também, a maior efetividade ao realizar-se o processo de tratamento em autoclave.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, B. et al. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 37-50, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136403211930111X>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 844-856, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000300001>. Acesso em: 16 fev. 2020.

ADITIYA, H.B. et al. Second generation bioetanol production: Acritical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032116303434>. Acesso em: 25 nov.2019.

AGBO, J. **Cassava Production As Catalyst For Growth, Economic Devt**., 2019. Disponível em: <https://leadership.ng/2019/02/02/cassava-production-as-catalyst-for-growth-economic-devt/>. Acesso em: 01 dez. 2019.

AKRAM, F. et al. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy**, v.122, p. 225-238, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148118301058>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ALALWAN, H.A.; ALMINSHID, A H.; ALJAAFARI, H.A.S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. **Renewable Energy Focus**, v. 28, p. 127-139, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1755008418303259>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ALLEM, A.C. The origin of Manihot esculenta Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, V. 41, P. 133-150, 1994. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00051630>. Acesso em: 30 nov. 2019.

ANDRADE NETO, J. C. et al. Synthesis and characterization of new low-cost ILs based on butylammonium cation and application to lignocellulose hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 279-287, 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez328.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S014486171630033>. Acesso em: 31 out. 2019.

ARIF, E.; CLARK, M.W.; LAKE, N. Sugar cane bagasse ash from a high-efficiency co-generation boiler as filler in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 151, p. 692–703, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950061817312771>. Acesso em: 25 nov. 2019.

AYOB, F.W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, p. 273–278, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881157/>. Acesso em: 01 dez. 2019.

AYODELE, B.V.; ALSAFFAR, M.A.; MUSTAPA, S.I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, p. 118857, 2019. *In Press*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652619337278>. Acesso em: 25 nov. 2019.

AZHAR, S.H.M. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580816302424>. Acesso em: 25 nov. 2019.

BEN – balanço energético nacional: relatório síntese, **Empresa de Pesquisa Energética – EPE**, 2018. Disponível em: <http://epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-303/topico-397/Relat%C3%B3rio%20S%C3%ADntese%202018-ab%202017vff.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2019.

BENOLIEL, B. A novel promising Trichoderma harzianum strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura**: SpringerPlus a SpringerOpen Journal,** 2013 v 2, p 5, 2013. Disponível em: <https://www. springerplus.com/content /2/1/656 >. Acesso em 2 dez. 2019.

BHOSALE, J. India's 2019-20 sugar production to decline by 14.26%, says ISMA, **The Economic Times**, 2019. Disponível em: <https://economictimes.indiatimes.com/news/economy/agriculture/indias-2019-20-sugar-production-to-decline-by-14-26-says-isma/articleshow/70022013.cms>. Acesso em: 21 sep 2019.

BOONCHANAWIWAT, A. et al. QTL underlying plant and first branch height in cassava (Manihot esculenta Crantz). **Field Crops Research**, v. 121, p. 343-349, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378429011000190?via%3Dihub>. Acesso: 12 fev. 2020.

BORUŃ, A. Conductance and ionic association of selected imidazolium ionic liquids in various solvents**:** A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 214–224, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732218343307>. Acesso em: 27 ago. 2019.

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, p. 248-254, 1976. Disponível em: <http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2019.

CAGNATO, C.; PONCE, J.M. Ancient Maya manioc (*Manihot esculenta* Crantz) consumption: Starch grain evidence from late to terminal classic (8th–9th century CE) occupation at La Corona, northwestern Petén, Guatemala. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 16, p. 276–286, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352409X17303280>. Acesso em: 30 nov. 2019.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, 421-437, 2013. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v5n3a06.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2020.

CHOHAN, N.A. et al. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment. **Renewable energy**, v. 146, p. 1031-1040, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148119310626>. Acesso 25 nov. 2019.

SOARES, F.M.S.; SILVA, D.C.C. **Análise mensal: mandioca**. CONAB, 2016. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 01 dez. 2019.

COOPER, J. et al. Treatment and resource recovery options for first and second generation bioethanol spentwash e A review. **Chemosphere**, v. 241, p. 124975, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519322143>. Acesso em: 25 nov. 2019.

CORREIA, D.S. et al. Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. Documento 284: **EMBRAPA**, p. 10, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921259/1/DOC28411.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2019.

DANDU, M. S. R.; NANTHAGOPAL, K. Tribological aspects of biofuels - A review. **Fuel**, v. 258, p. 116066, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236119314206>. Acesso em: 25 nov. 2019.

DAVE, N. et al. A critical review on production of bioethanol from macroalgal biomass. **Algal Research**, v. 42, p. 101606, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926418310373>. Acesso em: 25 nov. 2019.

DIAS, M.O.S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152-161, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411014088>. Acesso em; 25 nov. 2019.

EGOROVA, K.S.; ANANIKOV, V.P. Fundamental importance of ionic interactions in the liquid phase: A review of recent studies of ionic liquids in biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Liquids**, v. 272, p. 271–300, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732218335499>. Acesso em: 27 nov. 2019.

EMBRAPA. 2018. **Mandioca em números**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>. Acesso em: 07 jul. 2019.

FERNANDES, E.G. et al. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84–92, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131500107X>. Acesso em: 27 nov. 2019.

GRASSI, M.C.B.; PEREIRA, G.A.G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 201–205, 2019. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018310586>. Acesso em: 25 nov. 2019.

GROXKO, M. **Prognóstico Mandioca 2017/18**. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento: DERAL - Departamento de Economia Rural, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/mandioca_2019_v1.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2019.

GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi**. Biotechnology Advances**, 2019. *In Press*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975019301624>. Acesso em: 01 dez. 2019.

GURAGAIN, Y. N. et al. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4416-4424, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410019280>. Acesso em: 25 nov. 2019.

HILDÉM, L.; VÄLJAMÄE, P.; JOHANSSON, G. Surface character of pulp fibres studied using endoglucanases. **Journal of Biotechnology**, v.118, p. 386–397, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950308>. Acesso em: 16 fev. 2020.

HIRASAWA, H. et al. Cellulase productivity of Trichoderma reesei mutants developed in Japan varies with varying pH conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, p. 264-273, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172318309691>. Acesso em: 26 nov. 2019.

IBARRA-GONZALEZ, P.; RONG, B. G. A review of the current state of biofuels production from lignocellulosic biomass using thermochemical conversion routes. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 1523-1535, Jul 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1004954118305779>. Acesso em: 25 nov. 2019.

INGLE, A.P. et al. Comparative evaluation of free and immobilized cellulase for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable bioethanol production. **Cellulose**, v. 24, p. 5529–5540, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-017-1517-1>. Acesso em: 01 dez. 2019.

JAMBO, S. A. et al. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 756-769, Nov 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116303926 >. Acesso em: 25 nov. 2019.

JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261200594X>. Acesso em: 27 nov. 2019.

JIA, M. et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 906, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899461/>. Acesso em: 01 dez. 2019.

KAMESHWAR, A.K.S.; QIN, W. Analyzing Phanerochaete chrysosporium gene expression patterns controlling the molecular fate of lignocellulose degrading enzymes. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 51–62, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511317314241>. Acesso em: 01 dez. 2019.

KHUMAIDA, N. et al. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Improvement through Gamma Irradiation. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 27 – 34, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X15000048>. Acesso: 12 fev. 2020.

LATIF, S.; MÜLLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, p.147-158, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415000990>. Acesso em: 30 nov. 2019.

LAWAL, I. A. et al. Brief bibliometric analysis of “ionic liquid” applications and its review as a substitute for common adsorbent modifier for the adsorption of organic pollutants. **Environmental Research**, v. 175, p. 34–51, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935119302579>. Acesso em: 30 nov. 2019.

LEE, S. **Alternative Fuels - Applied Energy Technology Series**, Taylor & Francis, 1st ed., 1996. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=GBnEDJZase8C&pg=PR4&lpg=PR4&dq=Alternative+Fuels.++Taylor+%26+Francis,+1996&source=bl&ots=E1kj6wSjcU&sig=ACfU3U1L-R2EWk74HjtmV6ZyF9kRgYgKsg&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwiHzvGluIbmAhVVHrkGHf_NCu8Q6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=Alternative%20Fuels.%20%20Taylor%20%26%20Francis%2C%201996&f=false>. Acesso em: 25 nov. 2019.

LI, P.; SAKURAGI, K.; MAKINO, H. Extraction techniques in sustainable biofuel production: A concise review. **Fuel Processing Technology**, v. 193, p. 295-303, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037838201930219X>. Acesso em: 25 nov. 2019.

LI, S.-J. et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticâncer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316-343, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418305713>. Acesso em: 27 nov. 2019.

MACHADO, F. B. P. Brasil, a doce terra – História do Setor, **Agencia Embrapa de Informação Tecnológica**, 2003. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/historia_da_cana_000fhc62u4b02wyiv80efhb2attuk4ec.pdf>. Acesso em 20 de set. 2019.

MANGANYI, M.C. et al. Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 192–199, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629917312462>. Acesso em: 27 nov. 2019.

MARQUES, N.P. et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018304333>. Acesso em: 26 nov. 2019.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MATTOS, P.L.P.; FARIAS, A.R.N.; FERREIRA FILHO, J.R. **Mandioca: O produtor pergunta a Embrapa responde**, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/643719/mandioca-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde>. Acesso em 01 dez. 2019.

MENDIARA, T; et al. Negative CO_2 emissions through the use of biofuels in chemical looping technology: A review. **Applied Energy**, v. 232, p. 657-684, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261918315186>. Acesso em: 25 nov. 2019.

MOHAPATRA, S. et al. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulase from a newly isolated Aspergillus fumigatus. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 262–272, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418300300>. Acesso em: 01 dez. 2019.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 27, p.77–93, 2013. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113004103>. Acesso em: 01 dez. 2019.

MORA-PELE, M. et al. Room temperature ionic liquidsas emerging for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering.** v.108, 2011. Disponível em: <https://doi-org.ez328.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bit.23108>. Acesso em: 01 fev. 2020.

MOREIRA, P.H.S.S. et al. Production of carboxymethyl lignin from sugar cane bagasse: A cement retarder additive for oilwell application. **Industrial Crops & Products**, v. 116, p. 144–149, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018300864>. Acesso em: 25 nov. 2019.

NDAM, Y. N. et al. Influence of cultivars and processing methods on the cyanide contents of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its traditional food products. **Scientific African**, v. 5, p. e00119, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227619306805>. Acesso: 12 fev. 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NULWALA, H.; MIRJAFARI, A.; ZHOU, X. Ionic liquids and poly(ionic liquid)s for 3D printing – A focused mini-review. **European Polymer Journal**, p. 108, p. 390–398, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014305718311169>. Acesso em: 28 nov. 2019.

OJEDA, K.; SANCHEZ, E.; KAFAROV, V. Sustainable ethanol production from lignocellulosic biomass - Application of exergy analysis. **Energy**, v. 36, p. 2119-2128, Apr 2011. Disponível em; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544210004536>. Acesso em: 25 nov.2019.

PÄES, G. et al. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 564–592, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975011001844>. Acesso em: 01 dez. 2019.

PASSOS, D.D.; PEREIRA, N.; DE CASTRO, A.M. A comparative review of recent advances in cellulases production by Aspergillus, Penicillium and Trichoderma strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60-66, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452223618300397>. Acesso em: 26 nov. 2019.

PATEL, A.K et al. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385-392, May 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419300628>. Acesso em: 26 nov. 2019.

PAZUCH, F.A. et al. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 34–42, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032117303532>. Acesso em: 25 nov. 2019.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M.; AMBROGI, B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10-21, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942216301157?via%3Dihub >. Acesso: 12 fev. 2020.

PRASAD, R. K. et al. Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. **Chemosphere**, v. 231, p. 588-606, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519310549>. Acesso em: 25 nov. 2019.

REBAH, F.B.; MILED, N. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. **Biotechnology**, v. 3, p. 255–265, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3723863/>. Acesso em 27 nov. 2019.

ROBL, D. et al. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by Annulohypoxylon stygium glycohydrolases. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 247–254, 2015. Disponível em: <ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496945>. Acesso em: 01 dez. 2019.

SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, p. 5, p. 337-353, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28324547>. Acesso em: 25 nov.2019.

SAJID, M. Magnetic ionic liquids in analytical sample preparation: A literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 210-223, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993618305697>. Acesso em: 27 nov. 2019.

SALEEM, M. et al. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized .endoglucanase from Arachniotus citrinus. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 849–855, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204001293>. Acesso em: 16 fev. 2020.

SANTOS, B. et al. Dosagem de açúcares redutores com o relativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology.** v.20, p. e2015113, 2017. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/bjft/v20/1981-6723-bjft-1981-672311315.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020.

SAS, O.G. ET AL. Liquid-liquid extraction of phenolic compounds from water using ionic liquids: Literature review and new experimental data using [C_2mim]FSI. **Journal of Environmental Management**, v. 228, p. 475–482, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718310417>. Acesso em: 27 nov. 2019.

SHI, YW. et al. Endophytic fungal diversity and space-time dynamics in sugar beet. **European Journal of Soil Biology**, v. 77, p. 77-85, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556316300991>. Acesso em: 27 nov.2019.

SOARES, B.G. Ionic liquid: A smart approach for developing conducting polymer composites: A review. **Journal of Molecular Liquids**, V. 262, P. 8–18, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016773221831273X>. Acesso em: 28 nov. 2019.

SOUZA, L.O. et al. Comparison of the properties between the xylanases of Termomyces lanuginosus (Sigma) and excreted by penicillium roqueforti ATTC 10110 during the solid state fermentation of sugar bagasse: **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v 16, p. 278-281, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez328.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1878818118300926>. Acesso em: 02 dez. 2019.

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, Feb 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032117312212>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SYUAN, K.Y.; GAIK AI, L.O.; SUAN, T.K. Evaluation of cellulase and xylanase production from *Trichoderma harzianum* using acid-treated rice straw as solid substrate. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, p. 22109–22117, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785318318765>. Acesso em: 01 dez. 2019.

TAPPIBAN, P. et al. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 167–180, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418305053>. Acesso em: 30 nov. 2019.

THANGAVELU, S.K. et al. Microwave assisted acid hydrolysis for bioethanol fuel production from sago pith waste. **Waste Management**, v. 86, p. 80-86, Mar 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X19300492>. Acesso em: 25 nov. 2019.

THANGAVELU, S.K.; AHMED, A.S.; ANI, F.N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 820–835, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115013568>. Acesso em: 25 nov. 2019.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants Terminalia catappa, Terminalia mantaly and Cananga odorata. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146-153, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462991630031X>. Acesso em 26 nov. 2019.

TRINH, L. T. P. et al. Aqueous acidified ionic liquid pretreatment for bioethanol production and concentration of produced ethanol by pervaporation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 69, p. 57-65, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X18306270>. Acesso em: 25 nov. 2019.

VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2405–2411, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015612>. Acesso em: 15 fev. 2020.

VERMA, C. et al. Dissolution of cellulose in ionic liquids and their mixed cosolvents: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 13, p. 100162, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352554119300579>. Acesso em: 27 nov. 2019.

ZAKZESKI, J. et al. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Review**, v. 110, p. 3552–3599, 2010. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr900354u>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ZENG, L. et al. Biochar and crushed straw additions affect cadmium absorption in cassavapeanut intercropping system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 520–530, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651318310145>. Acesso em: 30 nov. 2019.

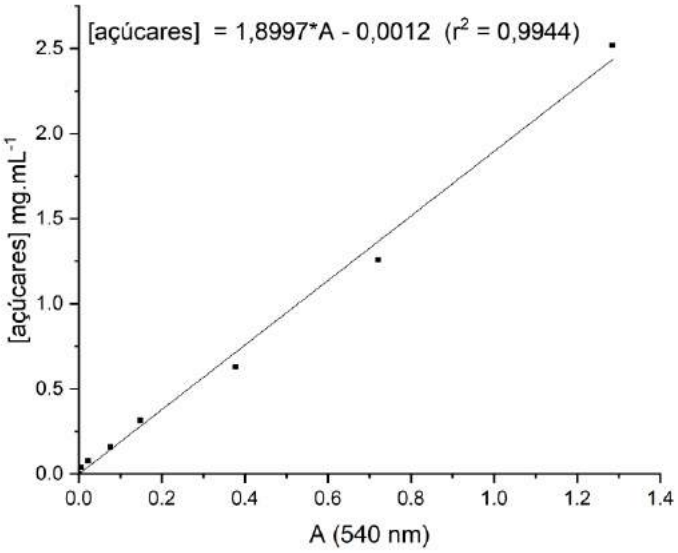
ZHAO, Y.; DAMGAARD, A.; CHRISTENSEN, T. H. Bioethanol from corn stover - a review and technical assessment of alternative biotechnologies. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 67, p. 275-291, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036012851730223X >. Acesso em: 25 nov. 2019.

APÊNDICES

Apêndice A – Avaliação quantitativa da produção de celulases pelos fungos

Nas tabelas 24 e 25 bem como Figura 58 e Figura 59 estão descritos os dados referentes a análise quantitativa de produção de celulases pelos fungos avaliados.

Figura 58 – Curva de calibração da quantificação de açúcares



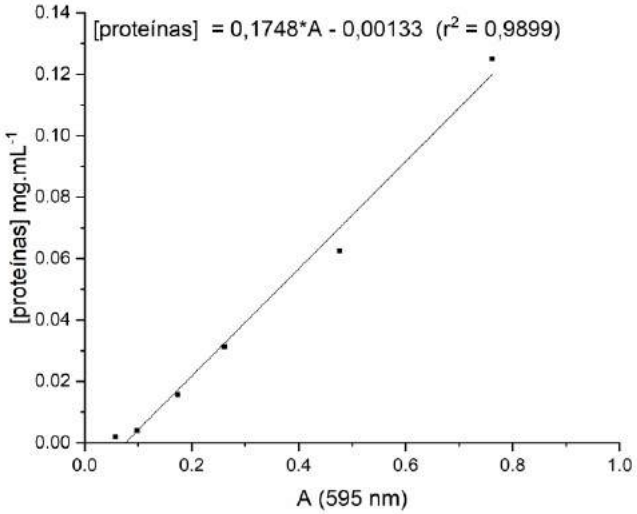
Fonte: Autor

Tabela 24 –Análise de produção de celulase pelos fungos

Padrão/Extrato enzimático	[açúcares] média mg.mL^{-1}	DP	[açúcares] 1 mg.mL^{-1}	[açúcares] 2 mg.mL^{-1}
PADRÃO	1,671	0,017	1,658	1,683
CA1	0,263	0,017	0,276	0,251
CA2	0,234	0,013	0,243	0,224
CA5	0,089	0,009	0,096	0,082
CA8	0,139	0,013	0,149	0,130
CA11	0,063	0,003	0,065	0,061
CA12	0,046	0,008	0,052	0,041
CA14	0,831	0,011	0,824	0,839
CA17	0,463	0,032	0,441	0,486

Fonte: Autor

Figura 59 – Curva de calibração da quantificação de proteínas



Fonte: Autor

Tabela 25 – Determinação da concentração de proteínas dos extratos

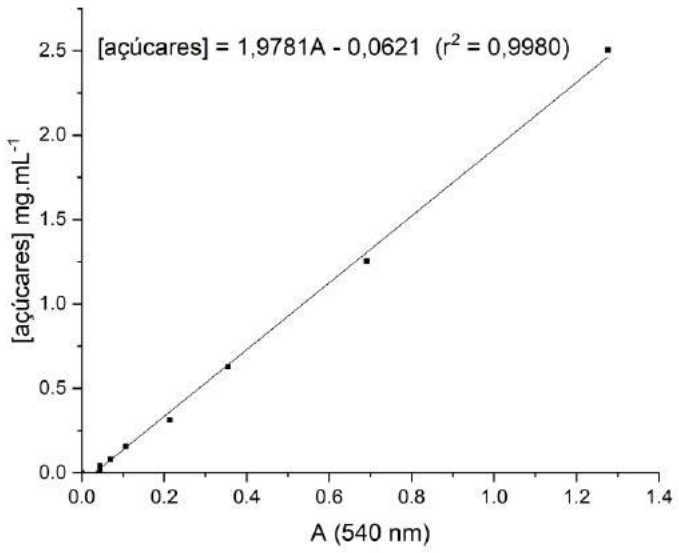
Extrato enzimático	[proteínas] média mg.mL^{-1}	DP	[proteínas] mg.mL^{-1}
CA1-1	0,049	0,000	0,049
CA1-2			0,049
CA2-1	0,101	0,001	0,100
CA2-2			0,102
CA5-1	0,072	0,000	0,073
CA5-2			0,072
CA8-1	0,070	0,000	0,070
CA8-2			0,070
CA11-1	0,050	0,000	0,050
CA11-2			0,050
CA12-1	0,056	0,001	0,055
CA12-2			0,057
CA14-1	0,058	0,001	0,057
CA14-2			0,058
CA17-1	0,046	0,001	0,045
CA17-2			0,046

Fonte: Autor

Apêndice B – Influência do tempo e pH de crescimento

Nas tabelas 26-28 e Figura 60 e Figura 61 estão descritos os dados referentes a determinação do tempo e pH ideais de crescimento dos fungos para a produção de celulase.

Figura 60 – Curva de calibração da determinação da influência do tempo



Fonte: Autor

Tabela 26 – Influência do tempo na produção de celulases por CA14

Tempo (dia)	Atividade ($FPU.mL^{-1}$)	DP	Atividade 1 ($FPU.mL^{-1}$)	Atividade 2 ($FPU.mL^{-1}$)
4	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,047	0,001	0,046	0,0477
11	0,089	0,007	0,084	0,095
13	0,212	0,004	0,215	0,209
15	0,141	0,008	0,136	0,147
18	0,178	0,010	0,185	0,171

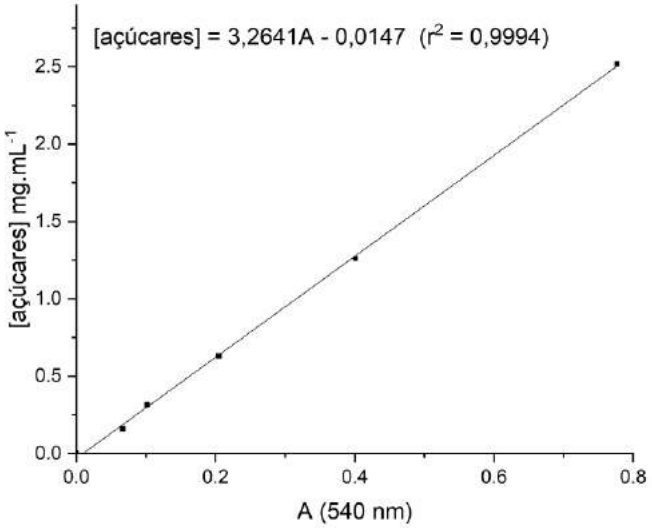
Fonte: Autor

Tabela 27 – Influência do tempo na produção de celulases por CA17

Tempo (dia)	Atividade (FPU.mL^{-1})	DP	Atividade 1 (FPU.mL^{-1})	Atividade 2 (FPU.mL^{-1})
4	0,032	0,005	0,029	0,036
6	0,070	0,005	0,074	0,067
11	0,088	0,005	0,084	0,092
13	0,108	0,008	0,114	0,102
15	0,201	0,010	0,194	0,209
18	0,138	0,005	0,141	0,134

Fonte: Autor

Figura 61 – Curva de calibração da influência da temperatura



Fonte: Autor

Tabela 28 – Influência do pH na produção de celulases por CA14

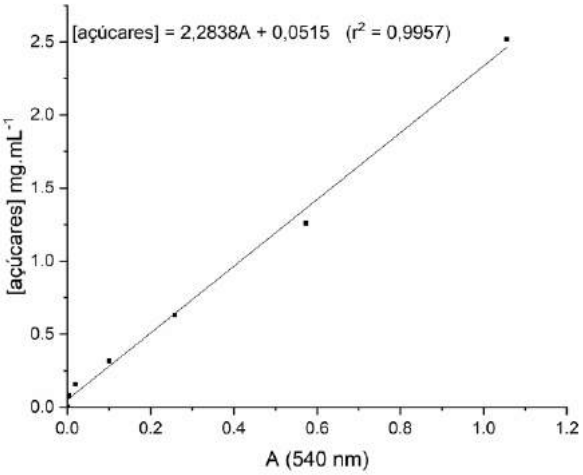
pH	Atividade (FPU.mL^{-1})	DP	Atividade 1 (FPU.mL^{-1})	Atividade 2 (FPU.mL^{-1})
3,00	0,331	0,002	0,332	0,329
4,00	0,549	0,007	0,544	0,554
5,00	0,396	0,019	0,383	0,409
6,00	0,414	0,007	0,419	0,409
7,00	0,392	0,003	0,390	0,395
7,40	0,407	0,010	0,400	0,414

Fonte: Autor

Apêndice C – Pré-purificação do extrato enzimático

Nas figuras 62 e 63 e, tabelas 29 e 30 estão descritos os resultados referentes a pré-purificação do extrato enzimático proveniente de CA14.

Figura 62 – Curva de calibração da determinação dos dados



Fonte: Autor

Tabela 29 – Dados referentes a hidrólise enzimática

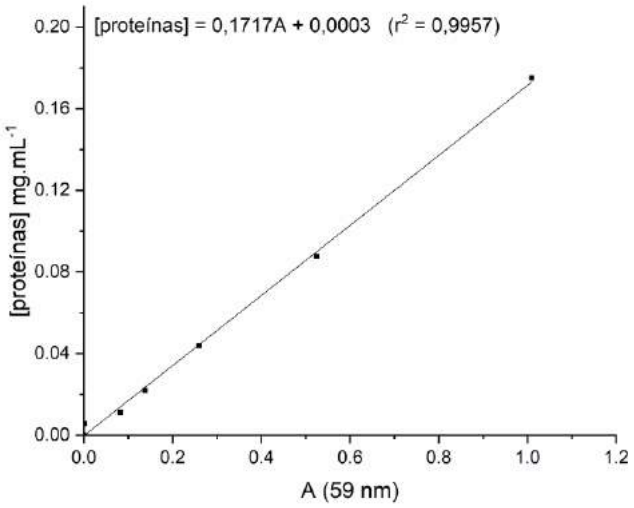
Extrato	Atividade ($FPU.mL^{-1}$)	DP	Atividade 1 ($FPU.mL^{-1}$)	Atividade 2 ($FPU.mL^{-1}$)
bruto	0.427	0.007	0.421721	0.431861
25	0.281	0.000	0.28145	0.28145
50	0.430	0.002	0.431861	0.428481
75	0.019	0.002	0.021188	0.017808
final	0.063	0.001	0.061749	0.063439

Fonte: Autor

Tabela 30 – Dados de concentração de proteínas

Amostras	Concentração ($mg.mL^{-1}$)	DP	Concentração 1 ($mg.mL^{-1}$)	Concentração 2 ($mg.mL^{-1}$)
Bruto	0.016	0.000	0.016	0.016
25	0.025	0.000	0.025	0.025
50	0.014	0.001	0.013	0.015
75	0.261	0.002	0.259	0.262
final	0.04	0.01	0.026	0.052

Figura 63 – Curva de calibração da dosagem de proteínas

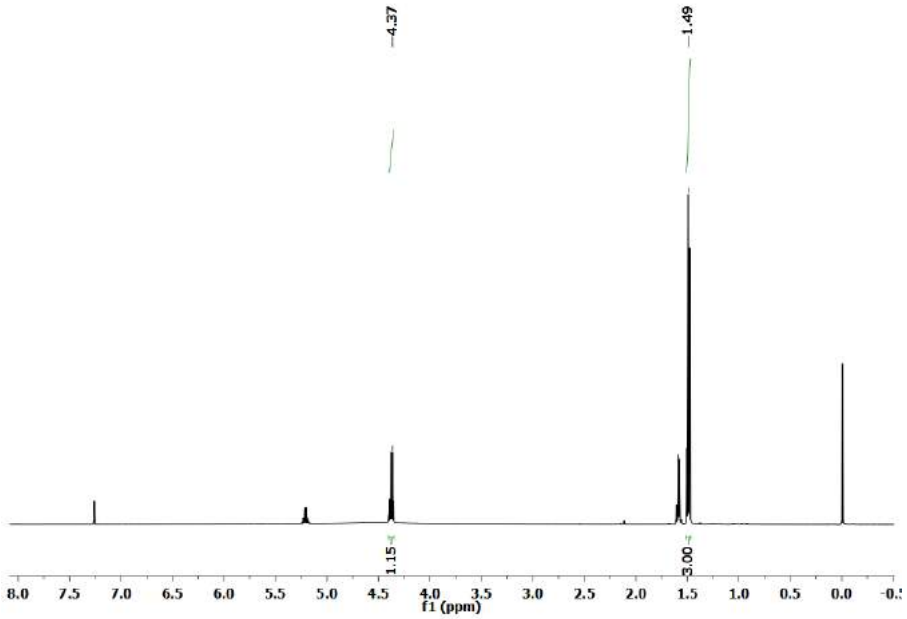


Fonte: Autor

Apêndice D – Produção dos líquidos iônicos

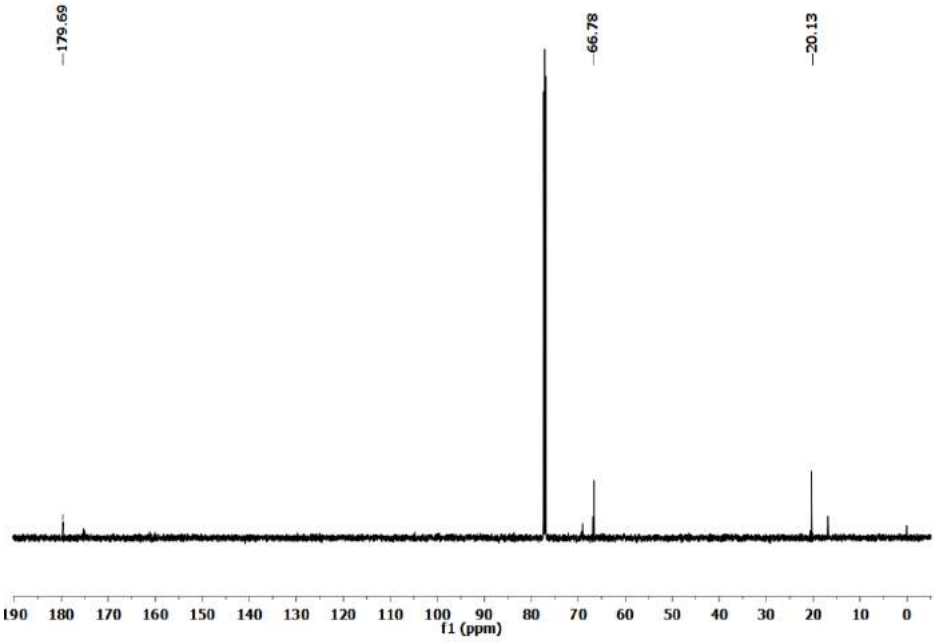
Nas Figuras 64 a 79 são apresentados os espectros de RMN obtidos durante a análise dos ácidos, aminas e líquidos iônicos utilizados no presente trabalho.

Figura 64 – Espectro de RMN-H[1] Ácido láctico



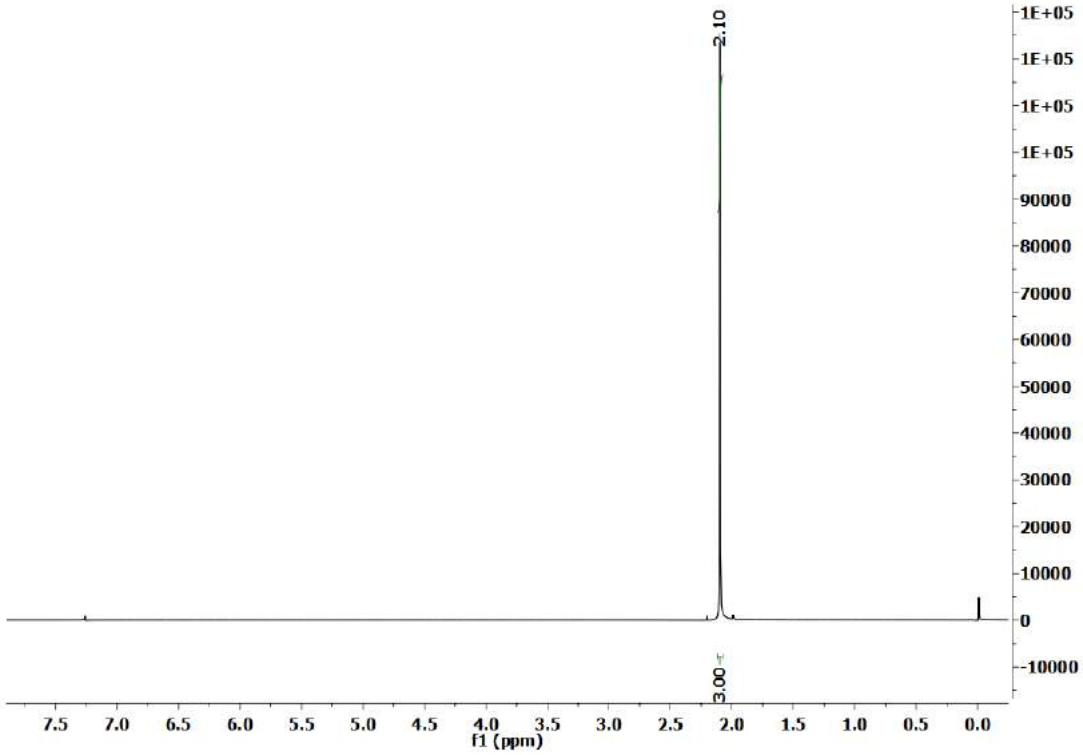
Fonte: Autor

Figura 65 – Espectro de RMN-C[13] Ácido láctico



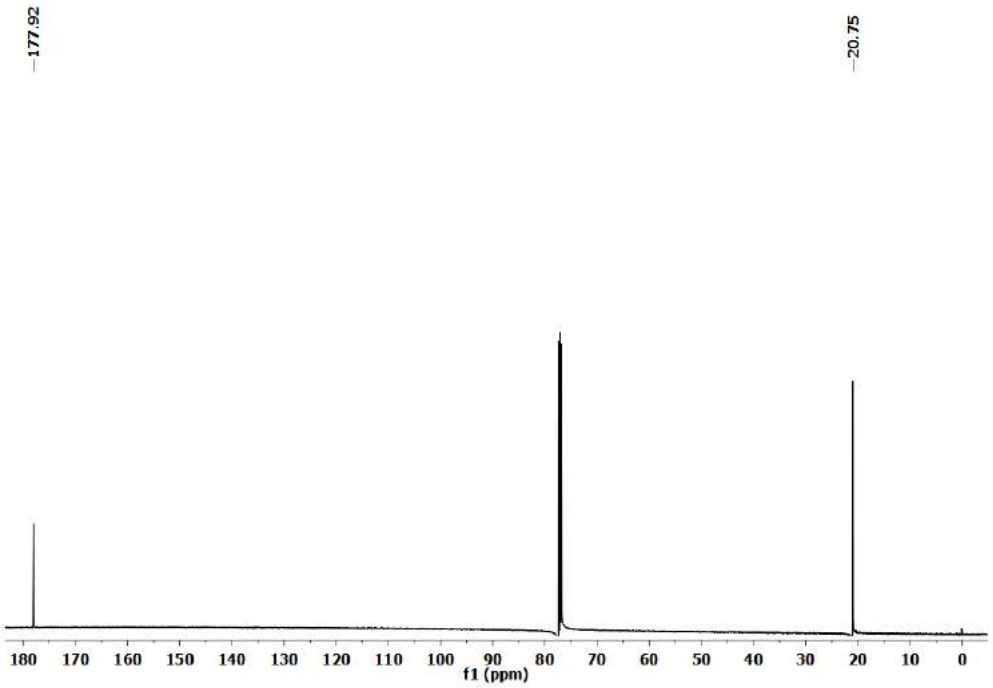
Fonte: Autor

Figura 66 – Espectro de RMN-H[1] Ácido acético



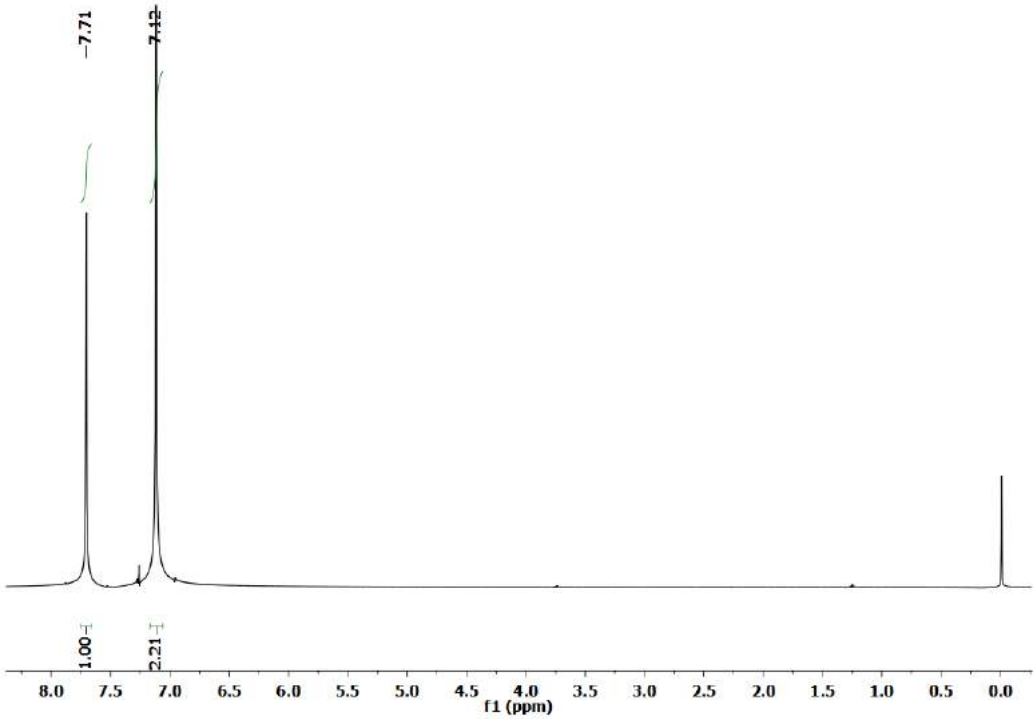
Fonte: Autor

Figura 67 – Espectro de RMN-C[13] Ácido acético



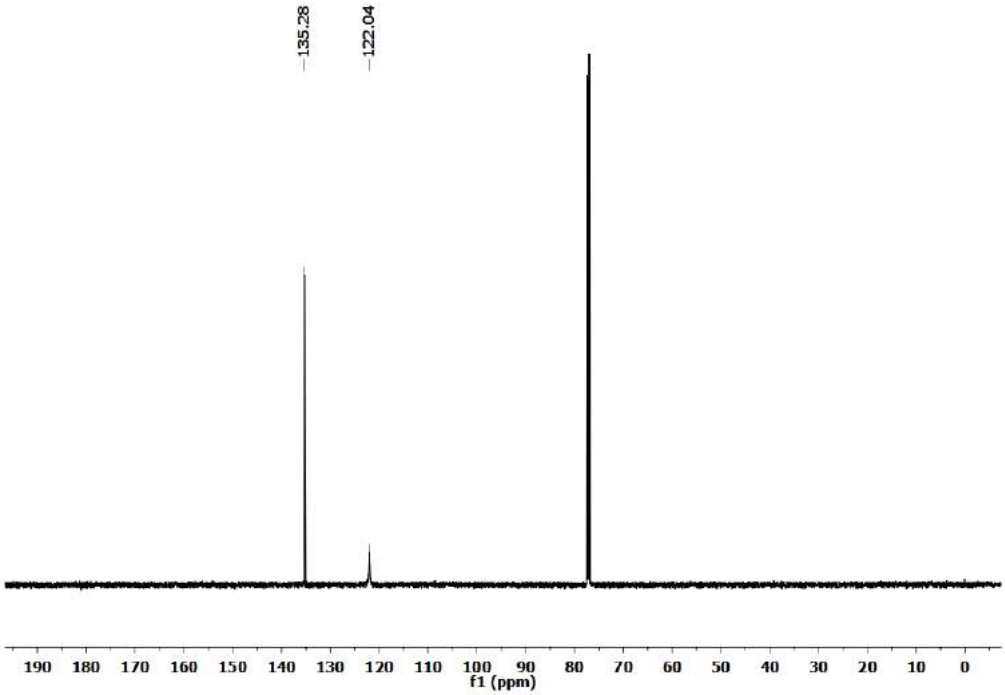
Fonte: Autor

Figura 68 – Espectro de RMN-H^1 imidazol



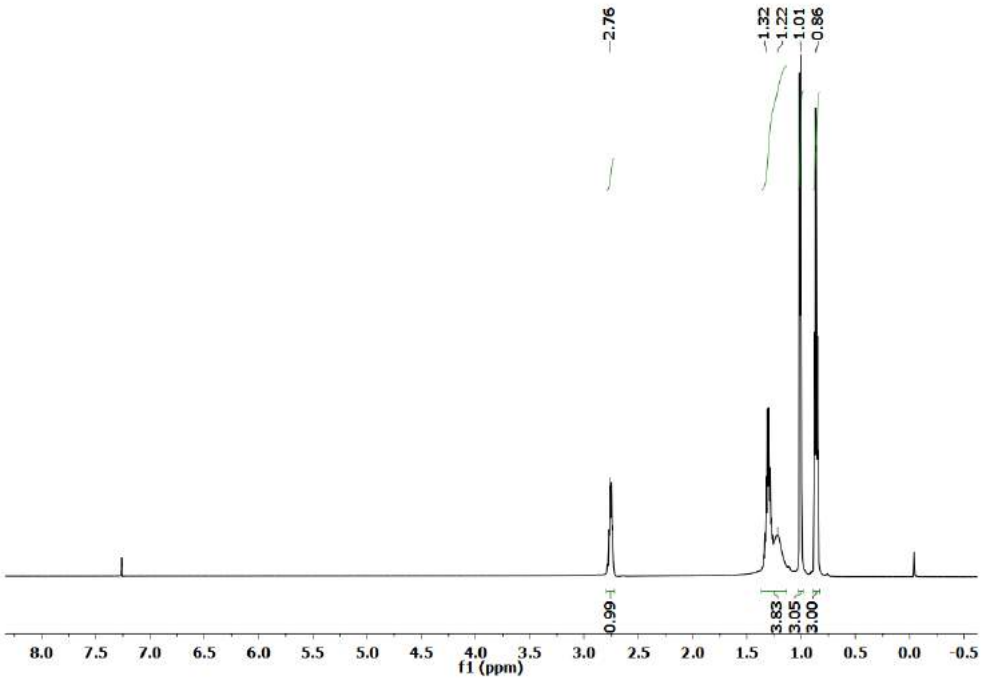
Fonte: Autor

Figura 69 – Espectro de RMN-C^{13} imidazol



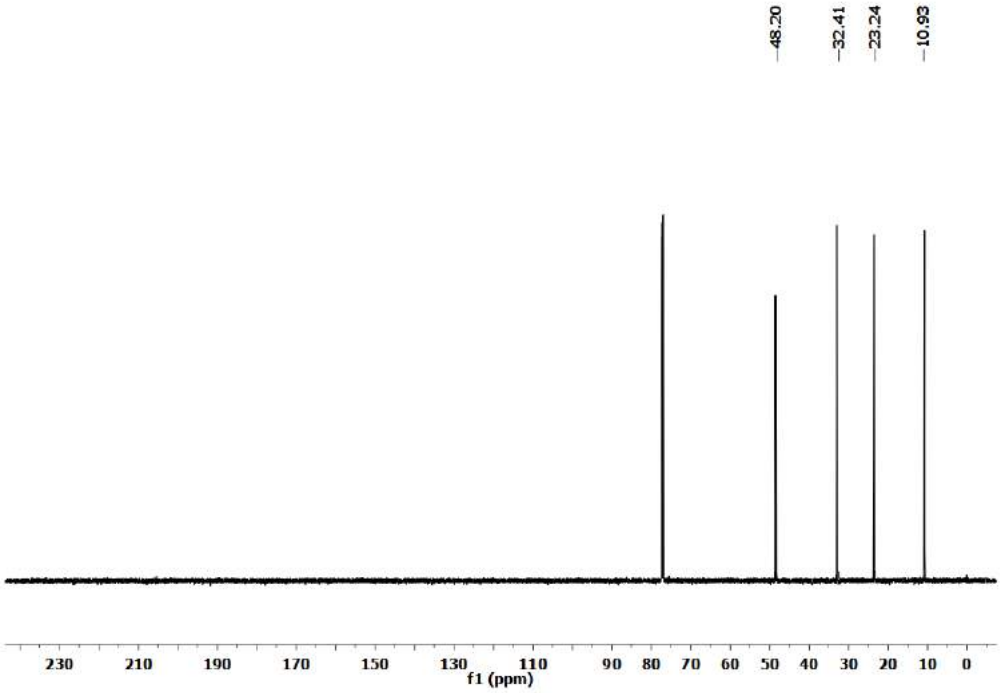
Fonte: Autor

Figura 70 – Espectro de RMN-H[1] *sec*-butilamina



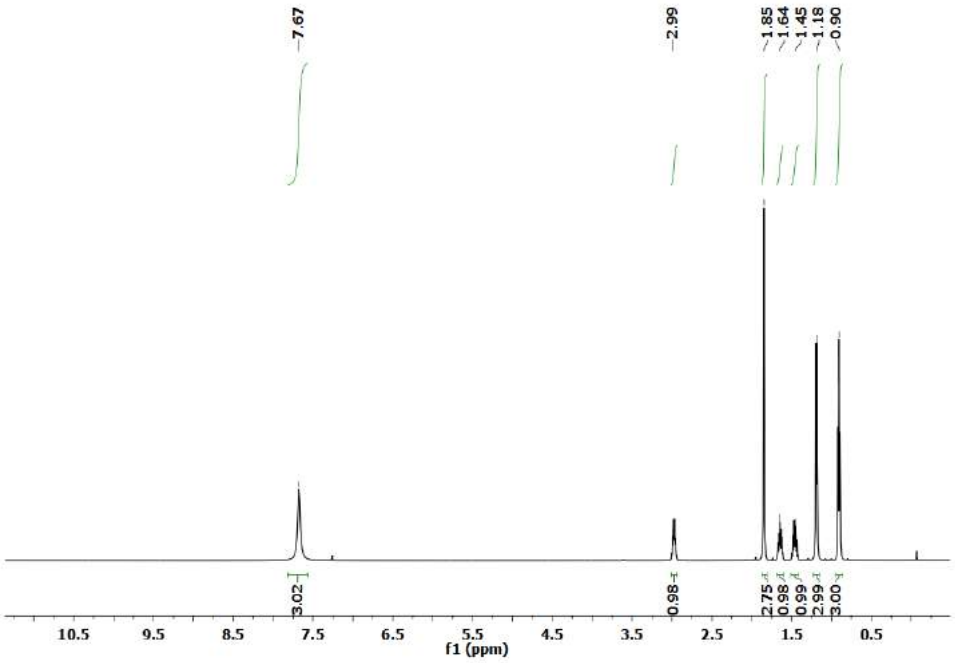
Fonte: Autor

Figura 71 – Espectro de RMN-C[13] *sec*-butilamina



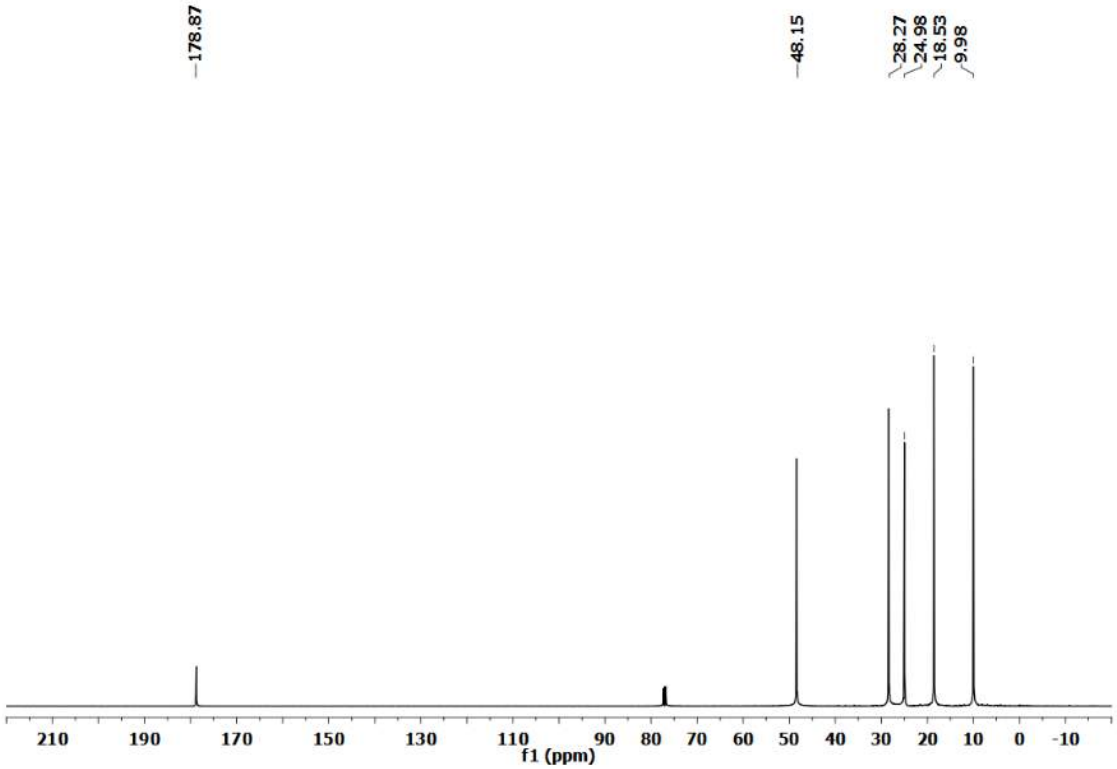
Fonte: Autor

Figura 72 – Espectro de RMN-H[1] acetato de *sec*-butilamônio



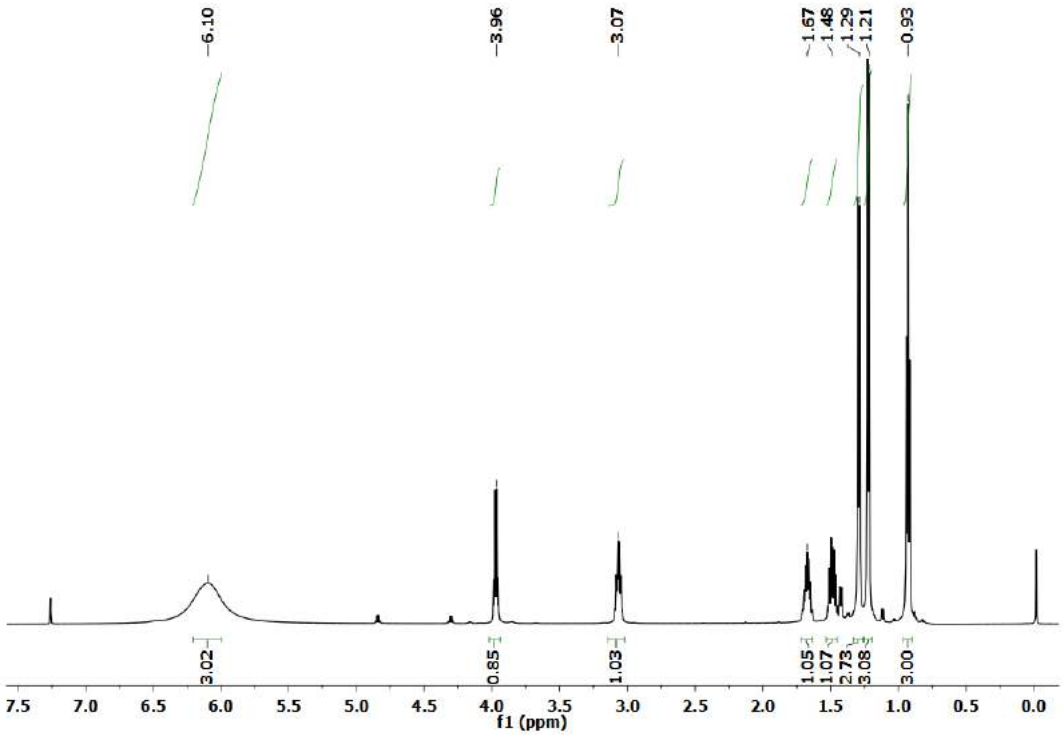
Fonte: Autor

Figura 73 – Espectro de RMN-C[13] acetato de *sec*-butilamônio



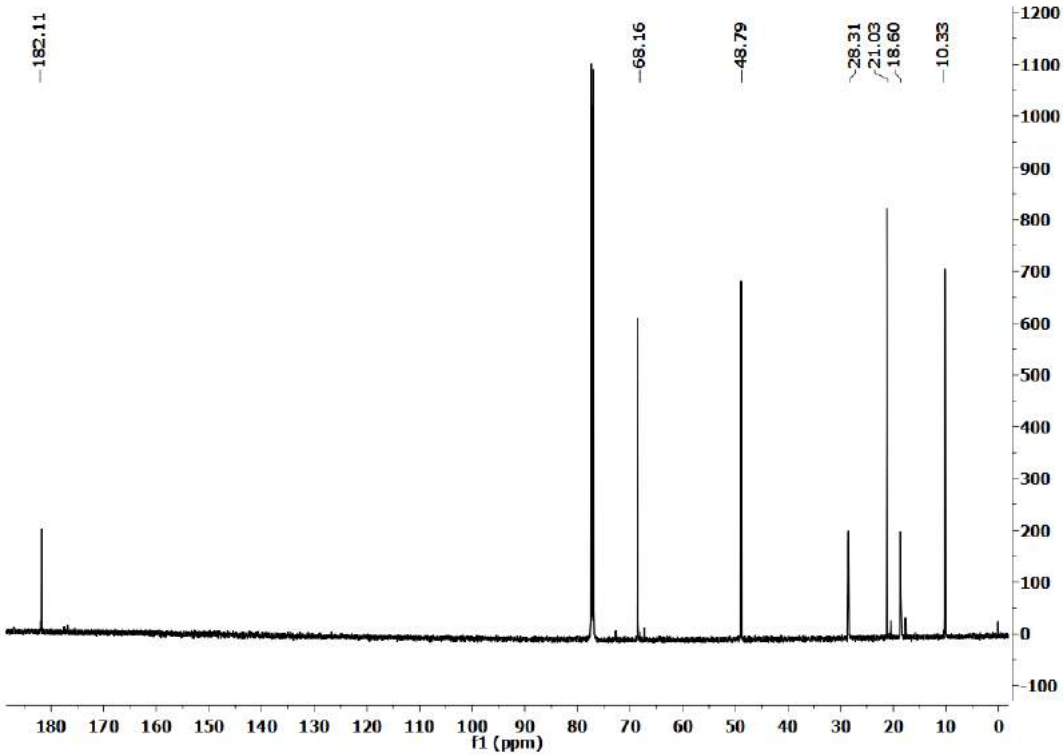
Fonte: Autor

Figura 74 – Espectro de RMN-H[1] lactato de *sec*-butilamônio



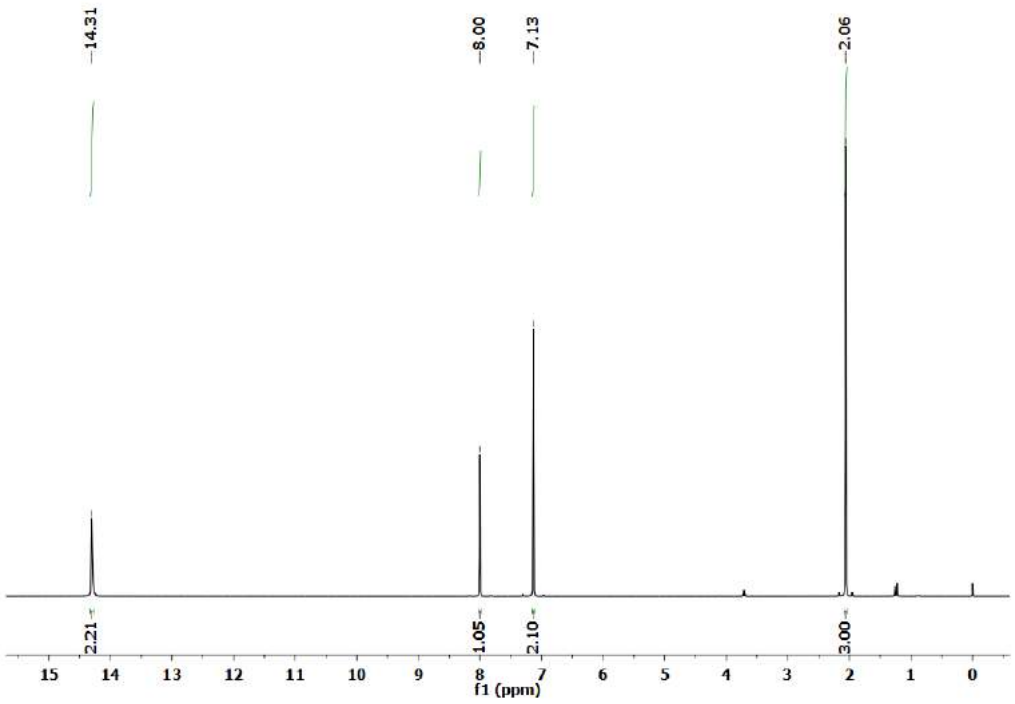
Fonte: Autor

Figura 75 – Espectro de RMN-C[13] lactato de *sec*-butilamônio



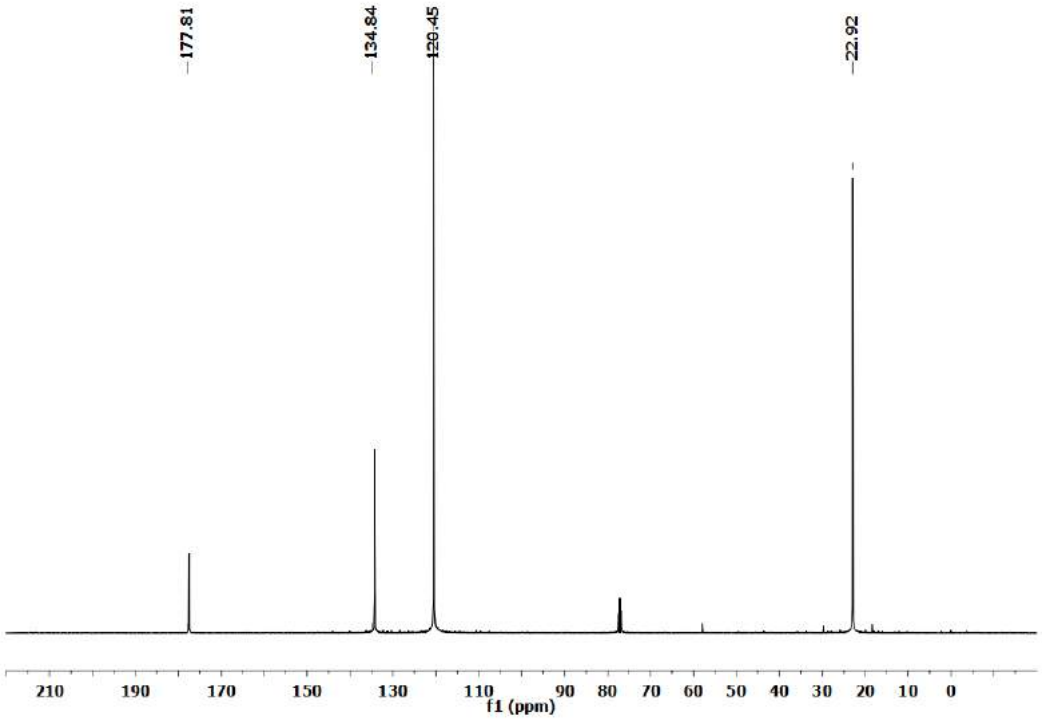
Fonte: Autor

Figura 76 – Espectro de RMN-H[1] acetato de imidazólio



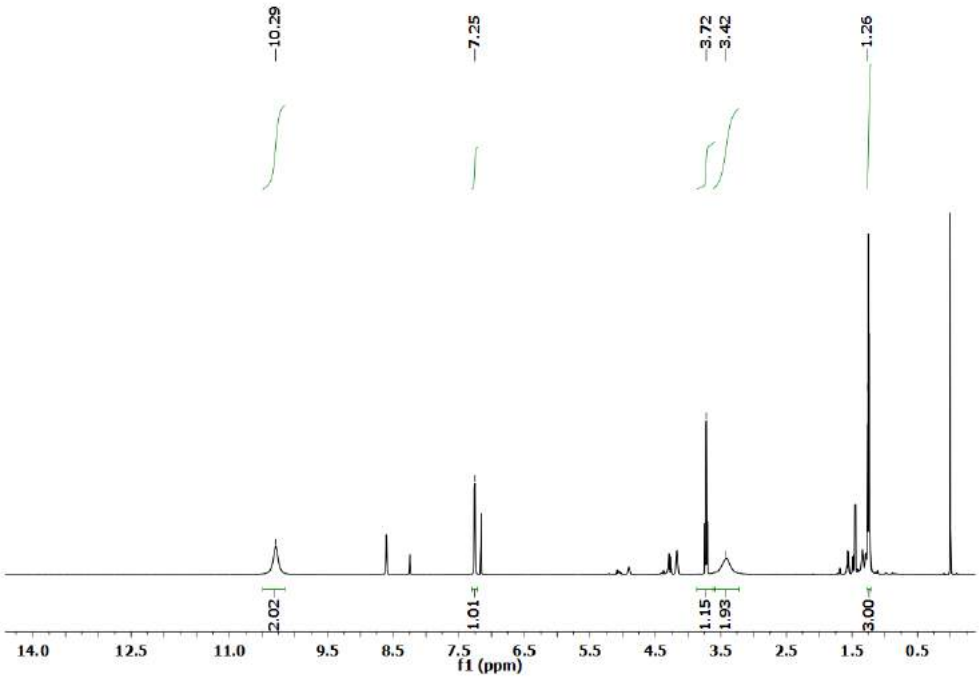
Fonte: Autor

Figura 77 – Espectro de RMN-C[13] acetato de imidazólio



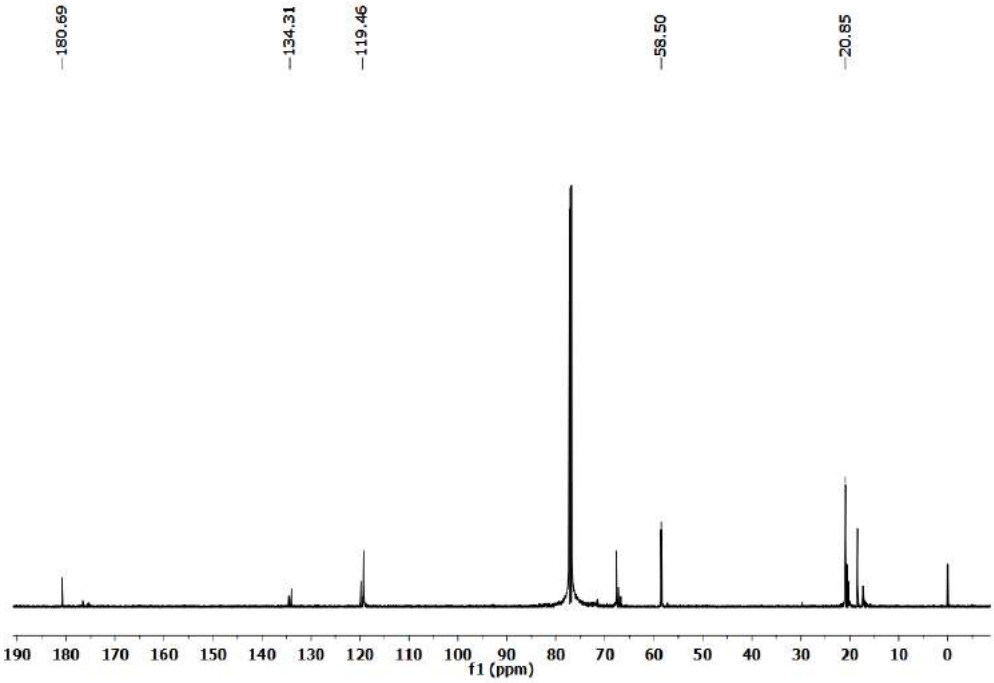
Fonte: Autor

Figura 78 – Espectro de RMN-H[1] lactato de imidazólio



Fonte: Autor

Figura 79 – Espectro de RMN-C[13] lactato de imidazólio

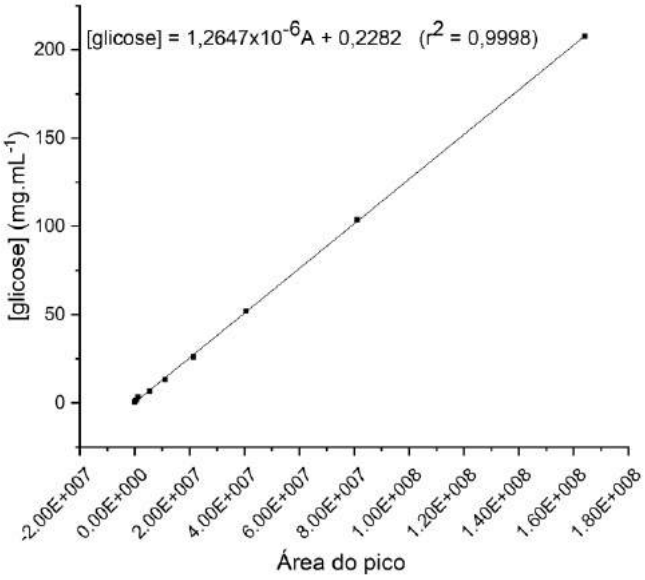


Fonte: Autor

Apêndice E – Hidrólise do bagaço de cana tratado com diferentes LIs

Nas figuras 80 e 81 bem como tabelas 31 e 32 estão apresentados os dados referentes a hidrólise do bagaço de cana submetido ao tratamento com diferentes líquidos iônicos.

Figura 80 – Curva de calibração da concentração de glicose



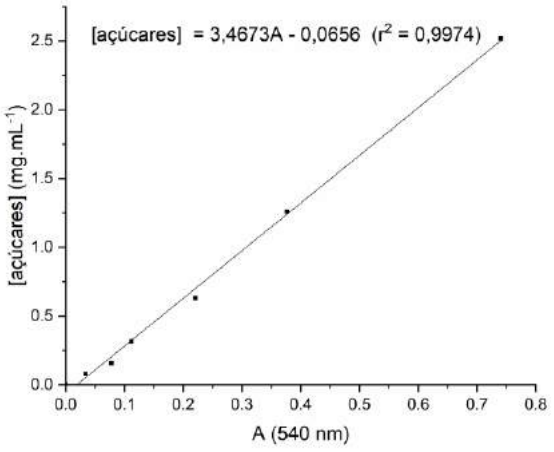
Fonte: Autor

Tabela 31 – Dados de concentração de glicose

Amostras de bagaço tratado	C (mg.mL^{-1})	C (mg.mL^{-1})	DP
lactato de imidazólio	1.467	1.484	0.023
	1.500		
lactato de *sec*-butilamônio	1.941	1.977	0.051
	2.012		
acetato de imidazolio	1.245	1.418	0.245
	1.591		
acetato de *sec*-butilamônio	1.352	1.337	0.022
	1.321		

Fonte: Autor

Figura 81 – Curva de calibração do tempo de hidrólise



Fonte: Autor

Tabela 32 – Dados referentes ao tempo de hidrólise

Tempo (h)	C (mg.mL^{-1})	DP	C 1 (mg.mL^{-1})	C (mg.mL^{-1})
2 2.00	0.995	0.014	0.985	1.005
4.00	1.146	0.022	1.162	1.131
8.00	1.182	0.019	1.196	1.169
24.00	1.198	0.040	1.170	1.227
32.00	1.345	0.039	1.373	1.317
40.00	1.212	0.004	1.209	1.215
48.00	1.139	0.005	1.135	1.142

Fonte: Autor