

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RICARDO MARCHEZAN FARIAS DE MESQUITA

INFLUÊNCIA DE BIOSSURFACTANTES RAMNOLIPÍDICOS NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO CAVACO DE EUCALIPTO

Recife
2019

RICARDO MARCHEZAN FARIAS DE MESQUITA

**INFLUÊNCIA DE BIOSSURFACTANTES RAMNOLIPÍDICOS NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO CAVACO DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadora: Profa. Dra. Ester Ribeiro de Andrade.

Coorientador: Dr. Henrique Macedo Baudel.

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Mesquita, Ricardo Marchezan Farias de
Influência de biossurfactantes ramnolipídicos na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto / Ricardo Marcherzan Farias de Mesquita. – 2019.

116 f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ester Ribeiro de Andrade.

Coorientador: Prof. Henrique Macedo Baudel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Biossurfactantes. 2. Bactérias. 3. Hidrolise. I. Andrade, Ester Ribeiro de (orientador). II. Baudel, Henrique Macedo (coorientador). III. Título.

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 134

RICARDO MARCHEZAN FARIAS DE MESQUITA

**INFLUÊNCIA DE BIOSURFACTANTES RAMNOLIPÍDICOS NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO CAVACO DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Ester Ribeiro de Andrade (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a. Norma Buarque de Gusmão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro (Examinador Externo)

Universidade de Pernambuco - UPE

Dedico esse trabalho a meus pais, Eliane Mesquita e Edson Mesquita. Não seria nada sem eles ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu Deus por tudo que fez em minha vida e está fazendo. Minha eterna gratidão.

Agradeço a minha família, principalmente meus pais Eliane Mesquita e Edson Mesquita pelo apoio, incentivo, compreensão, amor e principalmente pelo companheirismo, sempre estando ao meu lado quando precisei.

Ao meu companheiro Junior Santos, por ser prestativo e paciente comigo durante a construção deste trabalho.

A minha orientadora, Ester Ribeiro de Andrade, pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria que muito me auxiliou neste estudo.

Ao meu coorientador Henrique Macedo Baudel por sua sabedoria, ensinamentos e incentivo para realização desta pesquisa.

A America Biomass Technologies pela parceria e colaboração neste trabalho.

Aos professores Andrea Bandeira e Fernando Hallwass por toda dedicação, conhecimento e ensinamento na purificação e caracterização estrutural dos biossurfactantes ramnolipídicos.

Aos meus estagiários, Abdênego Rodrigues, André Monteiro, Leonardo Oliveira e Karolaine Santos, pelo apoio, ajuda e colaboração.

Aos meus colegas e parceiros do Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos, Mariana, Roberta, Renata e Walkeane, pelo carinho, amizade e companheirismo, e, em especial a Eloyza, Letícia e Zilmar por todo companheirismo, alegria e apoio durante os experimentos.

A CAPES, o órgão financiador da presente pesquisa.

A coordenação da Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco por todo apoio, colaboração e atenção. Aos professores pertencentes à Pós-graduação que me ensinaram, incentivaram e ajudaram, contribuindo para meu crescimento.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos e estímulo.

Aos meus colegas da Pós-graduação, Beatriz Galdino, Camila Mendes, Karol Ribeiro e Úrsula Rodrigues, pelo carinho e incentivo para realização deste trabalho. Ao meu amigo Iranildo Cruz por todo conhecimento, parceria e auxílio.

E por fim a todos os colegas que estiveram presentes e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

"E descobri o que precisava descobrir: que a Verdade sempre está onde existe a Fé"
(COELHO, 1994, p. 85)

RESUMO

A hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas, tais como o cavaco da madeira de eucalipto, tem sido indicada como uma interessante alternativa para a produção de açúcares fermentescíveis. Recentes estudos têm demonstrado que a utilização de surfactantes pode aumentar significativamente a conversão enzimática da holocelulose (celulose e hemicelulose) presente nas biomassas lignocelulósicas, otimizando, portanto, a eficiência das enzimas como agentes de sacarificação. Especificamente, os ramnolipídeos, biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, vêm sendo citados na literatura como potenciais aditivos na hidrólise enzimática destes materiais. Com base no exposto, a presente pesquisa objetivou analisar a influência dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto, bem como avaliar o potencial destes como indutores da sacarificação enzimática em comparação com o surfactante sintético Triton X-100. Linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, TGC02 e TGC07, foram utilizadas para a produção dos biossurfactantes ramnolipídicos. Cavacos de eucalipto pré-tratados por explosão a vapor nas concentrações de 1, 5 e 10% (m.m⁻¹), biossurfactantes ramnolipídicos ou Triton X-100, ambos a 100 mg.L⁻¹, e o complexo enzimático Cellic® CTec1 (Novozymes) a 14,4 e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ foram utilizados nos experimentos de hidrólise enzimática. Em princípio, as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC07 demonstraram eficiência similar em relação à produção dos ramnolipídeos, particularmente em termos de comportamento cinético e rendimento produtivo. Os ramnolipídeos impulsionaram a sacarificação enzimática do eucalipto em todas as condições testadas, proporcionando aumentos significativos na conversão de celulose em relação às hidrólises sem qualquer surfactante. Logo, os ramnolipídeos demonstraram uma influência positiva sobre as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto pré-tratados por vapor. Observou-se que a adição do Triton X-100 também promoveu a sacarificação do eucalipto em relação às hidrólises sem surfactante, entretanto, os ramnolipídeos apresentaram conversões de celulose equivalentes que este surfactante sintético. Assim, os ramnolipídeos podem ser apontados como potencial substituto do surfactante Triton X-100 em hidrólises enzimáticas de biomassas lignocelulósicas, como o eucalipto.

Palavras-chave: Bactéria. *Pseudomonas aeruginosa*. Celulase.

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomasses such as eucalyptus chips has been pointed out as an interesting alternative for production of fermentable sugars. Recent studies have evidenced that the use of surfactants might significantly increment the enzymatic conversion of the holocellulose (cellulose and hemicellulose) present in lignocellulosic biomasses, thus optimizing the efficiency of the enzymes as saccharification agents. Specifically, the rhamnolipids, which are natural biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* have been mentioned in literature as potential additives to enhance the saccharification of lignocellulosic biomasses via enzymatic hydrolysis. Based on the above mentioned, this present research aimed to evaluate the influence of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* as bio-surfactants in the enzymatic saccharification (hydrolysis) of the pretreated eucalyptus chips, as well as to evaluate the potential of the rhamnolipid-based bio-surfactants, comparatively to the synthetic surfactant (Triton X-100) as inducers (promoters) of enzymatic hydrolyses. Strains of *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 and TGC07 were employed for production of the rhamnolipids bio-surfactants. Steam pretreated eucalyptus chips were used as substrates at concentrations of 1, 5 and 10% (w.w⁻¹), rhamnolipids or Triton X-100, both at 100.0 mg.L⁻¹, were tested as bio-surfactants and commercial enzyme cocktails (Cellic® CTec1, Novozymes, Denmark) at 14.4 e 28.8 FPU.g_{cellulose}⁻¹ were used for the enzymatic hydrolyses experiments. In principle, both strains of *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 and TGC07 have demonstrated similar efficiency regarding the production of the rhamnolipids, particularly in terms of kinetic behavior and productive yields. The cellulose conversion profiles of the enzymatic hydrolyses performed with the use of rhamnolipids as biosurfactants were superior to the ones conducted without any surfactant within all conditions tested, evidencing thus the positive influence of these species (rhamnolipids) over the enzymatic hydrolyses of the steam pretreated eucalyptus chips. It was also evidenced that the rhamnolipids were similarly efficient as commercial synthetic Triton X-100 as surfactant with regard the enzymatic hydrolysis of the steam pretreated eucalyptus chips. Hence, the bio-based rhamnolipids can be pointed out as a potential candidate to replace the synthetic Triton X-100 as surfactante additive for the enzymatic hydrolyses of lignocellulosic biomasses such as eucalyptus.

Key words: Bacterium. *Pseudomonas aeruginosa*. Cellulase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cavaco de eucalipto.....	22
Figura 2 -	Modelo da estrutura da parede celular vegetal.	23
Figura 3 -	Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	23
Figura 4 -	Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses	24
Figura 5 -	Esquema da estrutura química da lignina e seus precursores: hidroxifenila (a), guaiacila (b) e siringila (c).....	25
Figura 6 -	Desestruturação da fibra vegetal pelo efeito de um pré-tratamento.	26
Figura 7 -	Atuação das celulases sobre a estrutura da celulose.....	30
Figura 8 -	Estrutura do A) Dodecil sulfato de sódio (surfactante aniônico); B) Cloreto de dodecilamônio (surfactante catiônico) e C) N-dodecil-N,Ndimetilbetaína (surfactante anfótero).....	34
Figura 9 -	Micela esférica.....	35
Figura 10 -	Estrutura molecular do Triton X-100	35
Figura 11 -	Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.....	37
Figura 12 -	Estrutura do mono-ramnolipídeo (a) e di-ramnolipídeo (b).....	40
Figura 13 -	Cavaco de eucalipto antes da lavagem (a), após secagem em estufa (b) e macerado com pistilo e almofariz (c)	49
Figura 14 -	Cinética do crescimento no caldo nutritivo pelas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 e TGC07	60
Figura 15 -	Cinética do crescimento, consumo do glicerol, produção do biossurfactante e comportamento do pH durante o cultivo das linhagens de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> TGC02 (a) e TGC07 (b)	61
Figura 16 -	Velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicerol e de formação do biossurfactante durante o cultivo das linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 (a) e TGC07 (b)	62
Figura 17 -	Meio de produção do biossurfactante do tempo 0 a 120 horas contendo as <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 (a) e TGC07 (b).....	65
Figura 18 -	Índice de emulsificação E24 das amostras livre de células das linhagens TGC02 e TGC07 e suas respectivas concentrações de ramnose. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os índices de emulsificação E24 das linhagens em cada tempo de cultivo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$)	

	entre os índices de emulsificação E24 dos diferentes tempos de cultivo para cada linhagem.....	66
Figura 19 -	Índice de emulsificação E24, E48, E72, E96, e E120 provenientes das amostras livre de células durante o cultivo da linhagem TGC02 (a) e TGC07 (b) e suas respectivas concentrações de ramnose. Diferentes letras ou conjunto de letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os índices de emulsificação em cada tempo de cultivo.....	68
Figura 20 -	Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 27°C , 400 MHz) do ramnolípido produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07.....	70
Figura 21 -	Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 27°C , 400 MHz) do ramnolípido produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07 com deslocamento químico entre 0 e 200 ppm (a) e 60 a 105 ppm (b)	71
Figura 22 -	Espectro parcial da ^1H - ^{13}C HSQC RMN (CDCl_3 , 27°C , 400 MHz) do ramnolípido produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07.....	72
Figura 23 -	Estrutura química de um di-ramnolípido	74
Figura 24 -	Concentração da enzima em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL da enzima diluída.....	75
Figura 25 -	Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolípídeos	77
Figura 26 -	Velocidades iniciais da reação de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10 % (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolípídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais de hidrólise na presença ou ausência do biossurfactante	78
Figura 27 -	Concentrações de glicose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolípídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as	

	concentrações de glicose de hidrólise na presença ou ausência do biossurfactante	78
Figura 28 -	Conversões de celulose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m ⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos	81
Figura 29 -	Conversão de celulose com 72 horas de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m ⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose na presença ou ausência do biossurfactante	82
Figura 30 -	Conversão de celulose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ e carga de sólidos a 1 (a), 5 (b) e 10% (m.m ⁻¹) (c) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga enzimática; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose na presença ou ausência do biossurfactante	84
Figura 31 -	Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10 % (m.m ⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ com o Triton X-100.....	86
Figura 32 -	Velocidades iniciais da reação de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m ⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais de cada grupo	87
Figura 33 -	Concentrações de glicose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m ⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g _{celulose} ⁻¹ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa (p	

	$\leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas de cada grupo.....	87
Figura 34 -	Conversões de celulose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10 % (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ com o TritonX-100.....	89
Figura 35 -	Conversão de celulose com 72 horas de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10 % (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre	
	as conversões de celulose de cada grupo.....	90
Figura 36 -	Conversão de celulose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ e carga de sólidos a 1 (a), 5 (b) e 10% (m.m^{-1}) (c) com os ramnolipídeos e o Triton X-100. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga enzimática; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose de cada grupo... ..	92
Figura 37 -	Concentração de lignina solúvel em função da absorbância em 280nm	113
Figura 38 -	Absorbância, a 540 nm, em função da concentração de glicose em mg.0,5mL^{-1} grupo.....	114
Figura 39 -	Absorbância em 570 nm em função da concentração de biomassa da linhagem TGC02 (a) e TGC07 (b)	115
Figura 40 -	Concentração de ramnose em função da diferença entre as absorbâncias de 400 e 430nm	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes tipos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	27
Tabela 2 -	Estudos de hidrólises enzimáticas de biomassas submetidas a diferentes tratamentos de deslignificação reportando a carga de substrato e enzimática, método de deslignificação, teor de lignina e conversão de celulose	32
Tabela 3 -	Data e coordenadas geográficas da coleta das linhagens	45
Tabela 4 -	Composição do meio de cultivo	46
Tabela 5 -	Proporções de clorofórmio e metanol durante a cromatografia em coluna	48
Tabela 6 -	Fatores de conversão dos precursores da celulose e hemicelulose.....	51
Tabela 7 -	Condições dos experimentos da hidrólise enzimática variando a carga enzimática e concentração do cavaco de eucalipto	55
Tabela 8 -	Parâmetros cinéticos da produção de ramnolipídeos para as linhagens TGC02 e TGC07.	64
Tabela 9 -	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos ramnolipídeos produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07.....	73
Tabela 10 -	Composição química do cavaco do <i>Eucalyptus grandis</i>	74
Tabela 11 -	Conversões de celulose das hidrólises enzimáticas do <i>Eucalyptus grandis</i>	93
Tabela 12 -	Massas das frações 1 a 41 recolhidas durante a cromatografia em coluna dos ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07 e seus respectivos fatores de retenção na cromatografia em camada delgada analítica.....	111
Tabela 13 -	Massas das frações 42 a 81 recolhidas durante a cromatografia em coluna dos ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07 e seus respectivos fatores de retenção na cromatografia em camada delgada analítica.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ABT	America Biomass Technologies
ANOVA	Análise de Variância
ART	Açúcares Redutores Totais
BG	β -glicosidases
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNSA	Ácido Dinitrosalicílico
E	Índice de Emulsificação
EC	Enzyme Comission
EnG	Endoglucanases
Enz	Concentração de Atividade Enzimática
ExG	Exoglucanases
FPU	Filter Paper Units
GP	Grau de Polimerização
HMF	hidroximetilfurfural
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
NREL	National Renewable Energy Laboratory
ppm	Partes Por Milhão
Rha	Ramnose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto
STEX	Steam Explosion
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade de Atividade
UV	Radiação Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo geral.....	19
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	EUCALIPTO	21
2.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	22
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	26
2.3.1	Pré-tratamento por explosão a vapor	28
2.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	28
2.5	SURFACTANTES	33
2.6	BIOSSURFACTANTES	36
2.6.1	Ramnolipídeos.....	39
2.7	APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	42
3	MÉTODOS.....	45
3.1	MICROORGANISMOS: PRESERVAÇÃO, VIABILIDADE E REATIVAÇÃO	45
3.2	PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	46
3.3	EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO BIOSURFACTANTE	47
3.4	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS RAMNOLIPÍDEOS	47
3.4.1	Purificação do extrato de biosurfactante	47
3.4.2	Ressonância magnética nuclear.....	48
3.5	TRATAMENTO DO CAVACO DE EUCALIPTO	48
3.6	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CAVACO DE EUCALIPTO	50
3.6.1	Hidrólise do cavaco de eucalipto com ácido sulfúrico.....	50
3.6.2	Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e furfural na fração líquida	50
3.6.3	Determinação de lignina solúvel na fração líquida	51
3.6.4	Determinação de lignina insolúvel em meio ácido na fração sólida.....	51
3.6.5	Determinação de cinzas.....	52
3.7	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	52

3.7.1	Cálculo para a atividade em FPU.mL⁻¹	53
3.8	CONDIÇÕES DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS	54
3.9	MÉTODOS ANALÍTICOS	55
3.9.1	Turbidimetria	55
3.9.2	Gravimetria	56
3.9.3	Determinação do pH	56
3.9.4	Quantificação de glicose e glicerol	56
3.9.5	Quantificação do biossurfactante	56
3.9.6	Índice de emulsificação	57
3.9.7	Cromatografia em camada delgada analítica	57
3.10	PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	57
3.11	PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ...	59
3.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO	60
4.2	ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DOS RAMNOLIPÍDEOS	60
4.3	PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS RAMNOLIPÍDEOS	66
4.3.1	Atividade emulsificante	66
4.3.2	Estabilidade das emulsões	67
4.4	ESTRUTURA QUÍMICA DOS RAMNOLIPÍDEOS	69
4.4.1	Isolamento dos ramnolipídeos	69
4.4.2	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)	70
4.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAVACO DE EUCALIPTO	74
4.6	ATIVIDADE DA CELLIC® CTEC1	75
4.7	HIDRÓLISES DO EUCALIPTO COM E SEM OS RAMNOLIPÍDEOS	76
4.8	HIDRÓLISES DO EUCALIPTO COM OS RAMNOLIPÍDEOS E O TRITON X-100	86
4.9	COMPARATIVOS COM HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS COM EUCALIPTO DESLIGNIFICADO	94
5	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A - DADOS OBTIDOS DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA E DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	

ANALÍTICA COM OS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC07	111
APÊNDICE B - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE	
LIGNINA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM 280 n..	113
APÊNDICE C - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR	
TOTAL	114
APÊNDICE D - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM	
FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DAS LINHAGENS	
DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 e TGC07	115
APÊNDICE E - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA L-RHAMNOSE.....	116

1 INTRODUÇÃO

A Lei Nº. 12.305, Política Nacional de Resíduos Sólidos, sancionada em 2010, prevê que os resíduos deixem de ser definidos como matéria sem valor, ou seja, geradores de problemas, e passem a ter um novo papel na sociedade, na forma de subprodutos. Portanto, devem-se esgotar todas as possibilidades de aproveitamento dos resíduos antes do rejeito final (BRASIL, 2010).

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agroindustriais cujo seu reaproveitamento é de grande interesse econômico e ambiental (ARAÚJO, 2016; ESCOBAR, 2016; SCARLAT et al. 2015). O aproveitamento e reciclagem de tais resíduos podem reduzir os problemas ambientais resultantes de sua disposição inadequada na natureza, agregar valor aos subprodutos da agroindústria e valorizar os recursos naturais ou culturas de determinada região (ARAÚJO, 2016; FARIAS, 2014). Uma das estratégias de aproveitamento desta biomassa inclui seu uso em processos biotecnológicos, onde por via enzimática ou microbiológica, podem ser transformados em compostos químicos de alto valor agregado, como açúcares fermentescíveis, etanol, ácidos orgânicos, pectina, etc (SANTOS et al., 2017; LOU et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014).

Os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes complexos orgânicos na forma de biomassa vegetal, e são constituídos, principalmente, por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (MCINTOSH et al., 2016; BADHAN et al., 2007). A celulose, o principal constituinte destes materiais, é um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas, as quais podem ser hidrolisadas por via enzimática (LIN et al, 2017; BORTOLAZZO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010). As enzimas responsáveis pela hidrólise das fibras celulósicas são as celulasas (BANDIKARI et al., 2014). Entretanto, a principal adversidade da hidrólise enzimática da celulose é a desativação das celulasas durante a sacarificação, sendo necessária a utilização de elevadas cargas enzimáticas, encarecendo o processo. Isso se deve, principalmente, ao mecanismo de adsorção improdutivo de parte das celulasas sobre a lignina (LOU et al., 2014; LI et al., 2012).

Estudos têm indicado que os surfactantes podem interagir com a lignina, minimizando as adsorções das celulasas sobre sua superfície, promovendo a atuação dessas enzimas e aumentando a sacarificação enzimática da celulose (LIN et al, 2017; ZHOU et al, 2015; OUYANG et al., 2010; ZHANG et al, 2009; KRISTENSEN et al., 2007). Entretanto, os agentes surfactantes geralmente utilizados como indutores da hidrólise, como o Tween-80 e Triton X-100, são derivados do petróleo e, consequentemente, não são biodegradáveis e

apresentam toxicidade para o ambiente (TU e SADDLER, 2010). Os surfactantes naturais ou biossurfactantes, por outro lado, têm atraído atenção devido à sua especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (SOUSA et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

Os ramnolipídeos, biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, foram relatados como potenciais aditivos à hidrólise enzimática por interagir com a superfície da lignina, impedindo, assim, a adsorção improdutiva das celulasas (BEZERRA, 2017; HOU et al., 2017; ZHOU et al., 2015). Devido a esta interação, a adição de ramnolipídeos nas sacarificações enzimáticas tem se apresentado como uma alternativa aos tratamentos de deslignificação da biomassa, contribuindo para a diminuição dos impactos ambientais, devido à produção de efluentes tóxicos durante a etapa de recuperação da biomassa após a deslignificação, e economia de tempo, pela retirada deste tratamento no processo (ARAÚJO et al., 2017; HOU et al., 2017).

Por outro lado, as biomassas lignocelulósicas comumente utilizadas em bioprocessos são oriundas da cana-de-açúcar, milho e trigo (BETANCUR et al., 2011). No entanto, pesquisas atuais indicam a necessidade de desenvolvimento de rotas biotecnológicas que permitam o uso de outros materiais lignocelulósicos existentes, como os cavacos da madeira de eucalipto, os quais são provenientes do processamento do eucalipto nas indústrias florestais, de papel e celulose, carvão vegetal e produtos sólidos de madeira (MCINTOSH et al., 2016; SILVA-JUIOR et al., 2015). O cavaco de eucalipto é utilizado principalmente como combustível sólido para fornecimento de energia térmica, porém, por ser um material lignocelulósico, o mesmo apresenta potencial para seu aproveitamento como fonte de lignocelulose (LIN et al., 2017; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2012).

Dentro dessa perspectiva, avaliar a hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto com adição de ramnolipídeos é uma forma de confirmar a atuação positiva destes biossurfactantes na sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos e uma alternativa para o aproveitamento deste resíduo em processos biotecnológicos, proporcionando benefícios econômicos e ambientais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o potencial uso de biossurfactantes ramnolipídicos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar os perfis de crescimento, consumo do substrato e produção de ramnolipídeos de duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Purificar o biossurfactante ramnolipídico por cromatografia em coluna e elucidar sua estrutura química por espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a influência dos ramnolipídeos na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto em diferentes concentrações de substrato e carga enzimática;
- Verificar o potencial dos ramnolipídeos como indutores nas hidrólises enzimáticas em comparação com o surfactante sintético Triton X-100.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EUCALIPTO

O eucalipto é originário da Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania, e corresponde ao gênero *Eucalyptus*, pertencente à família das *Myrtaceae*, onde são mais de 700 espécies reconhecidas botanicamente. A madeira do gênero *Eucalyptus* tem despertado um contínuo interesse de diversos produtores por sua grande versatilidade nos diferentes segmentos do setor florestal, por apresentar espécies de rápido crescimento, alcançando alturas de 25 a 54 metros de altura, dependendo da espécie, e também por constituir-se em uma matriz energética renovável, garantindo um equilíbrio social, econômico e ambiental (NONAKA et al., 2013; KLOCK et al., 2005).

Em relação a sua composição química elementar, a madeira do eucalipto é composta por 45-50% de carbono, 40-44% de oxigênio, 4-6% de hidrogênio e 0,4-1,0% de nitrogênio. Em relação aos elementos macromoleculares, a madeira deste vegetal contém 42-45% de celulose, 27- 30% de hemicelulose, 20-28% de lignina e 3-5% de extrativos e não extrativos (RENCORET et al., 2007; KLOCK et al, 2005).

Devido as suas propriedades físicas e químicas, a madeira do eucalipto é utilizada em cadeias produtivas de diferentes segmentos industriais, como as de celulose e papel, painéis reconstituídos, móveis, siderurgia, carvão vegetal, energia e produtos sólidos de madeira (SILVA-JUNIOR et al, 2015).

Segundo a Indústria Brasileira de Árvores, o eucalipto tem grande importância comercial na economia brasileira, pois são 5,5 milhões de hectares plantados deste gênero, com uma produtividade média de $39 \text{ m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ (IBÁ, 2018). O Brasil lidera o ranking global de produtividade florestal, com mais de 9,8 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo 75,5% de eucalipto, 20,4% de pinus e 4,2% de outras espécies florestais, com uma média de $35,7 \text{ m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ nos plantios de eucalipto e $30,5 \text{ m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ nos plantios de pinus (IBGE, 2017).

Nos processos de industrialização do eucalipto, há a geração de resíduos, os quais são constituídos por pequenos pedaços da madeira, denominados de cavaco. O cavaco da madeira de eucalipto é utilizado principalmente como combustível sólido para fornecimento de energia térmica, mas também pode ser usado como matéria orgânica em jardinagem, paisagismo, compostagem, ecologia da restauração, biorreatores para desnitrificação e cultivo de cogumelos (MESQUITA, 2015; BRAGATTO, 2010) (Figura 1).



Figura 1 - Cavaco de eucalipto.

Fonte: MFRURAL (2019).

O cavaco da madeira de eucalipto gerado anualmente no Brasil corresponde a 30 milhões de toneladas, o que equivale a 11,5 milhões de tep (tonelada equivalente de petróleo) (ESCOBAR, 2016). As principais fontes desses resíduos são as indústrias de base florestal (papel e celulose, serrarias, fábricas de folheados emoldurados, painéis, etc.) junto a resíduos de reflorestamento (gerados no campo após a colheita) e a exploração de florestas nativas na região amazônica (resíduos gerados no manejo florestal) (SARTO e SANSIGOLO, 2010). Entretanto, por ser uma biomassa vegetal sustentável e de baixo custo, o cavaco de eucalipto apresenta grande potencial para reaproveitamento como fonte de lignocelulose, se tornando um recurso promissor para a geração de açúcares fermentescíveis (NONAKA et al., 2013).

2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica compreende qualquer matéria orgânica proveniente de fontes vegetais, como os resíduos agroindustriais. O material lignocelulósico é um termo genérico para descrever os constituintes principais da biomassa vegetal, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento, da parte da planta escolhida e da idade de colheita (OGEDA e PETRI, 2010). A lignocelulose, o principal componente deste material, representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável, onde suas propriedades químicas resultam em um substrato de alto valor biotecnológico (BORTOLAZZO, 2011). Na Figura 2 é apresentado um modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

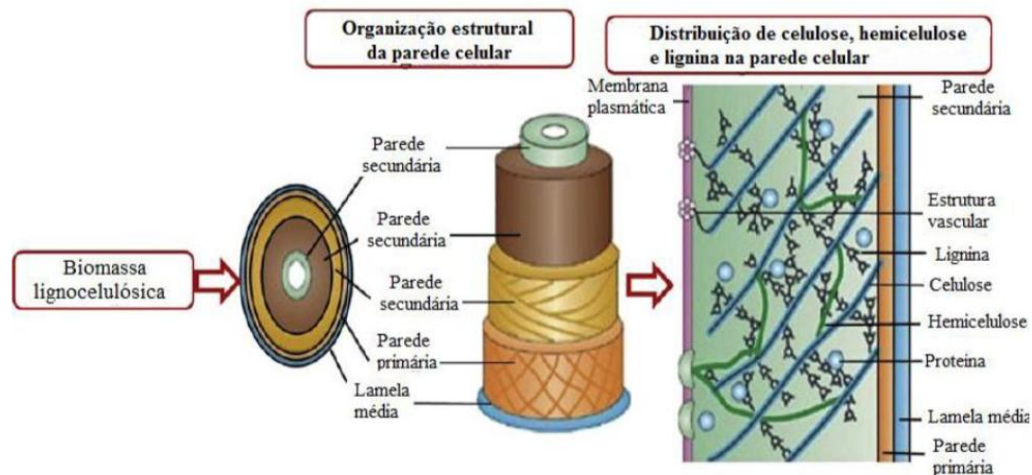


Figura 2 - Modelo da estrutura da parede celular vegetal.

Fonte: Menon e Rao (2012), adaptado por Campos (2017).

Os componentes lignocelulósicos são arranjados de modo que as cadeias lineares de celulose se mantenham compactadas através de ligações de hidrogênio, promovendo a rigidez da planta, a lignina atuando como barreira física contra o ataque microbiano e estresse oxidativo, e a hemicelulose proporcionando a ligação entre a celulose e a lignina formando uma complexa rede fibrosa (OGEDA e PETRI, 2010).

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos. Quimicamente, a celulose é um polímero de D-glicopirranose (glicose) que forma cadeias com ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ (LAVOINE et al., 2012). Este polímero natural mantém uma estrutura plana e linear cuja unidade repetitiva é a celobiose (Figura 3) (MARTÍNEZ, 2014). As cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals, resultando em estruturas cristalinas chamadas de fibrilas elementares. O conjunto dessas fibrilas forma uma microfibrila. A fibra de celulose é constituída por microfibrilas as quais estão ligadas à hemicelulose e a lignina (CAMPOS, 2017; RABELO, 2010; BIDLACK et al., 1992).

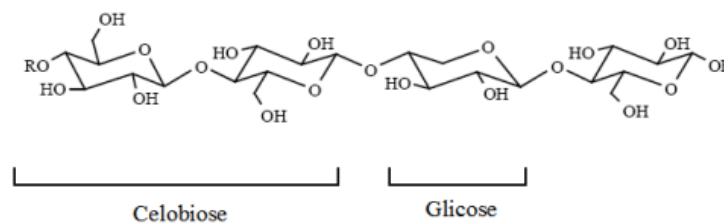


Figura 3 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.

Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

A celulose apresenta uma estrutura constituída de domínios altamente cristalinos, com cadeias de glicose ordenadas paralelamente, conferindo às fibras lignocelulósicas maior resistência à tração, ao alongamento e a ataques enzimáticos, porém, contém regiões com menor grau de ordenação, chamadas regiões amorfas, que são cadeias de celulose não organizadas e áreas com irregularidades, falhas ou microporos, que aumentam a flexibilidade das fibras e a superfície de contato da celulose com outras moléculas (FARIAS, 2014; MENON e RAO, 2012).

A hemicelulose é considerada o segundo biopolímero mais abundante no ambiente, estando presente em todas as camadas da parede celular vegetal, apresentando função de reserva e sustentação (FARIAS, 2014; KOOTSTRA et al., 2009). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo, com uma massa molecular menor do que a celulose, formada a partir de diferentes resíduos de carboidratos (D-xilose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, ácido 4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico), onde os açúcares são unidos por ligações β -1,4 e, por vezes, β -1,3-glicosídicas (PITARELO, 2007).

As hemiceluloses podem se apresentar na forma de homopolímeros como a xilana formada por xiloses, ou heteropolímeros como a glico-manana, formada por glicose e manose (KANG et al., 2004). As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxihexoses (Figura 4).

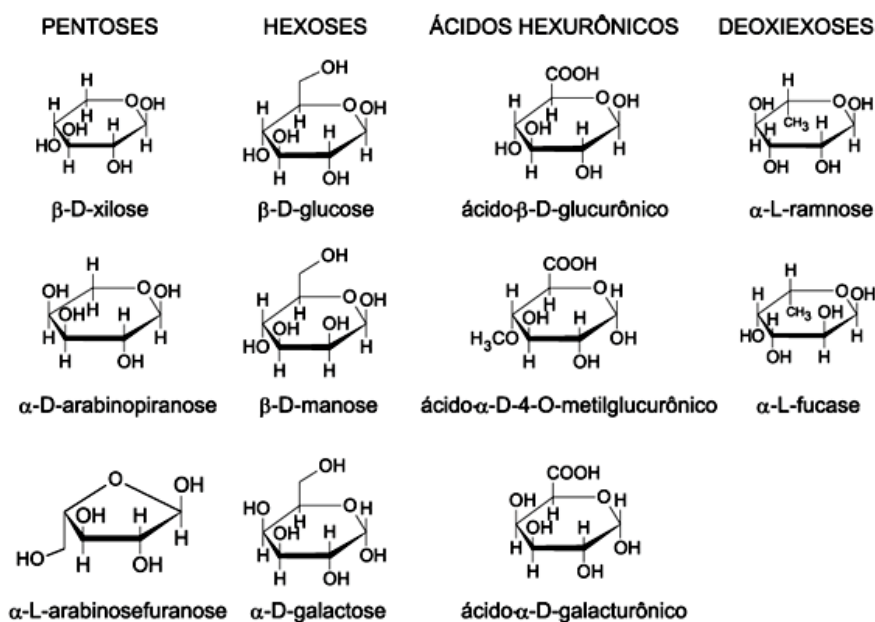


Figura 4 - Estrutura dos monossacarídeos precursores da hemicelulose.

Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

A hemicelulose apresenta baixa massa molecular, bastante hidrofílica e contendo considerável grau de ramificação entre suas cadeias, apresentando uma estrutura altamente amorfa com pouca resistência à hidrólise química e enzimática. (GÍRIO et al., 2010). A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (RIVEIRA et al., 2010).

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas e a maior fonte de polímeros aromáticos de natureza fenólica (CRUZ-JUNIOR, 2016; BRISTOW e KOLSETH, 1986). A lignina é uma macromolécula aromática amorfa tridimensional de estrutura rígida (mais resistente que a celulose) e formada a partir da polimerização de unidades de fenilpropanóides (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) incorporados durante o crescimento do vegetal (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina é classificada conforme a quantidade de seus monômeros guaiacila, siringila e p-hidroxifenila, os quais são derivados dos álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (Figura 5) (CRUZ-JUNIOR, 2016).

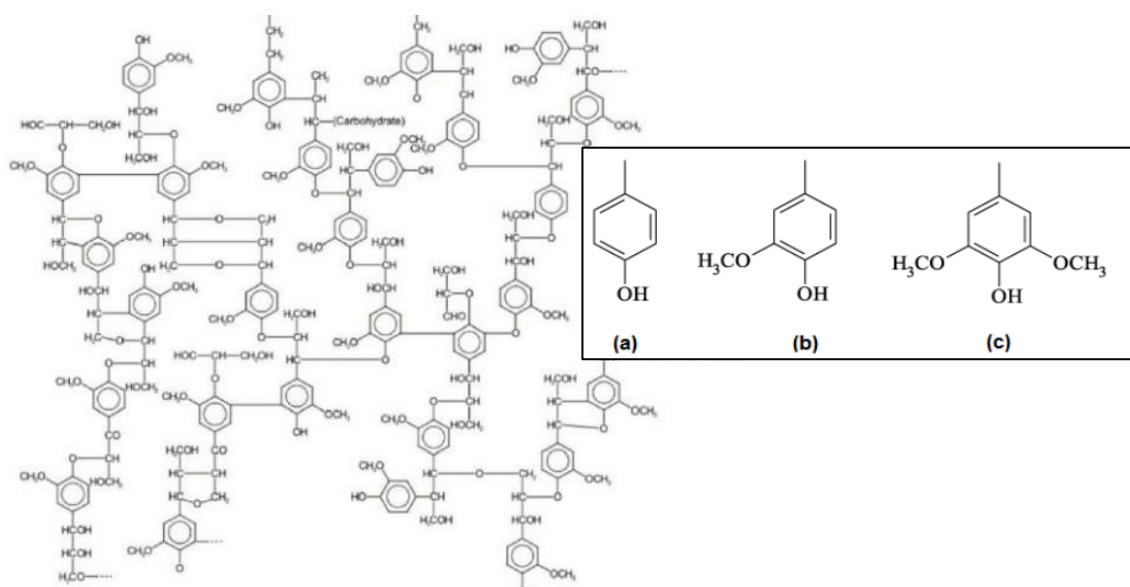


Figura 5 - Esquema da estrutura química da lignina e seus precursores: hidroxifenila (a), guaiacila (b) e siringila (c).

Fonte: Cruz-Junior (2016).

A lignina está ligada tanto à celulose quanto à hemicelulose, formando uma barreira física na parede celular dos vegetais, proporcionando um suporte estrutural, impermeável e resistente a ataque microbiano e estresse oxidativo (SANCHEZ, 2009). Na madeira, age como

um agente permanente de ligação entre as células vegetais, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Além disso, está envolvida também com o transporte interno de água, nutrientes e metabólitos das células vegetais (RABELO, 2010).

Além da holocelulose e lignina, os materiais lignocelulósicos contêm outros componentes em menor grau, os quais são classificados como extraíveis e não extraíveis. Os compostos solúveis em solventes neutros, denominados frações extraíveis, incluem uma diversidade de compostos como as resinas (incluindo os compostos não voláteis) fenóis, como os taninos, álcoois, terpenos, ácidos alifáticos, proteínas, aldeídos, alcaloides, etc (KLINKE et al., 2004). Nas frações não extraíveis encontram-se as cinzas e resíduos inorgânicos, como carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos (FARIAS, 2014).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Devido à estrutura rígida e cristalina da lignocelulose, o aproveitamento da biomassa lignocelulósica requer uma etapa de pré-tratamento, a qual visa desestruturar a interação entre os principais componentes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina), reduzir ou remover estes componentes, diminuir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade do material melhorando o acesso dos agentes de hidrólise e viabilizar a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (Figura 6) (MOSIER et al., 2003; LYND et al., 1996). Além disso, o pré-tratamento deve evitar a degradação ou perda dos carboidratos e a formação de compostos inibitórios resultantes da degradação da celulose, hemicelulose e lignina (LEE et al., 1994).

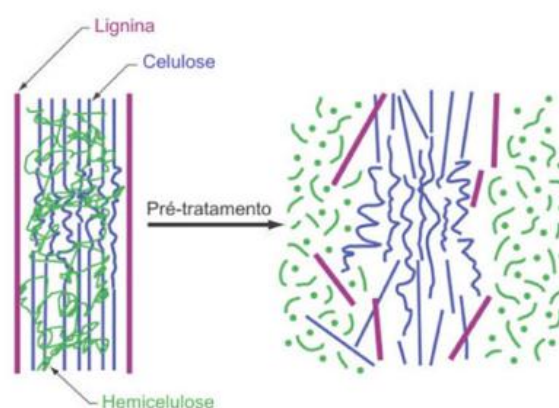


Figura 6 - Desestruturação da fibra vegetal pelo efeito de um pré-tratamento.

Fonte: Oliveira (2010).

As condições de pré-tratamento podem ter dois efeitos opostos. Se o pré-tratamento for drástico, ocorre a degradação da fração celulósica, além da formação de inibidores da fermentação; se for brando, a acessibilidade da enzima continuará sendo baixa (SCHULEIN, 1997).

O pré-tratamento pode ser realizado por procedimentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (Tabela 1) (AGBOR et al., 2011; GIRIO et al. 2010). Segundo Martínez (2014), nenhum pré-tratamento é totalmente melhor que outro, pois cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, porém sua escolha depende da natureza do material lignocelulósico e da aplicação do material hidrolisado. Outros fatores também são usados como comparação entre diferentes pré-tratamentos, como por exemplo: rendimento mássico, consumo de energia, formação de inibidores tóxicos, preços de reagentes, produção de poluentes, dificuldade de tratar esses resíduos e oxidação parcial da celulose (CASSOL, 2017; CRUZ-JUNIOR, 2016; GIRIO et al. 2010).

Tabela 1 - Diferentes tipos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

Tratamento Físico	Mecânico - Reduz a granulometria das partículas e a cristalinidade dos materiais para que ocorra um aumento da área superficial.
	Radiação de Alta Energia - Tratamento onde a os materiais são submetidos à radiação de alta frequência como os Raios Gamma (γ) e Micro-ondas.
Tratamento Físico-químico	Hidrotérmico - Promove a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina devido à alta temperatura aplicada (160-260°C). Os fatores que afetam esse pré-tratamento são o tempo de residência, temperatura e tamanho da partícula.
	Explosão por vapor - Consiste no aquecimento da biomassa a altas temperaturas e pressão como no tratamento hidrotérmico, porém seguido de um processo de descompressão súbita (explosão) em um tanque de coleta.
	Explosão por amônia - Este processo é semelhante ao tratamento de explosão por vapor, porém os materiais lignocelulósicos são colocados em contato com a amônia líquida a alta temperatura e pressão.
Tratamento Químico	Hidrólise ácida - O pré-tratamento com ácido diluído é empregado principalmente para remoção da hemicelulose presente na biomassa. Entretanto, este pré-tratamento é feito usando ácidos fortes, geralmente H_2SO_4 ou HCl , sendo necessária uma etapa de recuperação e neutralização do pH da biomassa.
	Hidrólise alcalina - O uso de soluções alcalinas, como $NaOH$, auxilia na solubilização e extração da lignina presente na biomassa, aumentando a superfície interna e diminuindo o grau de polimerização dos polissacarídeos. Este pré-tratamento requer neutralização do pH.
	Processo Organosolv - Consiste na mistura de solventes orgânicos com água ou com um ácido inorgânico, favorecendo o processo de deslignificação do material. A recuperação do solvente é realizada com base no processo de destilação.
Tratamento Biológico	Microrganismos são utilizados para promover a degradação da lignina e hemicelulose presente nos materiais lignocelulósicos.

Fonte: Cassol (2017) e Araújo (2016).

2.3.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

Considerado um dos métodos mais promissores de tratamento de materiais lignocelulósicos, o pré-tratamento hidrotérmico por explosão a vapor ou STEX (“Steam Explosion”) consiste na descompressão súbita de um sistema pressurizado com vapor de água à elevada pressão e temperatura. Essa descompressão é feita abrindo-se rapidamente a válvula de descarga do reator de forma que todo o material é encaminhado para um tanque de coleta à pressão atmosférica (OLIVEIRA, 2010). Neste tratamento, o vapor penetra no material lignocelulósico e condensa, formando água líquida dentro das fibras. Após a descompressão, a água que está em equilíbrio com o vapor a alta pressão, é rapidamente evaporada gerando literalmente uma explosão no interior das fibras (GÍRIO et al., 2010).

No pré-tratamento por explosão a vapor, além da ruptura das fibras, a alta temperatura produz a autoionização da água, gerando íons hidrônio que atuam como catalisadores na quebra das ligações éter heterocíclico da hemicelulose e provocando tanto a geração de oligossacarídeos quanto a separação de grupos acetila. Logo, a degradação destes grupos acetila liberam moléculas de ácido acético, as quais atuam como catalisadores na despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico) (MOSIER et al., 2005; AGUILAR et al., 2002). O ácido liberado catalisa a ruptura das ligações da lignocelulose, provocando a solubilização de grande parte da hemicelulose e de uma pequena fração de lignina (BOUCHARD et al., 1990). A fração insolúvel em água, resultante deste tratamento, permanece composta de celulose e lignina parcialmente modificada (MOSIER et al., 2003).

A estrutura da parede celular da biomassa é radicalmente modificada durante o processo tornando as hemiceluloses parcialmente hidrolisadas e facilmente removíveis por extração aquosa (EMMEL, 1999). Além disso, neste tratamento hidrotérmico a fibrilação é promovida. Tanto a remoção de hemicelulose como a fibrilação aumentam significativamente a área superficial do material para a sacarificação enzimática, sem causar degradação significativa da celulose e lignina (DORIA et al, 2014). Apesar da STEX não utilizar ácidos, durante este tratamento ocorre formação de do ácido acético, os quais podem gerar inibidores da fermentação, dentre eles furfural e HMF (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica destina-se a liberar açúcares fermentescíveis através da adição de ácido sulfúrico aos resíduos (no caso da hidrólise ácida)

ou pela ação de enzimas. O processo de sacarificação enzimática consiste no uso de enzimas hidrolíticas que atuam em sacarídeos (celulose e hemicelulose) obtendo assim os seus monômeros constituintes (SILVA, 2012; OGEDA e PETRI, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada mediante a presença de enzimas altamente específicas, chamadas celulasas, que operam em condições brandas de pH (4 a 5) e temperatura (40 a 60°C) (CASCIATORI, 2015). Estas enzimas celulolíticas atuam em sinergia na degradação da celulose em glicose, a qual desperta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol (ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas do complexo celulolítico são identificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, dividindo-se em três classes: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (OLSSON e HAHN-HAGERDAL, 1996).

As endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, onde atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4), liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP), onde sua atividade catalítica pode ser medida através da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose. A EnG é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução de GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (OGEDA e PETRI, 2010).

As exo-1,4- β -D-glucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), agem nas extremidades das fibras de celulose e nos oligossacarídeos produzidos pela EnG, liberando unidades de glicose (livres) ou celobiose, que pode ser detectada pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A ExG ainda pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (ExG I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (ExG II) hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO e PERREIRA JR., 2010).

As 1,4- β -D-glucosidases ou β -glicosidases (EC 3.2.1.21), hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis ($GP < 7$) à glicose, onde a atividade catalítica pode ser medida através da análise dos produtos por CLAE ou espectrofotometria. A BG também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise, neste caso, a glicose (OGEDA e PETRI, 2010).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos seus rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia (CASTRO E PERREIRA JR., 2010). A Figura 7 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases na hidrólise da fibra celulósica.

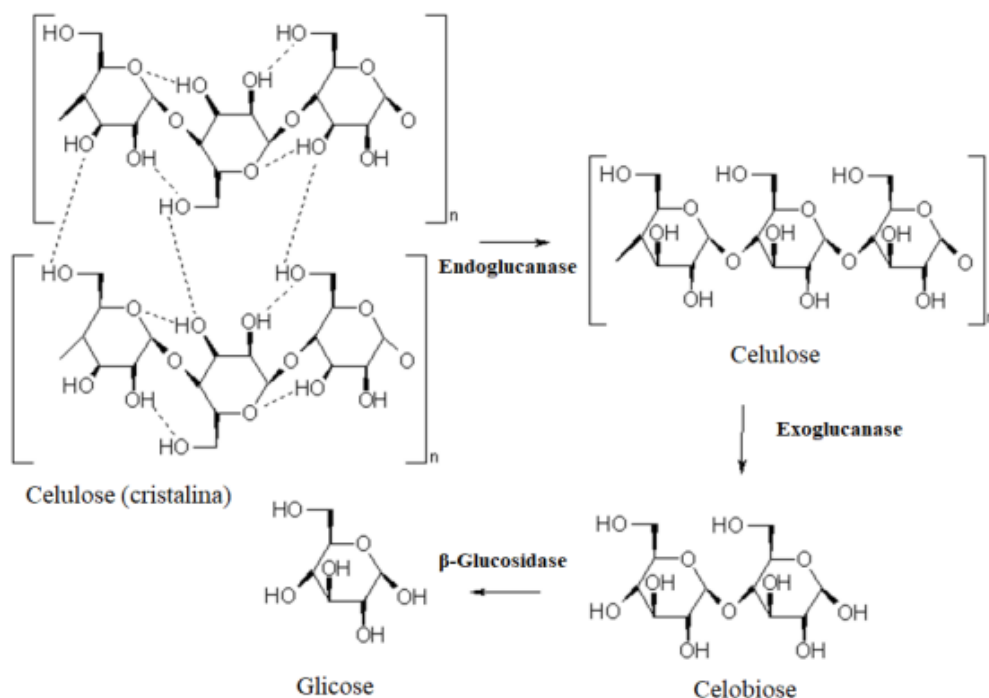


Figura 7 - Atuação das celulasas sobre a estrutura da celulose.

Fonte: Campos, 2017.

O rendimento da hidrólise depende de muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação. Logo, é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório da sacarificação enzimática (ARAÚJO, 2016; CARA et al., 2008).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo bastante estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores de processos fermentativos) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (CANILHA et al., 2010). Além disto, a

especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise química (YU e ZHANG, 2003).

No entanto, há alguns fatores que limitam o processo de degradação da celulose em açúcares fermentescíveis, resultando na diminuição da taxa de hidrólise durante o processo, como: a alta cristalinidade da celulose, impedindo o ataque enzimático; a adsorção irreversível das celulasas na superfície da lignocelulose; e a presença da lignina, a qual cria uma barreira física que dificulta a acessibilidade das enzimas ao substrato celulósico (MENEGOL et al., 2014; YU et al., 2012). Devido a tais fatores, o tempo necessário para alcançar a conversão máxima aumenta, juntamente com a necessidade de adicionar elevadas quantidades de enzimas para acelerar o processo, encarecendo o custo da sacarificação (ZHANG et al., 2015).

Substratos celulósicos lignificados apresentam maior resistência à hidrólise enzimática, pois a lignina atua como barreira à interação enzima-substrato e, dependendo de sua hidrofobicidade, promove a perda de atividade por adsorção inespecífica (SILVA, 2012).

A ligação das enzimas hidrolíticas à celulose envolve o pareamento de resíduos de aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina, e os anéis de anidroglicose, além de ligações de hidrogênio entre resíduos de glutamina e hidroxilas do polissacarídeo (LINDER et al., 1995). Porém, as celulasas têm aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície, que podem interagir com a superfície hidrofóbica da lignina por pareamento de anéis e outras interações hidrofóbicas, acarretando em adsorções improdutivas (OGEDA e PETRI, 2010). Este tipo de adsorção não específica pode causar a inativação das enzimas durante a hidrólise, diminuindo a quantidade de enzimas disponíveis para ligar à celulose e reduzindo a eficiência do processo catalítico (FRAZER e MCCASKEY, 1989).

Os grupos funcionais da lignina exercem importante influência na adsorção improdutiva. (PALONEN et al., 2004; LINDER et al., 1995). Logo, para aumentar o rendimento das hidrólises de biomassas lignocelulósicas, geralmente, a lignina precisa ser removida ou modificada (CRUZ-JUNIOR, 2016; OLIVEIRA, 2010). Durante a deslignificação, o composto alcalino ataca as ligações entre a lignina e hemicelulose do complexo lignina-carboidrato, levando à ruptura das ligações éter e éster desta estrutura, promovendo a redução do grau de polimerização e cristalinidade, o intumescimento das fibras e a ruptura da estrutura da lignina (LINO, 2013). Desse modo, estas reações ajudam a solubilizar e extrair lignina da biomassa (YU et al., 2012). Entre os reagentes mais utilizados para extração da lignina estão o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), amônia (NH₃) e peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂) (OGEDA e PETRI, 2010).

Na Tabela 2 estão reportados estudos de hidrólises enzimáticas de biomassas lignocelulósicas submetidas a diferentes tratamentos de deslignificação com seu respectivo teor de lignina e conversão de celulose.

Tabela 2 - Estudos de hidrólises enzimáticas de biomassas submetidas a diferentes tratamentos de deslignificação reportando a carga de substrato e enzimática, método de deslignificação, teor de lignina e conversão de celulose.

Biomassa	Pré-tratamento hidrotérmico	Método de deslignificação	Teor de lignina (%)	Carga de biomassa	Carga da enzima (FPU.g ⁻¹)	Conversão de celulose (%)	Referência
<i>Eucalyptus grandis</i>	160°C por 150 min sem explosão	Sem deslignificação	28,4	16 % (m.v ⁻¹)	25,0	22	Cebreiros et al. (2018)
		NaOH a 4%	16,5	16 % (m.v ⁻¹)	25,0	29	
<i>Eucalyptus globulus</i>	160°C por 90 min sem explosão	Sem deslignificação	21,8	20% (m.v ⁻¹)	50	30	Mou e Wu (2016)
		Organosolv com etanol:água (60:40)	17,3	20% (m.v ⁻¹)	50	48	
<i>Eucalyptus globulus</i>	198°C sem explosão	Organosolv com etanol:água (60:40)	18,8	25 % (m.m ⁻¹)	10,3 FPU.g ⁻¹ de celulase e 51,5 IU.g ⁻¹ de β-glicosidase	42	Romaní et al. (2014)
<i>Eucalyptus urophilla</i>	180°C por 30 min sem explosão	NaOH a 2 %	15,06	2 % (m.v ⁻¹)	17 FPU.g ⁻¹ de celulase e 34 IU.g ⁻¹ de β-glicosidase	66	Sun et al. (2014)
<i>Eucalyptus urograndis</i>	Sem pré-tratamento	NaOH a 4%	NI	5 % (m.v ⁻¹)	25,0	65	Lima et al. (2013)
<i>Eucalyptus grandis</i>	Sem pré-tratamento	NaOH a 7%	NI	5 % (m.m ⁻¹)	30	66	Park et al. (2012)

NI: Não informado.

Dentre as vantagens dos tratamentos de deslignificação estão às condições desejáveis para uma aplicação industrial, que inclui baixa temperatura e pressão de reação, produtos químicos menos corrosivos em comparação ao tratamento ácido, à possibilidade de reuso da solução alcalina residual e a utilização de reatores mais simples (ZHANG et al., 2015). Entre as desvantagens pode-se citar o uso de grande quantidade de reagente neste processo, o que torna necessária uma etapa de recuperação e neutralização do pH da biomassa, gerando

grande quantidade de efluentes nocivos ao ambiente, acarretando em impactos ambientais (SEWALT, et al., 1997).

Um recurso para melhorar a sacarificação enzimática que vem sendo reportado, é a adição de surfactantes ao meio reacional. Essas substâncias químicas quando adicionadas a hidrólise interagem com a estrutura da lignina, minimizando a adsorção irreversível das celulasas sobre sua superfície, favorecendo a hidrólise (LIN et al., 2017; ZHAO et al., 2013).

Em estudos realizados por Lin et al. (2017) foi observado que surfactantes não iônicos são mais eficientes em ensaios de hidrólise enzimática. Araújo et al. (2017) e Hong-Yuan et al. (2011), realizando hidrólise enzimática da casca do coco verde e da palha de trigo, respectivamente, observaram que a adição de surfactante não iônico favoreceu a sacarificação enzimática da biomassa.

2.5 SURFACTANTES

Os surfactantes, também chamados de tensoativos ou agentes de interface, são moléculas anfipáticas, compostas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, e que devido a essa estrutura possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre fluidos de diferentes polaridades (NITSCHKE e PASTORE 2002). Estes compostos constituem uma importante classe de produtos químicos largamente utilizados no setor industrial, com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, petroquímica e alimentícia uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos com baixa solubilidade em água, e devida à capacidade desses em reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases (MÜLLER et al., 2012). Os tensoativos são utilizados também a fim de diminuir aumentar a solubilidade, o poder de detergência e a capacidade de molhamento de produtos químicos (DAMIÃO, 2012).

Os surfactantes são moléculas que possuem porções hidrofóbica ou apolar e hidrofílica ou polar. A porção hidrofóbica é geralmente composta por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos policíclicos ou aromáticos, enquanto que a porção hidrofílica pode ser constituída por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos ou álcoois (SILVA et al., 2014). Ésteres sulfatados ou sulfatos de ácido graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário são alguns exemplos utilizados comercialmente de surfactantes iônicos (Figura 8) (SILVA, 2009; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

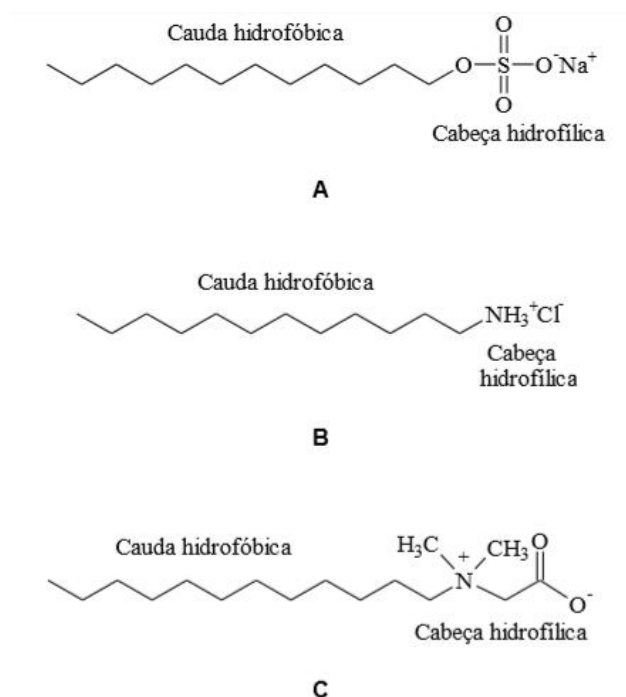


Figura 8 - Estrutura do A) Dodecil sulfato de sódio (surfactante aniônico); B) Cloreto de dodecilamônio (surfactante catiônico) e C) N-dodecil-N,Ndimetilbetaína (surfactante anfótero).

Fonte: Santos (2012).

De acordo com a presença ou ausência de cargas, o surfactante pode ser classificado em anfótero, iônico (aniônico ou catiônico) ou não iônico. Os anfóteros são aqueles que possuem dois ou mais grupos funcionais e, dependendo das condições do meio, podem ser ionizados em solução aquosa dando as características de surfactante iônico. Os iônicos correspondem aos que em solução aquosa se ionizam produzindo íons orgânicos negativos (aniônicos) ou íons positivos (catiônicos), os quais são responsáveis pela atividade superficial. Os surfactantes não iônicos são os tensoativos que não produzem íons em solução aquosa. A solubilidade em água desses compostos é devida à presença de grupos funcionais que têm uma forte afinidade com a água (ARAÚJO, 2018; OLIVEIRA, 2010).

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fluidos com diferentes graus de polaridade (LIN et al., 2017). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (ARAÚJO et al. 2017; NITSCHKE e PASTORE 2002). Além disso, os surfactantes formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água como também a água pode ser solubilizada em hidrocarbonetos. Esta atividade emulsificante pode ser medidas por índices de emulsificação (BEZERRA et al., 2012; BANAT, 2000).

A eficácia do surfactante é determinada através da capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial, a qual pode ser medida através da Concentração Micelar Crítica (CMC), que é definida como a mínima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas (Figura 9) (DAMIÃO, 2012). Em concentrações acima da CMC, o tensoativo aumenta a solubilidade de compostos orgânicos em água (o composto orgânico é incorporado ao interior da micela), contudo, as tensões superficial e interfacial da solução permanecem constantes. (MONTEIRO, 2007; DESAI e BANAT, 1997).

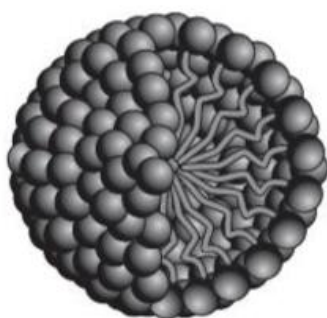


Figura 9 - Micela esférica.

Fonte: Araújo (2018).

Embora os primeiros surfactantes tenham sido obtidos através de recursos renováveis como gorduras e óleos, atualmente, grande parte é sintetizada a partir de derivados de petróleo, como o Tween, Triton, polietilenoglicol e dodecilsulfato de sódio, o que lhes confere um caráter não biodegradável e tóxico ao ambiente (LIU et al., 2014; SOUSA et al., 2014). Exemplo disto está o Triton X-100, o qual é um agente tensoativo bastante utilizado, principalmente na área de biotecnologia, onde a porção hidrofílica é formada por uma cadeia de óxido de polietileno e a região hidrofóbica formada pelo grupo orgânico 4 (1, 1, 3,3-tetrametilbutil) - fenilo (Figura 10) (ARAÚJO, 2018).

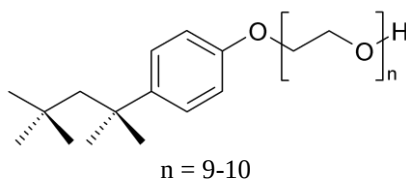


Figura 10 - Estrutura molecular do Triton X-100.

Fonte: Fciencias (2019).

Contudo, a busca de substitutos aos surfactantes sintéticos existentes, com a atual preocupação ambiental, entre os consumidores combinado com novas legislações de controle ambiental, acarretaram na procura de surfactantes naturais de origem microbiana (biossurfactantes), os quais possuem propriedades surfactantes e são biodegradáveis (ARAÚJO et al., 2013).

2.6 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são subprodutos metabólicos de bactérias e fungos, que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e interfacial, além de possuírem alta capacidade emulsificante (ARAÚJO, 2018; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes apresentam vantagens frente aos surfactantes sintéticos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, condições de produção moderadas, aceitabilidade ambiental, maior seletividade, bem como melhor atividade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, sendo tão eficientes quanto os surfactantes sintéticos (ARAÚJO et al., 2017; SOUZA et al., 2014). Estas propriedades resultaram em características de detergência, emulsificação, bem como aumento na solubilidade e mobilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos em água (BAI e MCCLEMNETS, 2016). Alguns destes surfactantes microbianos também apresentam atividades antimicrobianas (HENKEL et al., 2014).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis e farmacêuticas, apresentando seu maior potencial de aplicação na indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo e em casos de biorremediação, como em derramamentos de óleos em ecossistemas aquático (MÜLLER et al., 2012).

A porção hidrofílica dos biossurfactantes pode conter carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, álcool, fosfato ou peptídeo cíclico. Enquanto sua porção hidrofóbica é constituída de ácidos graxos de cadeia longa (SANTOS, 2012). A Figura 11 apresenta a estrutura química de alguns biossurfactantes.

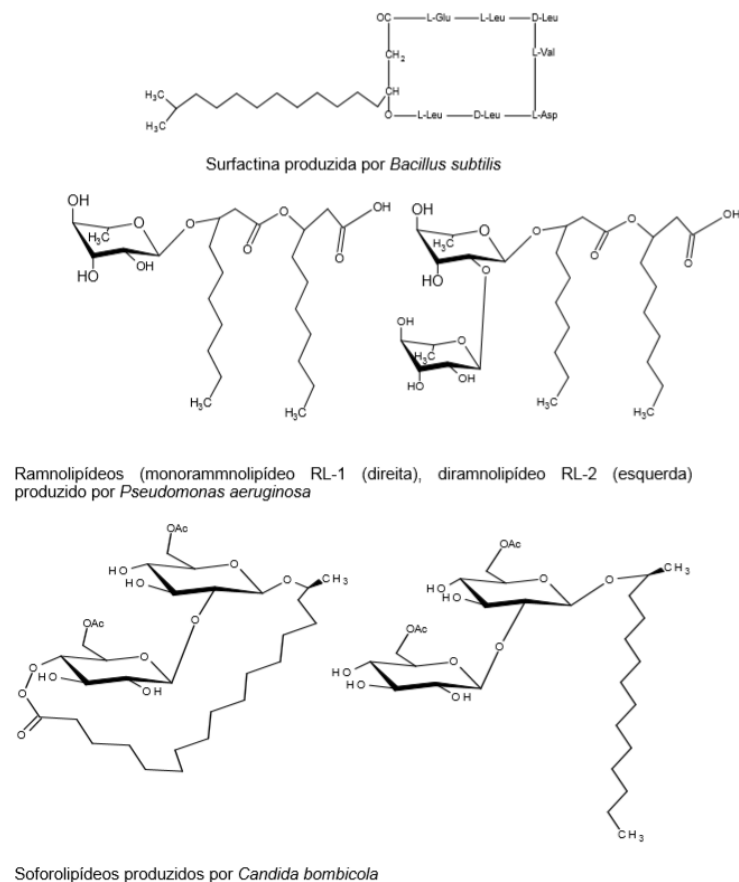


Figura 11 - Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.

Fonte: Monteiro (2007).

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes para os microrganismos ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas delas foram relatadas na literatura (ARAÚJO, 2018; ARAÚJO et al., 2017; BEZERRA, 2017, LIN et al. 2017; MUKHERJEE e DAS, 2010; RAHMAN et al, 2010):

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água: facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos;
- Transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*;
- Aderência-liberação da célula a superfícies: os microrganismos podem se utilizar dos surfactantes ligados à membrana celular para mobilidade, visando aderir ou se libertar de um determinado local de acordo com sua necessidade,

seja para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou sair de ambientes desfavoráveis;

- Atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios, os quais solubilizam os principais componentes das membranas celulares microbianas. Os ramnolipídeos da *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina da *Bacillus subtilis* foram relatados como antibióticos ativos;
- *Quorum sensing*: é o termo usado para descrever o processo de comunicação intra e intercelular entre espécies microbianas, o qual permite que estas tenham a capacidade de se comportar como organismos complexos, que se comunicam e agem coordenadamente, respondendo a diferentes estímulos de modo unificado.

Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e competitividade na busca por nutrientes (ARAÚJO, 2018).

A produção do biossurfactante pode ser espontânea ou induzida através da presença de compostos lipídicos, variações de pH, temperatura, aeração e agitação, ou ainda quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse com baixas concentrações de nutrientes e alterações nas condições ótimas de pH e temperatura (BEZERRA et al., 2012; SOUZA et al., 2014). A estrutura química dos biossurfactantes não depende apenas das espécies produtoras, mas também da composição do meio de cultura (MARCHANT e BANAT, 2012; OLIVEIRA, 2010).

Mesmo apresentando vantagens frente aos surfactantes sintéticos, a produção de biossurfactante em escala industrial ainda encontra limitações, devido a sua baixa produtividade e recuperação, bem como os altos preços dos meios de cultura usados em sua produção (HENKEL et al., 2012). Para que os custos sejam minimizados, a seleção adequada de micro-organismos, a adaptação dos mesmos e melhorias de engenharia genética para se obter altos rendimentos, como também a utilização de substratos com baixo valor econômico, como os subprodutos agroindustriais (ARAÚJO et al., 2017; BEZERRA, 2017; MÜLLER, 2012).

O uso dos resíduos agroindustriais como fonte de carbono nos meios de cultura, pode acarretar na redução de custos nos processos de produção dos biossurfactantes, visto que os meios de cultivo representam entre 10% a 30% do custo total do biossurfactante (LANG e WULLBRANDT, 1999). Entre os resíduos estão o soro do leite, a manipueira, resíduos de

destilarias, óleos residuais de fritura, óleos lubrificantes e borra oleosa de refinarias de petróleo (ARAÚJO et al., 2017; BEZERRA, 2017; LIU et al., 2014; HENKEL et al., 2012; MÜLLER et al., 2012; SILVA et al., 2010; RAZA et al., 2009; MIEIRA, 2007).

Diferentemente dos surfactantes que têm sua classificação baseada no grupamento polar, os biossurfactantes são classificados estruturalmente de acordo com sua natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora (RAHMAM et al., 2002). Os biossurfactantes podem ser classificados como: glicolipídeos, lipoproteínas e lipopeptídeos, fosfolipídeos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (NICOLÒ et al., 2014; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os glicolipídeos pertencem à classe de biossurfactante mais explorada industrialmente, onde sua estrutura é formada por um mono ou dissacarídeo ligado a um ácido alifático de cadeia longa ou hidroxialifático (THAVASI et al., 2011). Os glicolipídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos, são os mais conhecidos e formados por carboidratos (glicose, manose, 38 galactose ou ramnose) e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa (ex: ramnolipídeos, soforolipídeos e trealolipídeos) (HOU et al., 2017; MORAIS, 2012). Os glicolipídeos mais eficazes, em relação as propriedades surfactantes, são os trealolipídeos de *Mycobacterium*, os ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e os soforolipídeos de leveduras (ARAÚJO, 2018)

Os ramnolipídeos são um dos grupos de surfactantes mais estudados e produzidos por várias de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversos substratos e recebem muita atenção devido às suas notáveis propriedades tensoativas e emulsificantes (HOU et al., 2017).

2.6.1 Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são um tipo de glicolipídeos não iônicos que são produzidos por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (ABYANEH e FAZAELIPOOR, 2016). Nesta bactéria, os ramnolipídeos desempenham uma variedade de funções fisiológicas, como solubilização e absorção de hidrocarbonetos e compostos hidrofóbicos, adesão a superfícies, formação e manutenção de biofilmes, mobilidade celular, e, principalmente, atividade antibiótica (antifúngica e antibacteriana) (GUDIÑA et al, 2016; FREITAS et al., 2009).

Os ramnolipídeos foram isolados primeiramente por Bergstrom et al. (1946) da *Pseudomonas pyocyanea* após crescimento em glicose, entretanto não foi possível determinar as proporções molares da ramnose e do ácido β -hidroxidecanoato. Posteriormente, estudos verificaram que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, cultivada em meio com glicerol,

produzia um glicolípido com uma porção hidrofóbica composta de ácido graxo e uma porção hidrofílica composta por uma ou duas ramnosas (Rha-hidroxiácido graxo ou Rha-Rha-hidroxiácido graxo). Depois, foram reportados dois grupos de ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa*, mono e di-ramnolípídeos, compostos de uma unidade de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanoato (C_{10}) ou duas unidades de ramnose ligadas a duas unidades de ácido β -hidroxidecanoato, respectivamente (DÉZIEL et al., 2000; LANG e WULLBRANDT, 1999). Como também, foi relatada a existência de ramnolípídeos que apresentam ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia alquila (C_8 , C_{10} , C_{14}), com diferentes graus de insaturação, além da presença de anéis de ramnose com ramificações (LANG e WULLBRANDT, 1999).

Através da utilização de métodos mais sofisticados para determinação da estrutura química de compostos, compreende-se que o biossurfactante produzido pela *P. aeruginosa* é constituído por uma mistura de homólogos de ramnolípídeos, com unidades L-ramnose ligadas a uma cadeia de ácidos graxos não polares (MARCHANT e BANAT, 2012). Especificamente, o cultivo microbiano produz uma diversidade de ramnolípídeos com variações no comprimento da cadeia, grau de polimerização para as cadeias de ácidos graxos e diferenças no número de moléculas de ramnose. Estima-se que aproximadamente 60 congêneres de ramnolípídeos são produzidos durante o cultivo, onde os homólogos predominantes deste biossurfactante e suas concentrações dependem das linhagens de *P. aeruginosa*. Porém, geralmente, são predominantes os homólogos de ramnolípídeos com uma ou duas unidades ramnose ligadas a um polissacarídeo alquila com duas cadeias apolares unidas por uma ligação éster, os quais são descritos como ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato, referente ao mono-ramnolípídeo, e ramnosil-ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato, indicando o di-ramnolípídeo (Figura 12) (ARAÚJO, 2018; CHONG e LI, 2017).

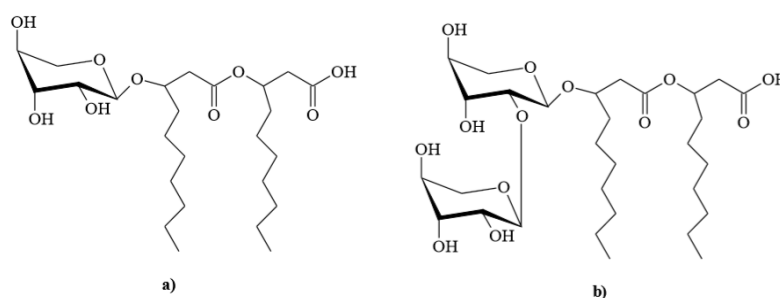


Figura 12 - Estrutura do mono-ramnolípídeo (a) e di-ramnolípídeo (b).

Fonte: Santos (2012).

A composição e as propriedades dos ramnolipídeos dependem da linhagem microbiana, das condições de cultivo e dos substratos utilizados para produzi-los. Algumas linhagens de *P. aeruginosa* são conhecidas por produzir com predominância apenas um homólogo de ramnolipídeos, enquanto outras produzem tanto mono quanto di-ramnolipídeos. Isto ocorre por que a proporção entre mono e di-ramnolipídeo pode ser controlada no método de produção, além disso, existem enzimas disponíveis que podem converter mono-ramnolipídeo em di-ramnolipídeo (ARAÚJO, 2018). Porém, um anel de L-ramnose confere maior hidrofilicidade ao ramnolipídeo, enquanto carbonos adicionais à cadeia de ácido graxo ou maior número de insaturações aumentam sua hidrofobicidade (HOU et al., 2017; PERFUMO et al., 2013).

Os ramnolipídeos são considerados como a classe mais promissora em termos de aplicação industrial, por suas propriedades físico-químicas (detergência, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases) e atividades antimicrobiana, podendo ser aplicados nas indústrias petrolífera, cosmética, farmacêutica, de alimentos, mineração e agrícola, como também em biorremediação de águas e solos contaminados (SILVA et al., 2010). Entre estas aplicações estão (ONWOSI e ODIBO, 2012; MÜLLER et al., 2012; ZHU e ROCK, 2012; COSTA, 2010; RAHMAN et al., 2002):

- Biorremediação e recuperação avançada de óleo: os ramnolipídeos removem eficientemente o óleo cru do solo contaminado e facilitam a biorremediação de derramamentos de óleo;
- Produtos farmacêuticos e terapêuticos; os ramnolipídeos apresentam baixa toxicidade, propriedades de atividade superficial e atividades antimicrobianas;
- Cosméticos: o ramnolipídeo como um ingrediente ativo é encontrado em produtos para cicatrização de feridas, queimaduras e tratamento de rugas;
- Detergentes e produtos de limpeza: os ramnolipídeos são emulsificantes naturais e agentes tensoativos que levam à sua ampla utilização em composições detergentes, produtos de limpeza e higiene pessoal;
- Agricultura: os ramnolipídeos são usados para remediação de solo, melhorando a qualidade do mesmo, auxiliando na absorção de fertilizantes e nutrientes.

Entretanto, os ramnolipídeos ainda não são amplamente utilizados devido a alguns fatores limitantes como o elevado custo de produção associado a métodos dispendiosos de recuperação (ARAÚJO, 2018; MORAIS, 2012).

Estudos indicam que os ramnolipídeos são um dos metabólitos secundários de *P. aeruginosa*, onde a sua produção coincide com o início da fase estacionária. Entretanto algumas espécies de bactérias podem apresentar uma pequena produção na fase de crescimento (BEZERRA, 2017; ONWOSI e ODIBO, 2012; ZHU e ROCK, 2012). Logo, estratégias de cultivo para estimular a produção desses biotensoativos têm sido reportadas na literatura, como a limitação de um ou mais nutrientes, principalmente as fontes de nitrogênio, fósforo, bem como de cátions multivalentes e alguns ânions (CLARKE et al., 2010; GLICK et al., 2010). A limitação de nitrogênio, entretanto, é a estratégia comumente utilizada para induzir a produção de ramnolipídeos. Embora *P. aeruginosa* seja capaz de metabolizar diferentes fontes de nitrogênio, como amônia e aminoácidos, por exemplo, o nitrato tem se mostrado como a melhor fonte para a indução da produção de ramnolipídeos, pois possui uma assimilação mais lenta, devido à redução do nitrato a nitrito e depois à amônia, simulando desta maneira uma condição limitante de nitrogênio (PARTOVI et al., 2013; THAVASI et al., 2011). Além disso, *P. aeruginosa* utiliza nitrato como aceptor final de elétrons em condições anaeróbias ou microaeróbias, provocando dessa maneira a escassez de nitrogênio no meio de cultivo (BEZERRA, 2017; ONWOSI e ODIBO, 2012; ZHU et al., 2012).

Estudos avaliaram também a produção dos biossurfactantes ramnolipídicos por resíduos industriais como fontes de carbono, como resíduos de indústria de óleo, glicerol, água residuais de agroindústrias, melaço de cana, milhocina, soro de leite e efluentes ricos em amido (BEZERRA, 2017, LIN et al., 2017; ARAÚJO, 2016). Dentre estes, o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, tem sido usado como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes, e pelo fato de ser um substrato de origem renovável e de grande disponibilidade, torna-se uma alternativa sustentável e promissora do ponto de vista econômico (BEZERRA, 2017; MOUSSA et al., 2014; RIKALOVIC et al., 2012).

Assim, para que haja um aumento de aplicações dos ramnolipídeos, é necessária a utilização de estratégias para estimular a sua produção como também o uso de resíduos ou subprodutos industriais de baixo custo no meio de cultivo (MORAIS, 2012; ROBERT et al., 1989).

2.7 APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Um recurso para o aumento da eficiência de hidrólise é a adição de surfactantes ao meio reacional, cujo intuito é promover maior adsorção das celulasas ao polímero celulósico (CASTRO e PERREIRA JR, 2010). Entretanto, ao combinar celulasas com surfactantes

aniônico ou catiônico, a hidrólise de materiais celulósicos não é influenciada, enquanto que a eficiência do processo hidrolítico pode ser potencializada pelo uso de surfactantes não iônicos (HOU et al., 2017; SILVA, 2012).

Embora a exata ação dos surfactantes não iônicos na sacarificação ainda não esteja completamente elucidada, pesquisas levantam a hipótese de que a parte hidrofóbica em sua estrutura interage diretamente com as ligninas, prevenindo a adsorção improdutiva das celulasas à superfície deste material, e acarretando, conseqüentemente, no aumento da hidrólise enzimática (ZHOU et al., 2015; SILVA, 2012). Outros mecanismos também têm sido propostos e investigados para o efeito estimulador dos surfactantes não iônicos sobre a hidrólise da celulose, tais como: os agentes tensoativos podem aumentar a estabilidade da enzima e evitar a desnaturação das mesmas durante a hidrólise; e os surfactantes podem afetar a estrutura do substrato celulolítico, tornando-a mais acessível para hidrólise enzimática (LIN et al., 2017; HONG-YUAN et al., 2011; LIU et al., 2006).

A influência dos biossurfactantes na hidrólise enzimática da celulose é altamente importante para redução dos impactos ambientais ocasionados pelo uso de surfactantes sintéticos. Recentemente, tem-se verificado que os biossurfactantes ramnolipídicos são aditivos eficazes que podem otimizar o processo de degradação de biomassa lignocelulósica, interferindo nas adsorções não produtivas das celulasas a lignina e estabilizando as enzimas, prevenindo sua desnaturação durante a hidrólise (ARAÚJO, 2016; PRABU et al., 2015; LIU et al., 2014).

Bezerra (2017) ao realizar a hidrólise enzimática de papel jornal com a adição do biossurfactante observou um aumento de 113% na liberação de glicose, mostrando que o ramnolipídeo impulsionou a hidrólise enzimática dessa biomassa. HOU et al. (2017), após a adição de ramnolipídeos na hidrólise de palha de arroz, obtiveram aumento de 44,65% na produção de glicose em relação à sacarificação na ausência de surfactantes. Feng et al. (2013) reportaram que na hidrólise da palha de arroz deslignificada por NaOH, ao utilizar os ramnolipídeos, alcançaram um aumento de 50% na atividade das celulasas. Wang et al. (2011) ao produzir celulasas e xilanases com a adição dos ramnolipídeos, observaram que este biossurfactante aumentou a atividade das celulasas de 102,9%.

Devido a estes efeitos, a adição de ramnolipídeos em hidrólises enzimáticas tem se apresentado como uma alternativa aos tratamentos de deslignificação de biomassas, contribuindo, assim, para a economia de tempo, pela retirada deste tratamento no processo, e redução dos impactos ambientais, devido à produção de efluentes tóxicos durante a remoção

ou neutralização dos produtos químicos provenientes da deslignificação (ARAÚJO et al., 2017; HOU et al., 2017; ZHANG et al., 2015).

Araújo (2016) avaliou a influência dos ramnolipídeos na hidrólise enzimática da casca de coco verde, a qual foi previamente submetida a dois tratamentos de deslignificação, o ácido e alcalino, H_2SO_4 a 0,6 M e NaOH a 1 M, e o peróxido de hidrogênio alcalino a 4% (v.v⁻¹). Utilizando a carga enzimática a 20 FPU.g⁻¹ e a casca de coco verde a 5 (m.v⁻¹), as hidrólises da casca do coco deslignificada pelo ácido e a base e por peróxido de hidrogênio alcalino apresentaram conversões de celulose de 24 e 22% respectivamente, enquanto que este processo com a casca de coco “in natura” contendo os ramnolipídeos obteve 20% de conversão de celulose. Logo, verificou-se que a hidrólise da casca não deslignificada contendo os ramnolipídeos apresentou a conversão de celulose próxima aos resultados das hidrólises com a biomassa deslignificada na ausência de tensoativos. Dessa forma, a adição dos ramnolipídeos proporcionou o mesmo desempenho na hidrólise da casca do coco verde que a deslignificação.

Entretanto, o uso de ramnolipídeos como alternativa para otimizar a hidrólise enzimática merece atenção, pois o mesmo surfactante, sendo usado com diferentes complexos enzimáticos e biomassas, pode demonstrar comportamentos diferentes em termos de interação com as enzimas e os substratos (SILVA, 2012; MULLIGAN, 2005). Inclusive, estes estudos não informaram a estrutura química dos ramnolipídeos, não identificando quais dentre os diferentes homólogos deste biossurfactante são eficazes aditivos na sacarificação da lignocelulose. Logo, pesquisas são necessárias para investigar os efeitos dos ramnolipídeos nas hidrólises enzimáticas.

3 MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS: PRESERVAÇÃO, VIABILIDADE E REATIVAÇÃO

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, TGC02 e TGC07, fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Estas bactérias foram isoladas de solos com histórico de contaminação por gasolina e óleo diesel na Região Metropolitana de João Pessoa (Paraíba, Brasil), onde a data e as coordenadas geográficas da coleta estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Data e coordenadas geográficas da coleta das linhagens.

Linhagem	Data da coleta	Coordenadas geográficas
TGC02	24/09/2014	7°80'13"S - 34°48'11"W
TGC07	05/11/2014	7°10'54"S - 34°54'01"W

As culturas bacterianas foram preservadas em glicerol a 10% (v.v⁻¹) a -20°C em freezer (Electrolux, FEE22). Para preservação, cada linhagem foi inoculada em 50 mL de caldo nutritivo (Isofar) a 8 g.L⁻¹ e incubada em um incubador rotativo (New Brunswick, Classic C25KC) a 200 RPM a 31±1°C durante 24 h. Em seguida, alíquotas de 3 mL da solução celular foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL contendo o meio Tryptone Soya Agar (Himedia) a 40 g.L⁻¹, as quais foram acondicionadas em uma câmara incubadora BOD (SPlabor, SP-500/120) por mais 24 h a 30,5±0,5°C. Após este período, as células foram transferidas para uma solução de glicerol a 10% (v.v⁻¹). A solução resultante foi distribuída em tubos Eppendorf e armazenada em freezer a -20°C.

A determinação da viabilidade das linhagens de *Pseudomonas*, em unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC.mL⁻¹), foi realizada através de diluições seriadas. Para isso, 1 mL das soluções microbianas armazenadas em Eppendorfs foi diluída de forma seriada em soluções de NaCl a 0,9% (m.v⁻¹) e, em seguida, 0,1 mL de determinadas diluições foram espalhados em placas de Petri contendo o meio Tryptone Soya Agar a 40 g.L⁻¹. Após inoculação, as placas foram incubadas em câmara incubadora BOD a 30,5±0,5°C durante 24 h. As colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias mecânico (Phoenix, CP602).

Na reativação, cada linhagem foi transferida, para erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL do caldo nutritivo a 8 g.L⁻¹. Em seguida, os frascos foram colocados no incubador rotativo

por 24 h a $31\pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 200 RPM, onde foram retiradas amostras durante 24 horas. O crescimento celular foi acompanhado por turbidimetria. A cinética de crescimento no caldo nutritivo foi realizada em duplicata.

3.2 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Para a produção de ramnolipídeos, os cultivos foram realizados em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de cultivo descrito por Patel e Desai (1977), em que as fontes de carbono e de nitrogênio e suas proporções foram adaptadas por Bezerra (2017) (Tabela 4). O glicerol comercial e o nitrato de sódio foram utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, na razão de 24 (g.g⁻¹). O cálculo da razão C.N⁻¹ foi baseado na determinação da quantidade de carbono presente no glicerol comercial (C₃H₈O₃) e de nitrogênio presente no nitrato de sódio (NaNO₃), que corresponde a 39,12 e 16,48%, respectivamente (BEZERRA, 2017). Logo, a limitação de nitrogênio no cultivo foi à estratégia utilizada para induzir a produção de ramnolipídeos.

Tabela 4 - Composição do meio de cultivo.

Reagentes	g.L ⁻¹
C ₃ H ₈ O ₃	40,44
NaNO ₃	4,00
KH ₂ PO ₄	1,36
K ₂ HPO ₄	1,42
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03
ZnCl ₂	0,021
CaCl ₂	0,01
MnSO ₄ . H ₂ O	$1,54 \times 10^{-3}$
CoCl ₂ .6H ₂ O	$4,10 \times 10^{-5}$
CuSO ₄ .5H ₂ O	$3,90 \times 10^{-5}$
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	$2,50 \times 10^{-5}$

O meio de cultivo esterilizado foi inoculado, separadamente, com 5% (v.v⁻¹) das soluções das linhagens bacterianas e, em seguida, colocados no incubador rotativo a $31\pm 1^\circ\text{C}$ a 150 RPM (BEZERRA, 2017). Durante o cultivo, foram retiradas amostras em 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, as quais foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. O retido foi utilizado na determinação da biomassa por gravimetria, enquanto o filtrado foi utilizado nas determinações de glicerol, ramnose e pH. Com intuito de avaliar a atividade emulsificante dos ramnolipídeos durante sua produção, foi determinado o

índice de emulsificação das amostras retiradas durante o cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3 EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Com base nos resultados obtidos, foi repetido o cultivo, conforme descrito no item 4.2, até o momento de maior concentração de ramnose, a fim de se obter 300 mL do caldo de produção do biossurfactante. Para separação da biomassa, esta solução foi centrifugada a 4856 g por 15 min e o sobrenadante obtido seguiu para extração com solventes orgânicos (BEZERRA, 2017).

O pH do sobrenadante foi ajustado para 2,0 utilizando uma solução de HCl a 5 mol.L⁻¹ e, em seguida, foi estocado por 20 horas a 4°C. Posteriormente, a solução resultante foi centrifugada a 4856 g por 15 min. O precipitado foi solubilizado em 50 mL de água ultrapura e transferido para um funil de separação, onde foi adicionada a mesma quantidade de clorofórmio e metanol a 2:1 (v.v⁻¹) (BEZERRA, 2017; RAHMAN et al, 2002; PATEL e DESAI, 1977). Para facilitar a extração, o funil foi agitado vigorosamente por 1 min, porém, devido à presença do biossurfactante na mistura, formou-se uma emulsão entre as fases. Logo, para desestabilizar esta emulsão, a suspensão foi centrifugada a 4856 g por 15 min. Após isto, a mesma foi deixada em repouso durante 30 min para a separação das fases em um funil de separação. A fase orgânica foi removida e o procedimento repetido mais duas vezes.

A concentração do biossurfactante foi realizada em um evaporador rotativo a 45°C (Tecnal, TE-210). O produto resultante, após a evaporação dos solventes, foi dividido em duas partes, uma para a caracterização estrutural e a outra para o estudo das hidrólises enzimáticas. Para este estudo, o produto foi solubilizado em 50 mL de água ultrapura, onde o pH foi ajustado para 7,0, e, em seguida, armazenado em geladeira a 4°C (Cônsul, CRM54).

3.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS RAMNOLIPÍDEOS

3.4.1 Purificação do extrato de biossurfactante

O precipitado resultante da concentração dos biossurfactantes foi submetido a uma purificação por cromatografia em coluna (CC) conforme a metodologia descrita por Monteiro et al. (2007). A CC foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica (30 cm x 2 cm) empacotada com 33 g de sílica gel 60 (S), com as partículas de tamanho entre 0,063-0,2 mm

(Vetec). Devido à retenção da amostra pela fase estacionária, foi realizada uma eluição gradiente com polaridade crescente, utilizando como fase móvel proporções de clorofórmio e metanol, as quais estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Proporções de clorofórmio e metanol durante a cromatografia em coluna.

Proporção	Clorofórmio (%)	Metanol (%)
1	95	5
2	90	10
3	80	20
4	50	50
5	30	70

As frações obtidas da CC foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) seguida de revelação em solução de anisaldeído. As massas das frações eluídas da cromatografia em coluna estão apresentadas no Apêndice A.

3.4.2 Ressonância magnética nuclear

A fração da CC correspondente aos ramnolipídeos foi submetida à análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). As amostras purificadas foram solubilizadas em CDCl_3 e transferidas para tubos de quartzo de 20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno. Os tubos com as amostras foram colocados em um espectrômetro Varian Unity Plus 400 MHz, onde os espectros de RMN uni e bidimensionais (^1H , ^{13}C e ^1H - ^{13}C HSQC) foram registrados a 27°C.

3.5 TRATAMENTO DO CAVACO DE EUCALIPTO

Os cavacos de *Eucalyptus grandis* foram gentilmente cedidos pela America Biomass Technologies (ABT), empresa especializada na produção de bioprodutos, como biocombustíveis e açúcares, a partir de biomassas tais como resíduos agroindustriais dos setores florestais e canavieiros, com sua sede localizada em Piracicaba (São Paulo, Brasil).

Segundo a ABT, os cavacos de *E. grandis* apresentavam aproximadamente 6,25 cm² com valores médios de comprimento e largura de 2,5 cm. Os mesmos foram submetidos a um pré-tratamento hidrotérmico por explosão a vapor a 200°C por 10 min em um reator de explosão por vapor ou STEX (“Steam Explosion”) com capacidade de 200 L equipado com

tanque de expansão (“blowtank”) de capacidade 5 m³. O cavaco de eucalipto foi adicionado manualmente ao reator. Após a carga, introduziu-se vapor saturado (20 kgf.cm⁻²) no reator. Procedeu-se uma purga mediante passagem do vapor pela biomassa, mantendo-se a válvula de escape aberta. Após 5 min, fechou-se a válvula de purga e procedeu-se ao aquecimento da mistura até a temperatura de 200°C (pressão interna de 17,5 kgf.cm⁻²). Após 10 min de processamento, realizou-se a descompressão súbita do reator mediante abertura automática da válvula de descarga rápida. O material foi expelido do reator e coletado no tanque de expansão. Em seguida, o material sólido resultante foi separado da fração líquida por filtração, vedado em sacos plásticos e transportado para o Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco), onde foi armazenado em geladeira a 4°C.

Para remoção de açúcares solúveis sobrepostos a biomassa, o cavaco foi lavado utilizando 2 L de água destilada a 90°C para cada 50 g de biomassa. Com intuito de evitar que a fibra lavada retivesse água no seu interior, a mesma foi seca em estufa (Novatecnica, NT-514) a 50°C até apresentar massa constante. Em seguida, com o auxílio de almofariz e pistilo, a biomassa seca foi macerada e armazenada em recipientes vedados a temperatura ambiente, 25°C, para caracterização química e hidrólises enzimáticas (Figura 13).

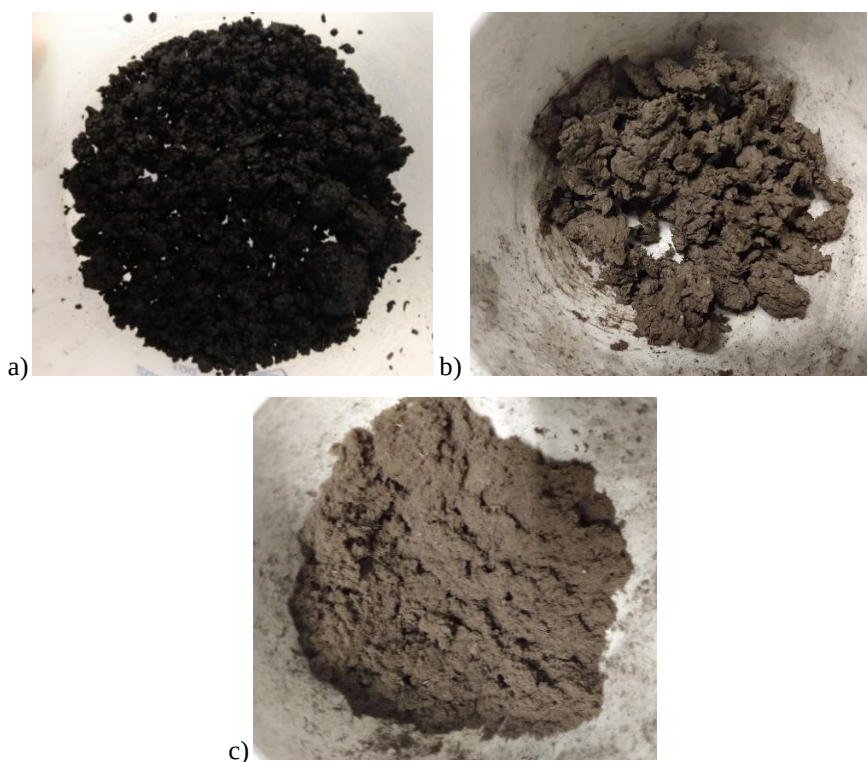


Figura 13 - Cavaco de eucalipto antes da lavagem (a), após secagem em estufa (b) e macerado com pistilo e almofariz (c).

3.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CAVACO DE EUCALIPTO

A caracterização do cavaco de eucalipto, quanto a sua composição de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas totais, foi realizada empregando a metodologia descrita e validada por Gouveia et al. (2009), a qual foi baseada no método divulgado pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER et al., 2008).

3.6.1 Hidrólise do cavaco de eucalipto com ácido sulfúrico

Amostras de 2 g do cavaco de eucalipto foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H_2SO_4 a 76% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$), sob vigorosa agitação, em um banho termostatzado a 45°C por 10 min. Em seguida, a solução resultante foi transferida quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram levados à autoclave por 1,5 h a 121°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram resfriados à temperatura ambiente (25°C), sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro quantitativo com porosidade de 28 μm , o qual foi previamente seco e pesado.

O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. Esta solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e lignina solúvel. A fração sólida retida no filtro foi lavada com água destilada até a neutralização do pH da biomassa.

3.6.2 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e furfural na fração líquida

A quantificação dos compostos presentes no hidrolisado foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual foi composto por um sistema equipado com uma bomba quaternária com degaseificador e um forno para controle da temperatura da coluna (Shimadzu Corporation). Para determinação da celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, furfural e HMF, foram utilizados um detector por índice de refração- IR (Shimadzu Corporation), uma coluna de troca iônica, Aminex® HPX-87H+ (Bio-Rad) e uma solução de H_2SO_4 a 5 mM como fase móvel, onde a temperatura do forno foi de 60°C, o fluxo a 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção de 20 μL .

As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 μm antes do procedimento analítico. A determinação da quantidade final dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) foi baseada em uma correção através os fatores de conversão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Fatores de conversão dos precursores da celulose e hemicelulose.

Componentes	Fator de Conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido Acético (H)	0,72
Ácido Fórmico (C)	3,52
Furfural (H)	1,37
Hidroximetilfurfural (C)	1,29

C: precursores da celulose; H: precursores da hemicelulose.

3.6.3 Determinação de lignina solúvel na fração líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi transferida a um béquer, onde o pH foi ajustado para 12 utilizando uma solução de NaOH a 6 mol.L⁻¹. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, onde o volume foi completado com água destilada, obtendo assim uma diluição de 1:20. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro (Gehaka, VIS-200) a 280 nm, tendo a água como branco. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a curva de calibração da concentração de lignina em função da absorbância em 280 nm, a qual esta apresentada no Apêndice B.

3.6.4 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido na fração sólida

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida, após a neutralização do pH da biomassa, foi seco em estufa de secagem (Novatecnica, NT-514) a 105°C até massa constante. Em seguida, o material seco foi transferido quantitativamente para cadinhos de porcelana, previamente pesados, os quais foram calcinados a 700°C por 3 h. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas, foram resfriados em dessecador e pesados. Por diferença de massa, foi determinada a quantidade de cinzas presente na lignina insolúvel em ácido (M_{cl}) (Equação 1).

$$M_{cl} = M_{ac} - M_{dc} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, o M_{ac} é a massa do cadinho contendo o papel de filtro e o retido antes da calcinação e o M_{dc} é a massa do cadinho contendo as cinzas após a calcinação. Logo, o teor de lignina insolúvel em meio ácido foi determinado pela Equação 2.

$$Lig_L = \left[\frac{M_{PF+S} - M_{PF} - M_{cl}}{M_a} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo, Lig_L a porcentagem de lignina insolúvel em ácido, M_{PF+S} a massa do papel de filtro com a fração sólida (g), M_{PF} a massa do papel de filtro previamente seco (g), M_{cl} a massa de cinzas presente na lignina insolúvel (g) e M_a a massa da amostra inicial seca (g).

4.6.5 Determinação de cinzas

Para determinação do teor de cinzas totais, foram transferidos 2 g de cavaco de eucalipto seco em cadinhos de porcelana previamente pesados, os quais foram calcinados a 700°C por 3 h. Por diferença de massa, o teor de cinzas totais (*Cinzas*) foi determinado conforme a Equação 3.

$$Cinzas = \left(\frac{M_c}{M_a} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, M_c é a massa de cinzas (g), diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho previamente pesado, e M_a é a massa da amostra inicial seca (g).

3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O complexo enzimático utilizado neste estudo foi o Cellic® CTec1 (Novozymes, Dinarmaca). Foi determinada a atividade das celulases totais (FPU.mL⁻¹) desta enzima conforme a metodologia descrita por Ghose (1987) adaptadas pela National Renewable Energy Laboratory, NREL (2008).

Foram utilizados tubos de ensaio contendo uma tira de papel de filtro quantitativo (Quanty, JP41) de 50 mg com 1,0 x 6,0 cm enrolado e totalmente submerso em 1,0 mL da solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). Os tubos foram colocados em banho

termostático a 50°C por 1 min para equilíbrio da temperatura. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL da enzima diluída adequadamente em tampão citrato aos tubos, os quais foram mantidos a 50°C por 60 min. Estas diluições enzimáticas foram preparadas a partir de uma solução do complexo enzimático com diluição 1:20. Para determinar a concentração inicial de glicose presente na solução de enzimas (controle enzimático) foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém sem o papel de filtro. Para o controle do substrato, foi realizado o mesmo procedimento, porém com o papel de filtro e 1,5 mL do tampão citrato de sódio.

A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada de acordo com metodologia do ácido dinitrosalicílico (DNSA) descrita por Miller (1959). Foram transferidos aos tubos 3,0 mL de DNSA e, em seguida, as soluções foram levadas a água fervente por 5 min. Após este período, foram resfriados em banho de gelo e aferidos para o volume de 25 mL com água destilada. A medição da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Gehaka, VIS-200G) a 540 nm. Foi utilizado como branco 1,5 mL do tampão citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). A curva padrão do açúcar redutor está apresentada no Apêndice C.

3.7.1 Cálculo para a atividade em FPU.mL⁻¹

A quantidade de enzima pode ser expressa em termos de sua atividade, onde a Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica, recomenda a seguinte definição (DIXON e WEBB, 1979): “Uma unidade de atividade (UI) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 µmol de substrato, ou a formação de 1,0 µmol de produto por minuto”. Para calcular as unidades das atividades enzimáticas foi utilizada a Equação 4.

$$UI = \frac{m}{t} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde m é a quantidade do produto enzimático em µmol, e o t é o tempo da análise enzimática em minutos. A concentração de atividade enzimática, (Enz), em UI.mL⁻¹ ou µmols.min⁻¹.mL⁻¹, pode ser calculada segundo a Equação 5, onde V_e é o volume do extrato enzimático utilizado na análise enzimática (mL).

$$Enz = \frac{UI}{V_e} \quad (\text{Eq. 5})$$

De acordo com a IUPAC (NREL, 2008), a atividade das celulases é expressa em termos de unidades de papel de filtro (FPU, Filter Paper Units) por mililitro da enzima, onde a quantidade absoluta de glicose liberada na medida em FPU é de 2,0 mg.

Para o cálculo da atividade enzimática, baseando-se na Equação 5 e sabendo que 1 μmol de glicose equivale a 0,18016 mg, a quantidade de glicose liberada na medida em FPU é de 2,0 mg, 0,5 mL foi o volume da diluição enzimática utilizada em cada ensaio, e que o tempo de análise foi de 60 min, obteve-se a Equação 6.

$$Enz = \frac{FPU}{mL} = \frac{2mg \text{ de glicose} / (0,18016 mg \text{ de glicose} / \mu\text{mol})}{0,5 mL \text{ das diluições enzimáticas} \times 60 \text{ min}} = 0,37 \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ (Eq. 6)}$$

Logo, a quantidade de glicose liberada (2 mg) por 0,5 mL da diluição enzimática em 60 min equivale a uma atividade em $\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$ de $0,37 \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$. Porém, para o cálculo em FPU, deve-se relacionar a quantidade da enzima original presente na diluição enzimática com a quantidade de $\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$ equivalente a 0,37 unidades. Logo a Equação 6 foi redefinida conforme a Equação 7.

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{0,37}{\text{concentração enzimática que libera 2mg de glicose}} \text{ (Eq. 7)}$$

Onde a concentração enzimática representa a proporção da enzima presente na diluição diretamente utilizada na análise.

3.8 CONDIÇÕES DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo diferentes massas do cavaco de eucalipto e cargas de Cellic® CTec1, conforme descrito na Tabela 7, e o biossurfactante ramnolipídico segundo sua concentração micelar crítica, a qual, conforme Bezerra (2017) e Rahman et al. (2002), é de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabela 7 - Condições dos experimentos da hidrólise enzimática variando a carga enzimática e concentração do cavaco de eucalipto.

Experimento	Cellic® CTec1 (FPU.g_{celulose}⁻¹)	Cavaco de Eucalipto (% m.m⁻¹)
1	14,4	1
2	14,4	5
3	14,4	10
4	28,8	1
5	28,8	5
6	28,8	10

Tanto os biossurfactantes quanto a enzima apenas foram adicionados aos frascos erlenmeyers contendo o cavaco após a esterilização dos mesmos a 121°C por 15 min. Entretanto, para evitar contaminação proveniente dessas soluções, as mesmas foram submetidas à esterilização por filtração com membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. O volume das misturas nos frascos foi completado para 50 mL com tampão citrato de sódio esterilizado (pH 4,8 a 50 mM). Os erlenmeyers foram colocados em incubador rotativo a 50±1°C e 150 RPM.

As amostras foram retiradas com 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Cada amostra foi imersa em um banho termostático a 100°C por 10 min para inativação das enzimas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6708 g por 10 min. As concentrações de glicose do sobrenadante foram determinadas por CLAE.

Com o intuito de verificar a eficiência dos ramnolipídeos nas hidrólises enzimáticas e seu potencial como indutor em comparação com o surfactante sintético, foram realizados os procedimentos descritos anteriormente, porém na presença do Triton X-100 e na ausência de surfactantes. A concentração do Triton X-100 utilizada nas hidrólises enzimáticas foi a mesma concentração do biossurfactante, 100 mg.L⁻¹.

3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.9.1 Turbidimetria

As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-VIS (Gehaka, VIS-200G) a 570 nm, depois da adequada diluição da solução microbiana. As curvas de calibração da absorbância em função da concentração das linhagens de TGC02 e TGC07 estão apresentadas no Apêndice D.

3.9.2 Gravimetria

Foram utilizadas membranas de 0,22 μm para a quantificação da biomassa, as quais foram secas antecipadamente em estufa a 105°C por 4 h e, após a filtração, por 24 h a 80°C (Novatecnica, NT-514). A concentração foi determinada pela Equação 8.

$$X = \frac{(m_2 - m_1)}{V_a} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde, X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}), m_1 a massa seca da membrana (g), m_2 a massa seca da membrana após a filtração (g) e V_a o volume da amostra (L).

3.9.3 Determinação do pH

O pH foi determinado utilizando um pHmetro digital (Jenway, 3510) com leitura simultânea de pH e temperatura.

3.9.4 Quantificação de glicose e glicerol

As concentrações de glicose, durante as hidrólises enzimáticas, e de glicerol, durante o cultivo para a produção do biossurfactante, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito no item 4.6.2.

3.9.5 Quantificação do biossurfactante

A concentração de ramnolipídeos foi expressa em termos de ramnose, a qual foi determinada pelo método colorimétrico usando ácido tioglicólico (RAHMAN et al., 2002). Este método consistiu em adicionar em tubos de ensaio 4,5 mL de ácido sulfúrico a 6:1 (v.v⁻¹) e 1 mL do caldo livre de células, os quais foram colocados em tubos de ensaios e homogeneizados em um agitador de tubos (SPlabor, AG-230AT) por 1 min em velocidade máxima. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 10 min e resfriada à temperatura ambiente. O volume de 0,1 mL da solução de ácido tioglicólico 3% recém-preparada (v.v⁻¹) foi adicionado aos tubos de ensaio contendo a mistura, os quais foram homogeneizados por 1 min em velocidade máxima no agitador de tubos e, em seguida, armazenada na ausência de

luz por 3 h. As absorbâncias foram determinadas utilizando-se espectrofotômetro (Gehaka,VIS-200G) a comprimentos de onda de 400 e 430 nm. A curva de calibração da L-rhamnose (Sigma) está apresentada no Apêndice E.

3.9.6 Índice de emulsificação

Este procedimento consistiu em colocar 2 mL do meio de cultura livre de células em tubos de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de óleo de soja comercial (LIZA). Em seguida, agitou-se a mistura em um agitador de tubos (SPlabor, AG-230AT) por 1 min, em alta rotação. Após 24 h, calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e a altura total da mistura, conforme a Equação 9.

$$E24(\%) = \frac{H_E}{H_S} * 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Sendo, H_E a altura da região emulsificada e H_S a altura total da solução. Com o intuito de verificar a estabilidade da emulsão durante 120 horas, foram determinados os índices de emulsificação com 48, 72, 96 e 120 h após o processo de agitação da mistura, os quais foram representados por E48, E72, E96 e E120, respectivamente.

3.9.7 Cromatografia em camada delgada analítica

As frações eluídas da coluna cromatográfica foram submetidas a CCDA, utilizando como fase estacionária placas de poliéster com sílica-gel 60 com dimensões de 40 e 80 mm e espessura de 0,2 mm (Macherey-Nagel, 805021), e como sistema eluente uma solução contendo CHCl_3 :MeOH: H_3CCOOH (65:15:2, v.v. $^{-1}$ v $^{-1}$) (RAZA et al., 2009). A revelação dos cromatogramas nas placas foi realizada empregando-se uma solução de anisaldeído (1,0 mL de anisaldeído, 20 mL de ácido acético glacial, 170 mL de metanol e 10 mL de H_2SO_4 concentrado) a 100°C por 5 min. Os resultados da CCDA estão apresentados no Apêndice A.

3.10 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A produtividade volumétrica de biomassa (P_x) e de biossurfactante (P_p), expressas em $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, foram calculadas a partir das Equações 10 e 11, respectivamente.

$$P_x = \frac{(X_{max} - X_i)}{t_x} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$P_p = \frac{(P_{max} - P_i)}{t_p} \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde X_i e X_{max} são os valores iniciais e máximos da concentração celular (biomassa), respectivamente, em mg.L^{-1} , P_i e P_{max} são as concentrações de biossurfactante inicial e máxima, em mg.L^{-1} , respectivamente, t_x e t_p são os tempos de cultivo quando a concentração máxima da biomassa e do biossurfactante foram obtidas, respectivamente, em horas.

As velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de formação de biossurfactante (μ_p) foram expressas, respectivamente, como h^{-1} , $\text{gS.gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $\text{gP.gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e determinadas segundo as Equações 12 a 14, a partir dos perfis das concentrações de X, S e P durante os cultivos.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (\text{Eq. 14})$$

A velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada a partir do ajuste linear $\ln(X)$ em função do tempo, sendo o valor do coeficiente angular da reta correspondente ao $\mu_{m\acute{a}x}$.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S} \text{ g.g}^{-1}$), substrato em produto ($Y_{P/S} \text{ g.g}^{-1}$) e células em produto ($Y_{P/X} \text{ g.g}^{-1}$) foram descritos pelas Equações 15 a 17.

$$Y_{X/S} = \frac{(X_{max} - X_i)}{(S_i - S_{Xmax})} \quad (\text{Eq. 15})$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_{max} - P_i)}{(S_i - S_{Pmax})} \quad (\text{Eq. 16})$$

$$Y_{P/X} = \frac{(P_{max} - P_i)}{(X_{max} - X_i)} \quad (\text{Eq. 17})$$

Onde S_i é a concentração inicial de substrato, S_{Xmax} é a concentração de substrato no momento do X_{max} e S_{pmax} a concentração de substrato no momento do P_{max} .

3.11 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A conversão de celulose em glicose (C) foi calculada utilizando a concentração de glicose obtida após a hidrólise enzimática e relacionando-a com a concentração de biomassa utilizada para converter a celulose neste açúcar, segundo a Equação 18.

$$C(\%) = \left(\frac{Glicose_{HE} * 0,9}{Carga\ de\ sólidos * Celulose_s} \right) * 100 \quad (Eq. 18)$$

$Glicose_{HE}$ é a concentração de glicose no hidrolisado enzimático ($g.L^{-1}$), 0,9 é o fator considerando a razão de massa molecular entre a glicose anidra contida na celulose e a glicose livre, *Carga de sólidos* é a concentração da biomassa lignocelulósica no experimento ($g.L^{-1}$) e $Celulose_s$ é o teor de celulose na biomassa lignocelulósica.

As velocidades iniciais da hidrólise enzimática (v_0), expressa como $g.L^{-1}.h^{-1}$, foram determinadas a partir do coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais da concentração de glicose em função do tempo reacional, considerando somente a região linear da formação de glicose.

3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o software PAST versão 3.14 para Windows realizando uma análise de variância (ANOVA) para testar diferenças nos resultados dos parâmetros cinéticos da produção dos ramnolipídeos, dos índices de emulsificação, como também nos parâmetros para avaliação das hidrólises enzimáticas. Os testes de Tukey foram utilizados para investigar estas diferenças ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO

Em relação ao desenvolvimento das bactérias em estudo no caldo nutritivo, primeiramente, foram determinadas as suas viabilidades celulares por contagem em placas, onde as linhagens TGC02 e TGC07 apresentaram viabilidades relativamente próximas, $9,37 \pm 0,04$ e $9,26 \pm 0,01$ Log UFC.mL⁻¹, respectivamente. Na Figura 14 são apresentados os perfis de crescimento das linhagens em estudo no caldo nutritivo em g.L⁻¹.

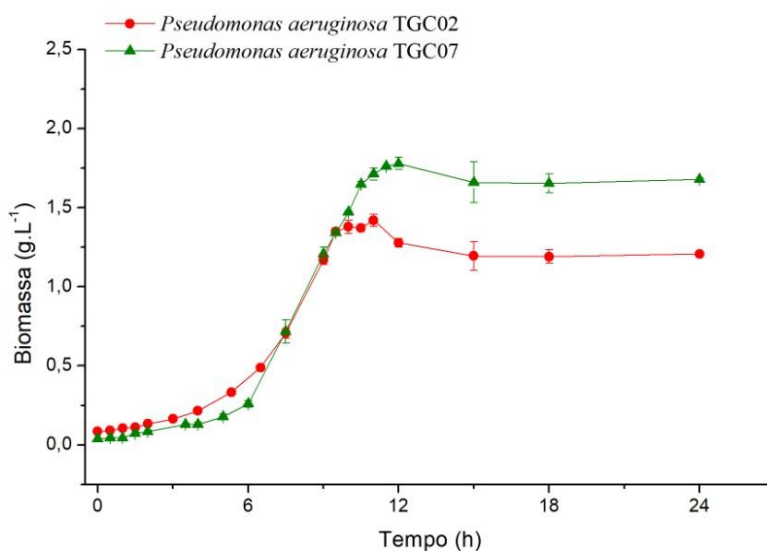


Figura 14 - Cinética do crescimento no caldo nutritivo pelas *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC07.

As viabilidades das linhagens TGC02 e TGC07 foram próximas, logo, seus respectivos crescimentos foram semelhantes, iniciando suas fases exponenciais após as 3 horas de cultivo, com μ_{Xmax} de 0,3185 e 0,4191 h⁻¹ e alcançando a fase estacionária as 9,5 e 10,5 h, respectivamente.

4.2 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DOS RAMNOLIPÍDEOS

Na Figura 15 são apresentadas as cinéticas do crescimento (X), consumo do substrato (S), produção do biossurfactante (P) e comportamento do pH durante o cultivo das linhagens TGC02 (Figura 15a) e TGC07 (Figura 15b).

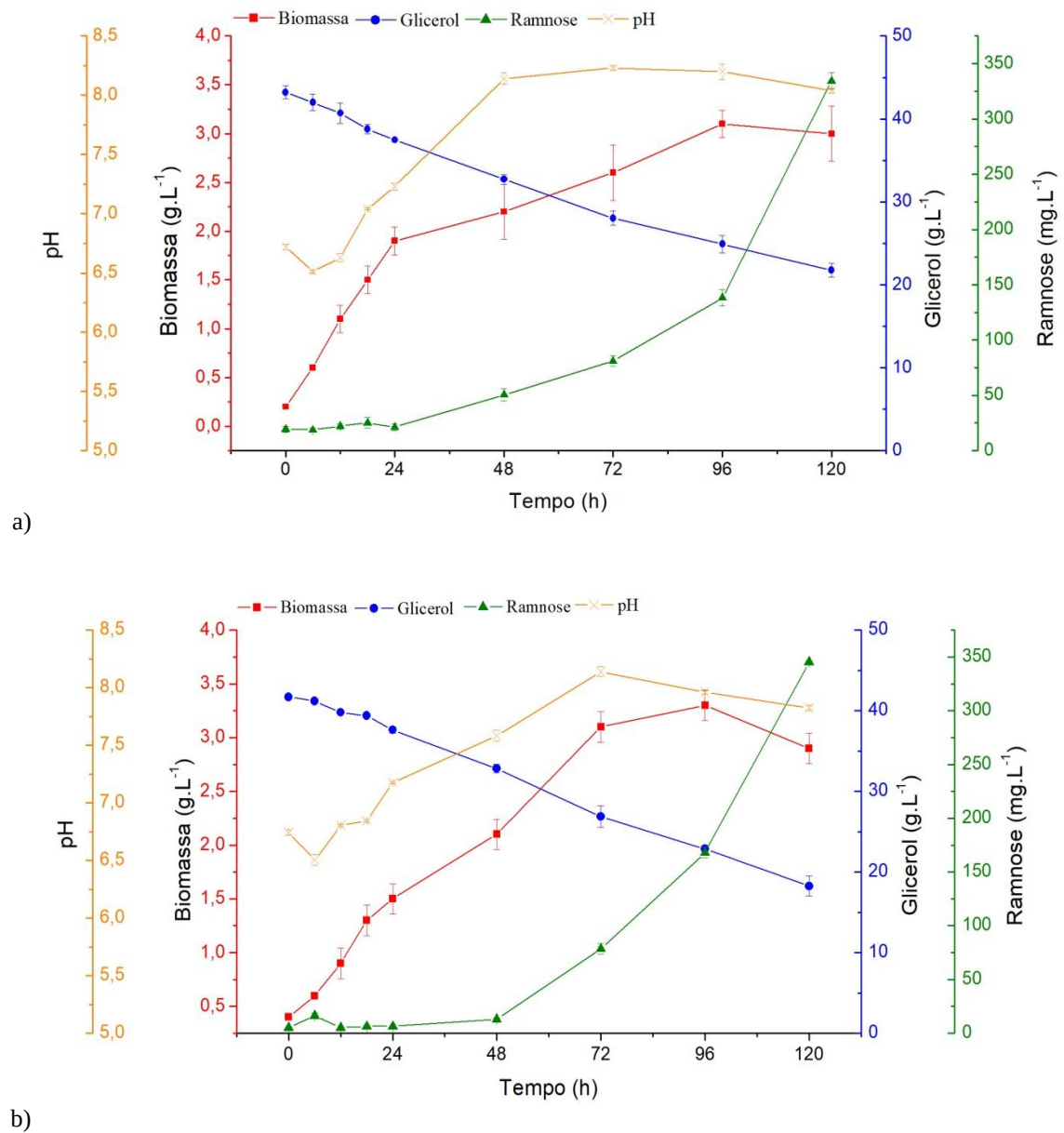


Figura 15 - Cinética do crescimento, consumo do glicerol, produção do biossurfactante e comportamento do pH durante o cultivo das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 (a) e TGC07 (b).

Na Figura 16 são apresentados os comportamentos das velocidades específicas de crescimento, síntese de ramnolipídeos e consumo de substrato das linhagens TGC02 (Figura 16a) e TGC07 (Figura 16b).

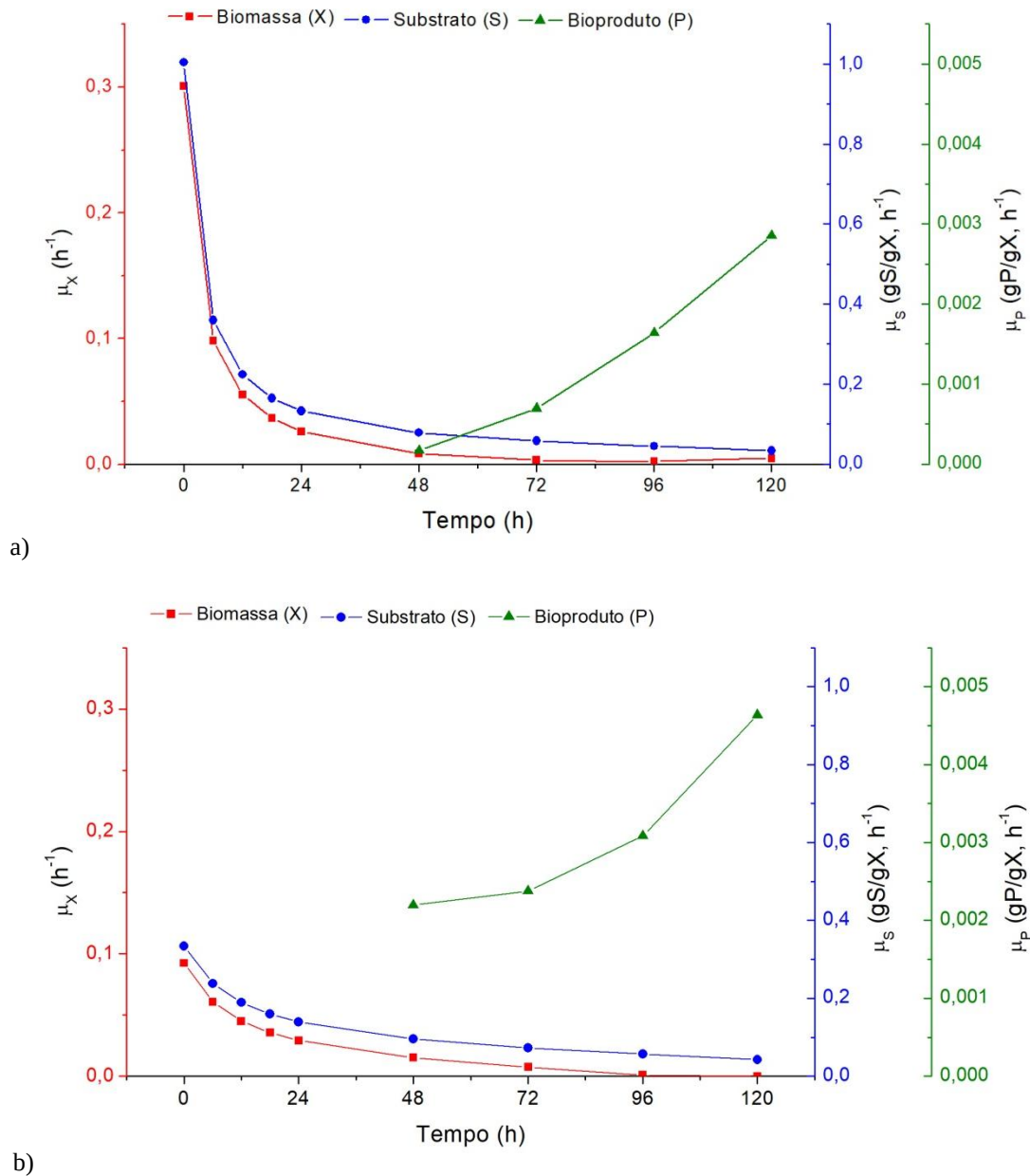


Figura 16 - Velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicerol e de formação do biossurfactante durante o cultivo das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 (a) e TGC07 (b).

Observando os resultados obtidos, durante as primeiras 24 h, os perfis cinéticos das duas linhagens demonstraram um crescimento exponencial. Neste mesmo período, os ramnolípídeos apresentaram concentrações menores que 25 mg.L^{-1} , em termos de ramnose, com pequena variação. Devido a estas baixas concentrações, as velocidades específicas de produção do biossurfactante de 0 a 48 h não foram quantificadas. Até as 24h, o consumo de glicerol foi pouco destinado para produção do biossurfactante.

Após as 24 h, ocorreu uma desaceleração na velocidade de crescimento das duas linhagens, apresentando, até as 96 h, um crescimento menos expressivo, em termos de velocidade. Inclusive, após as 96 h, houve uma estabilização na concentração de biomassa, resultando em velocidades específicas de crescimento iguais a zero. Entretanto após as 24 h, ocorreu um aumento na produção do biossurfactante, acarretando em uma aceleração nas velocidades específicas de geração do bioproduto. Partovi et al. (2013), Thavasi et al. (2011) e Rhaman et al. (2010) observaram este mesmo comportamento, onde a limitação de nitrogênio no meio de cultivo, induziu a produção de ramnolipídeos após a fase exponencial de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se também o aumento do pH do cultivo, alcançando valores próximos a 8,0 com 120 h. Este aumento foi atribuído à denitrificação em condições microaeróbias do nitrato a amônia por *Pseudomonas aeruginosa*, a qual reagindo com a água produz o hidróxido de amônio, elevando o pH do cultivo (SOUZA et al., 2014; ONWOSI e ODIBO, 2012; ZHU et al., 2012). Nesta etapa, o consumo de glicerol nas duas linhagens foi destinado ao crescimento celular e à produção dos biossurfactantes. Entretanto, a condição limitante de nitrogênio e sua denitrificação acarretaram em um consumo de glicerol de aproximadamente 55%.

Observando as velocidades específicas, verificou-se que os valores das velocidades específicas de crescimento e consumo de substrato da linhagem TGC07 foram menores que estas velocidades da linhagem TGC02, porém o perfil das velocidades específicas de produção da linhagem TGC07 foi maior que o perfil desta velocidade da linhagem TGC02. Logo, a *P. aeruginosa* TGC07 apresentou um crescimento e consumo de glicerol mais lento que a linhagem TGC02, porém demonstrou uma síntese de ramnolipídeos mais acelerada. Verificou-se também que os perfis das velocidades específicas de crescimento e de consumo de substrato apresentaram o mesmo comportamento nas duas linhagens, um decaimento exponencial durante o cultivo, indicando uma relação diretamente proporcional entre o crescimento celular e consumo de glicerol. Entretanto, as velocidades específicas de produção foram quantificadas somente a partir das 48 horas, onde apresentaram um aumento expressivo, demonstrando que a síntese de ramnolipídeos não esteve associada ao crescimento das bactérias em estudo, manifestando-se como metabólitos secundários.

Na literatura foi reportado que os ramnolipídeos não estão associados ao crescimento celular de *Pseudomonas aeruginosa*. Partovi et al. (2013), utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* MR01 cultivada em meios contendo diferentes fontes de carbono, observaram que com 48 h ocorreu uma redução da velocidade de crescimento e, conseqüentemente, uma estabilização na concentração celular, enquanto que a produção dos ramnolipídeos foi iniciada

apenas a partir deste momento, alcançando a maior concentração de biossurfactante no final do cultivo (240 h). Rhaman et al. (2010) verificaram que a *Pseudomonas aeruginosa* PA1 proporcionou alto consumo de nitrogênio e carbono durante as primeiras 48 horas de cultivo, acarretando no crescimento expressivo neste período, em termos de velocidade. Porém a partir deste momento, houve uma estabilização na concentração celular e o início da produção de biossurfactante, a qual apresentou o maior resultado, em termos de ramnose, com 96 horas de cultivo. Costa (2010), utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* B13 e diferentes hidrocarbonetos como fontes de carbono, inclusive o glicerol, na produção dos ramnolipídeos, observou que a partir das 48 horas ocorreu uma redução na velocidade de crescimento e uma estabilização na concentração de biomassa, enquanto que a produção de ramnolipídeos foi iniciada a partir deste momento, alcançando as maiores concentrações no final da incubação, com 72 horas.

Na Tabela 8 são apresentados os parâmetros cinéticos da produção dos biossurfactantes pelas duas linhagens.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da produção de ramnolipídeos para as linhagens TGC02 e TGC07.

Parâmetros cinéticos	Linhagens	
	TGC02	TGC07
$X_{\max}$ (g.L ⁻¹)	3,10±0,14 (a)	3,30±0,14 (a)
$P_{\max}$ (g.L ⁻¹)	334,35±7,37 (a)	345,39±1,06 (a)
$\mu_{x\max(0-24h)}$ (h ⁻¹)	0,07±0,01 (a)	0,05±0,01 (a)
$\mu_{x\max(24-96h)}$ (h ⁻¹)	0,02±0,01 (a)	0,03±0,00 (a)
P_X (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	30,21±1,47 (a)	30,21±1,47 (a)
P_P (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,62±0,08 (a)	2,84±0,01 (a)
C_{Glicerol} (%)	49,63±2,73 (a)	56,24±4,08 (a)
$Y_{X/S}$	0,1584 (a)	0,1537 (a)
$Y_{P/S}$	0,0147 (a)	0,0145 (a)
$Y_{P/X}$	0,1086 (a)	0,1173 (a)

$X_{\max}$: máxima concentração de biomassa; $P_{\max}$: concentração máxima de ramnolipídeo; $\mu_{x\max(0-24h)}$: velocidade específica máxima de crescimento das 0 as 24 horas de cultivo; $\mu_{x\max(24-96h)}$: velocidade específica máxima de crescimento das 24 as 96 horas de cultivo; P_X : produtividade volumétrica de biomassa; P_P : produtividade volumétrica de produto; C_{Glicerol} : porcentagem do consumo total de glicerol; $Y_{X/S}$: conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$: conversão de substrato em produto; $Y_{P/X}$: conversão de células em produto. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos pelas linhagens para cada parâmetro cinético.

A partir dos dados da Tabela 8, observou-se que as linhagens TGC07 e TGC02 não demonstraram diferenças significativas dos parâmetros cinéticos, indicando, assim, a mesma capacidade produtiva de ramnolipídeos nas condições deste trabalho.

Durante a produção, foi observada uma alteração na coloração do meio de cultivo, a qual esta apresentada na Figura 17.

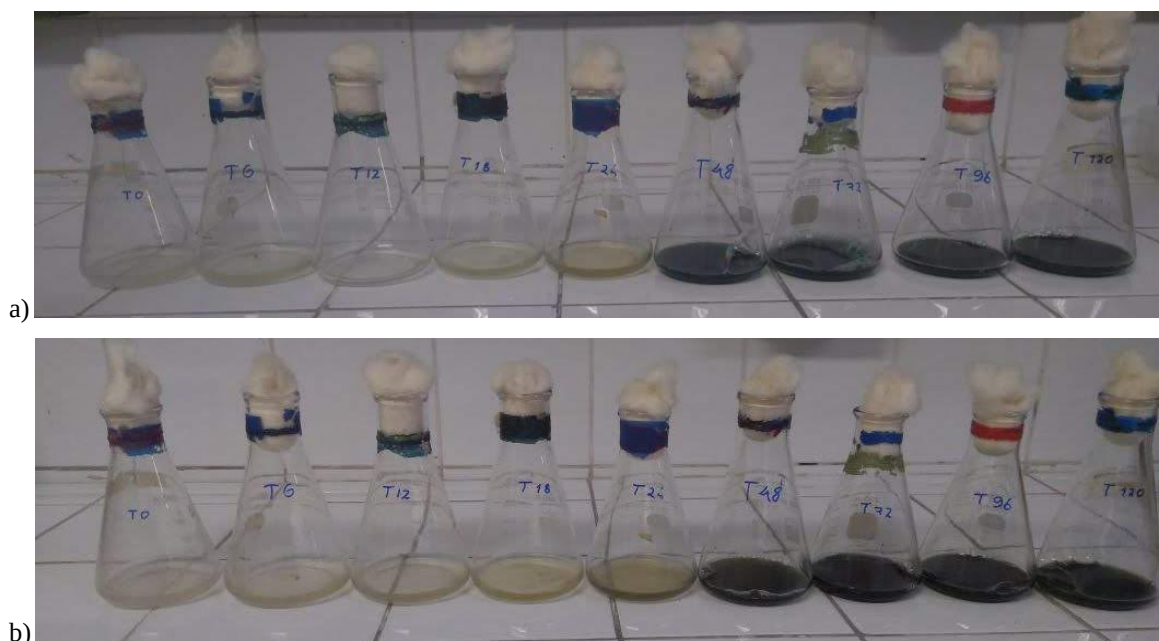


Figura 17 - Meio de produção do biossurfactante do tempo 0 a 120 horas contendo as *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 (a) e TGC07 (b).

Verificou-se que a partir das 18 horas houve uma mudança na coloração do meio da produção para a cor verde nas duas linhagens. Esta coloração foi intensificada após as 24 horas de cultivo. Esta alteração provavelmente foi ocasionada pela piocianina (5-metil-1-hidroxifenazina) a qual, segundo Tsoraeva e Martinez (2000) e Reyes et al. (1981), é um pigmento solúvel em água produzido especificamente por *Pseudomonas aeruginosa* e apresenta coloração azul esverdeada.

A piocianina é uma proteína de ação bactericida de pequeno espectro (bacteriocina), a qual é liberada durante a lise celular da *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando-se como metabólico secundário (MICHEL-BRIAND e BAYSSE, 2002; HASSETT et al., 1992). Quando absorvidas por bactérias susceptíveis, provocam a degradação não específica do DNA, acarretando na morte das células, sendo uma toxina para outras bactérias (O'MALLEY et al., 2004). Este pigmento, além de agir como antibiótico ativo, também auxilia no transporte de nutrientes do meio para as *Pseudomonas* (TREDGET et al. 2004).

A piocianina é utilizada no tratamento de infecções de diferentes bactérias (VUKOMANOVIC et al. 1997). Além disto, tem aplicação na área de medicina, alimentos e meio ambiente, como biossensores (PRIYAJA et al., 2016; OHFUJI et al. 2004) e no controle de contaminantes patogênicos em sistemas de aquicultura (PRIYAJA et al. 2014).

Dessa forma, as linhagens TGC02 e TGC07 podem ser utilizadas para síntese de piocianina, porém, é necessária uma investigação de sua produção.

4.3 PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS RAMNOLIPÍDEOS

4.3.1 Atividade emulsificante

O índice de emulsificação expressa a atividade emulsificantes dos surfactantes. De acordo com Willumsen e Karlson (1997) e Müller et al. (2012), um critério obedecido para ser considerado como bom agente emulsificante é a capacidade do tensoativo formar uma emulsão com hidrocarbonetos com uma altura acima de 50% da altura total da mistura por 24 horas. Foram determinados os índices de emulsificação E24 das amostras retiradas durante o cultivo de 120 horas com o óleo de soja (Figura 18).

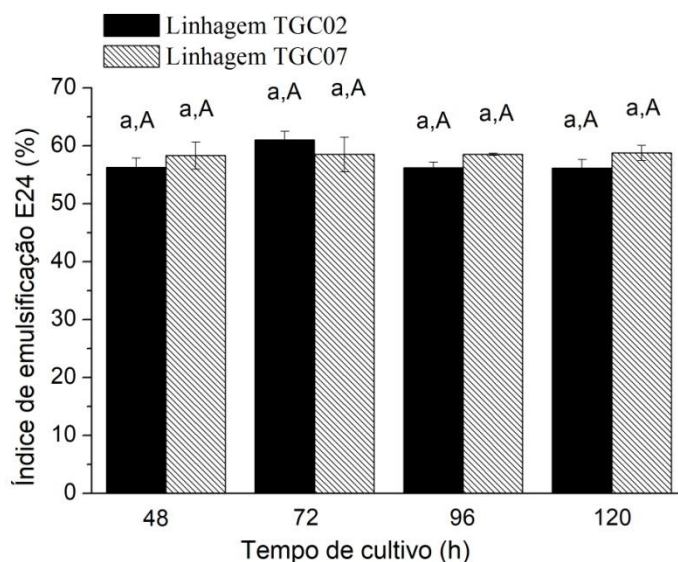


Figura 18 - Índice de emulsificação E24 das amostras livre de células das linhagens TGC02 e TGC07. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os índices de emulsificação E24 das linhagens em cada tempo de cultivo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os índices de emulsificação E24 dos diferentes tempos de cultivo para cada linhagem.

Devido à baixa produção de ramnolipídeos nas primeiras 24 horas de cultivo, as amostras do tempo 0 a 24 h das duas linhagens não apresentaram emulsão, e, consequentemente, os seus índices de emulsificação foram iguais a zero. Porém, a partir das 48 horas de cultivo, as amostras das duas linhagens proporcionaram índices de emulsificação E24 entre 55 e 65%, revelando que os ramnolipídeos produzidos neste estudo são bons agentes emulsificantes. Observou-se também que, mesmo com diferentes concentrações de ramnolipídeos, em termos de ramnose, não houve diferenças significativas entre os índices de emulsificação E24 das linhagens para cada tempo de cultivo como, também, entre os índices E24 dos diferentes tempos de cultivo para cada linhagem, indicando que a concentração de ramnolipídeos na amostra e sua atividade emulsificante não apresentaram uma relação de proporcionalidade.

Estudos relatam a boa atividade emulsificante dos ramnolipídeos com diferentes hidrocarbonetos. Souza et al. (2014) obtiveram o E24 do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* Bs20 com querosene de 60%. Araújo (2018) avaliando o índice de emulsificação E24 dos ramnolipídeos produzidos pela linhagem de *P. aeruginosa* AP029GLVIIA com hexadecano, tolueno, querosene, óleo de soja, óleo de milho e óleo de motor, obteve índices de emulsificação entre 55 e 75%. Wei et al. (2005) verificaram que os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* J4, obtiveram índices de emulsificação E24 com o querosene entre 50 e 80%. Varjani e Upasani (2016) ao analisar a atividade de emulsificação formada pelo sobrenadante livre de células da *P. aeruginosa* NCIM-5514 com diferentes substratos hidrofóbicos, obtiveram índices de emulsificação E24 entre 50 e 80%.

Dessa forma, os valores dos índices de emulsificação E24 obtidos no presente estudo foram semelhantes ao reportados pela literatura, evidenciando a boa atividade emulsificante dos ramnolipídeos produzidos pelas linhagens TGC02 e TGC07.

4.3.2 Estabilidade das emulsões

Com o intuito de acompanhar a estabilidade das emulsões no período de 120 horas, foram determinados os índices de emulsificação E48, E72, E96 e E120, os quais estão apresentados na Figura 19 para as linhagens TGC02 (Figura 19a) e TGC07 (Figura 19b).

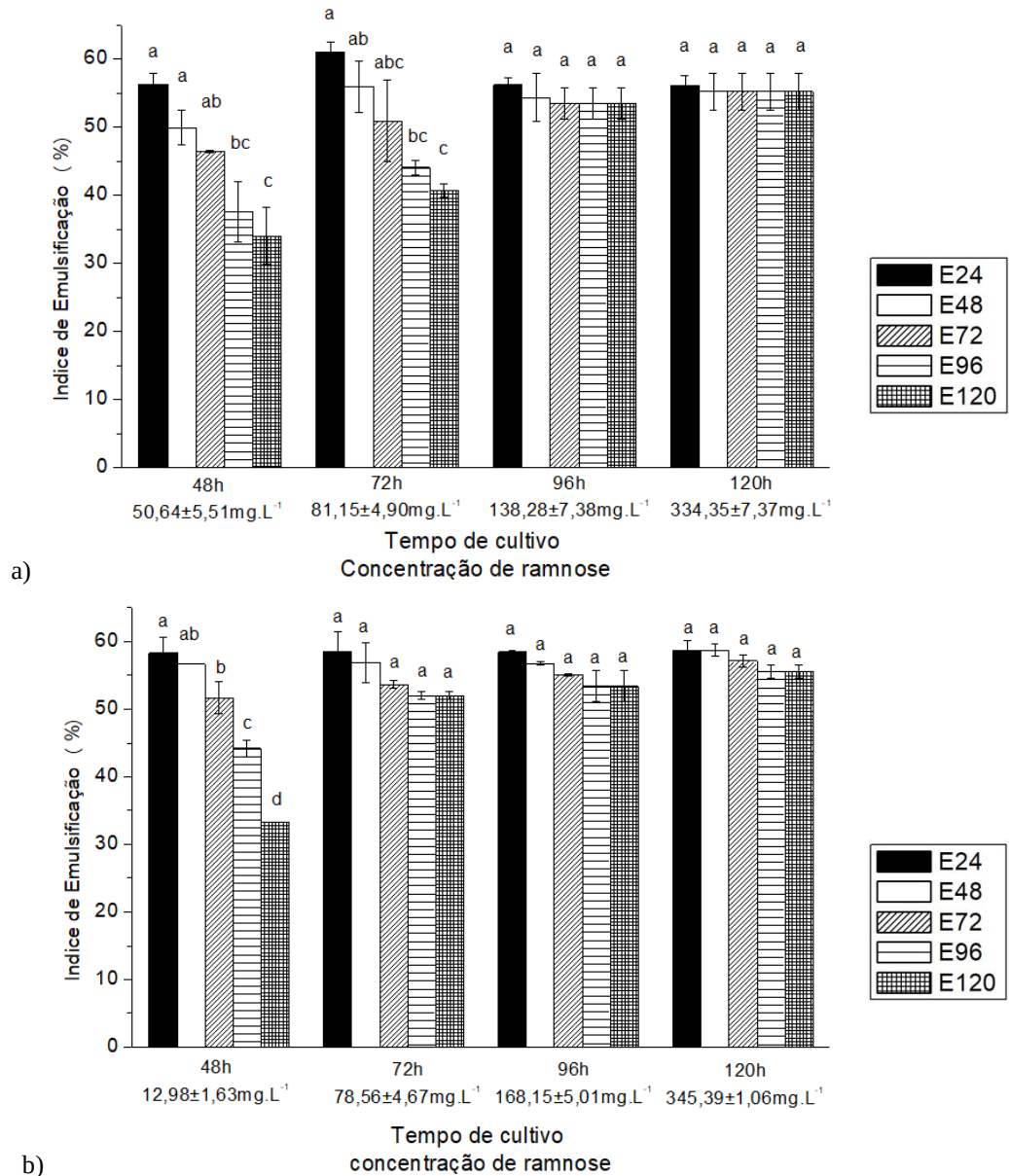


Figura 19 - Índice de emulsificação E24, E48, E72, E96, e E120 provenientes das amostras livre de células durante o cultivo da linhagem TGC02 (a) e TGC07 (b) e suas respectivas concentrações de ramnose. Diferentes letras ou conjunto de letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os índices de emulsificação em cada tempo de cultivo.

Observando os índices de emulsificação da linhagem TGC02, verificou-se que as amostras com 48 e 72 h de cultivo, com $50,64 \pm 5,51$ e $81,15 \pm 4,90 \text{ mg.L}^{-1}$ de ramnose, respectivamente, não demonstraram uma estabilidade nos índices de emulsificação durante as 120 horas, apresentando uma redução nas suas emulsões de 36,39 e 33,33%, respectivamente. Porém, os índices E24, E48 e E72 dessas amostras, não expressaram valores estatisticamente diferentes, indicando que suas emulsões mantiveram-se estáveis por 72 horas. Em relação às

amostras com 96 e 120 horas de cultivo, com concentração de ramnose de $138,28 \pm 7,38$ e $334,35 \pm 7,37$ mg.L⁻¹, respectivamente, os valores dos índices de emulsificação apresentaram oscilações menores que 5%, as quais não foram estatisticamente significativas, mantendo, por 120 horas, os seus índices de emulsificação estáveis e acima de 50%.

Sobre os resultados da linhagem da TGC07, a amostra com 48 h de cultivo, com $12,98 \pm 1,63$ mg.L⁻¹ de ramnose, apresentou uma variação entre os seus índices E24 e E120 de 42,85%, acarretando, com 120 horas, no índice de emulsificação menor que 35%. Entretanto, as amostras com 72, 96 e 120 h de cultivo, com concentração de ramnose de $78,56 \pm 4,67$, $168,15 \pm 5,01$ e $345,39 \pm 1,06$ mg.L⁻¹, respectivamente, não demonstraram diferenças significativas entre seus índices de emulsificação, indicando que suas emulsões também permaneceram estáveis por 120 horas.

Sabendo que, nas duas linhagens, as amostras com 96 e 120 h de cultivo apresentaram concentrações de ramnolipídeos maiores que as amostras com 48 e 72 h e que seus índices de emulsificação E24 não apresentaram diferenças significativas, foi possível deduzir que a concentração dos biossurfactantes ramnolipídicos não apresentou uma relação de proporcionalidade com sua atividade emulsificante. Porém, as emulsões formadas tenderam a permanecerem estáveis com uma maior quantidade de biossurfactante no meio.

4.4 ESTRUTURA QUÍMICA DOS RAMNOLIPÍDEOS

4.4.1 Isolamento dos ramnolipídeos

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC07 demonstraram eficiência similar em relação à produção dos ramnolipídeos, particularmente em termos de comportamento cinético e rendimento produtivo, como também em atividade emulsificante. Porém, segundo as velocidades específicas de produção, a linhagem TGC07 apresentou uma produção de ramnolipídeos mais acelerada, logo, esta linhagem foi selecionada para produção deste biossurfactante em maior escala. O extrato de ramnolipídeos provenientes da linhagem TGC07 foi dividido em duas partes, uma para purificação em coluna de sílica-gel 60 e posterior análise em RMN, e a outra para os estudos de hidrólises enzimáticas.

Após a cromatografia em coluna, as frações purificadas foram analisadas em cromatografia em camada delgada analítica, onde foi visualizada uma banda com fator de retenção (R_f) de 0,51. Raza et al. (2009), ao isolar os ramnolipídeos produzidos pela *P. aeruginosa* EBN-8, encontrou duas bandas com R_f de 0,52 e 0,73, eluídos em sílica-gel 60

com clorofórmio:metanol:ácido acético na mesma proporção que o presente estudo, os quais foram relacionados ao di-ramnolipídeo e ao mono-ramnolipídeo, respectivamente. Varjani e Upasani (2016) relataram o isolamento de ramnolipídeos produzidos pela *P. aeruginosa* NCIM-5514 com valores de R_f de 0,57 e 0,89, eluídos sobre sílica-gel com uma solução de clorofórmio:metanol:ácido acético (65:25:4, v.v.⁻¹v⁻¹), sendo a primeira banda referente ao di-ramnolipídeo e a segunda ao mono-ramnolipídeo. Logo, a linhagem TGC07 nas condições do presente estudo, produziu com predominância apenas um homólogo dos ramnolipídeos, o qual, segundo o R_f da banda observada na CCDA, foi referente ao di-ramnolipídeo.

4.4.2 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

As frações purificadas dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* TGC07 foram analisadas em RMN, onde os deslocamentos químicos (δ) do ^1H são apresentados na Figura 20. O espectro RMN ^1H mostrou sinais entre 5,8 a 0,8 ppm, demonstrando que não houve grupos aromáticos na estrutura dos ramnolipídeos. Observou-se um largo sinal centrado em 5,110 ppm, o qual foi correspondente aos grupos hidroxilas. Entre 4,4 e 3,2 ppm, foi possível observar três multipletos que foram atribuídos a grupos alifáticos mono e dissustituídos (carbinois). Entre os deslocamentos químicos 2,0 e 0,8 ppm, percebeu-se dois conjuntos de sinais atribuídos a cadeias alquílicas (acíclicos alifáticos).

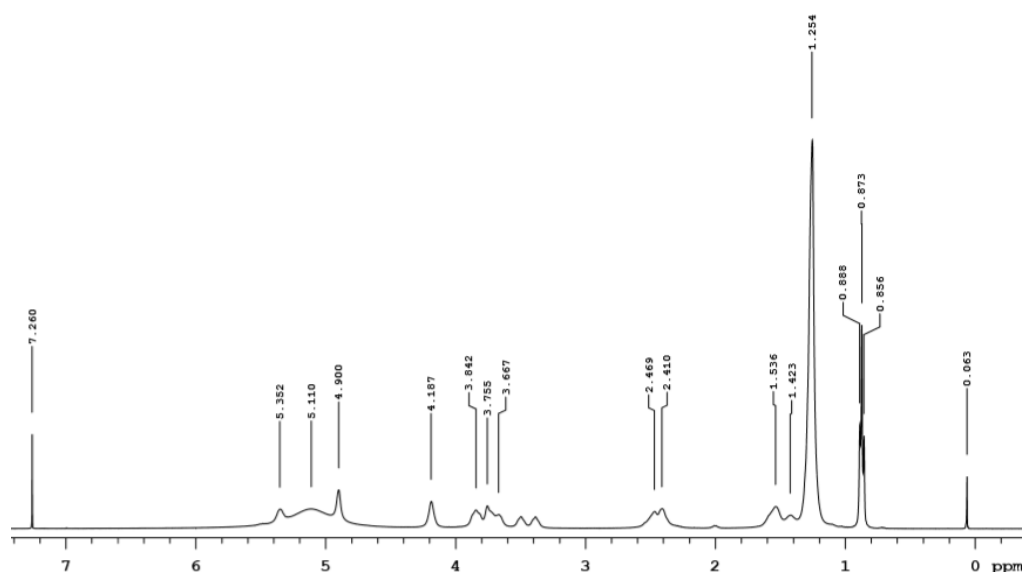


Figura 20 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 27°C, 400 MHz) do ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07.

Na Figura 21 são demonstrados os deslocamentos químicos (δ) de ^{13}C do ramnolípídeo. Em relação ao espectro de RMN de ^{13}C , foram observados deslocamentos químicos do grupo éster e do grupo carboxila em 171,690 e 173,980 ppm, respectivamente, como também os carbonos anoméricos (102 a 94 ppm), os grupos carbinois (80 a 65 ppm), os grupos metileno (42 a 22 ppm) e os grupos metila (18 a 14 ppm). Os deslocamentos observados na região de 77,319 a 76,681 ppm, são referentes aos carbonos do solvente utilizado na análise, CDCl_3 .

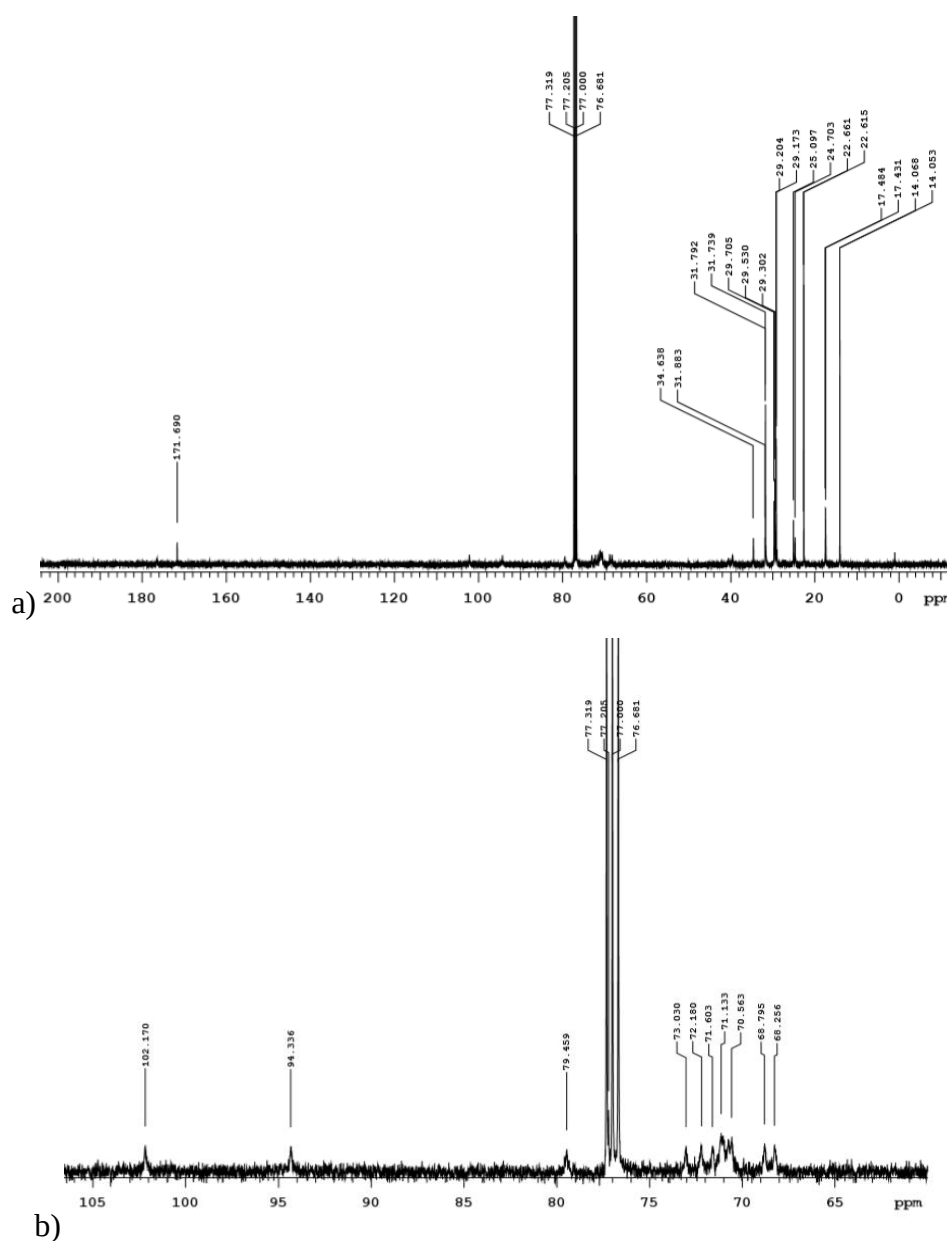


Figura 21 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 27°C , 400 MHz) do ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07 com deslocamento químico entre 0 e 200 ppm (a) e 60 a 105 ppm (b).

Na Figura 22 é apresentado o espectro bidimensional da correlação ^1H - ^{13}C HSQC dos ramnolipídeos. No espectro HSQC foi possível estabelecer duas correlações existentes entre os hidrogênios anoméricos em 4,9 ppm e os carbonos correspondentes a δ 102,170 e 94,336, indicando dois sacarídeos cíclicos, os quais sugerem duas moléculas de ramnose. Observaram-se também oito correlações e ^1H x ^{13}C atribuíveis a grupos alifáticos substituídos, como os carbinois, entre 80 a 65 ppm no espectro de ^{13}C (eixo F1) e de 3 a 4 ppm no espectro de ^1H (eixo F2), característicos de moléculas de açúcar. Foram observadas ainda correlações ^1H x ^{13}C , 0,873/14,053, 0,888/14,068, 1,254/17,431 e 1,254/17,484, indicativas de quatro metilas na substância. Verificaram-se duas correlações com grupos metileno com suas frequências de ressonância no espectro ^1H em campo baixo (2,469/41,750 e 2,410/38,990), indicando que seus prótons estavam mais desblindados que os outros grupos metileno presente na substância sob análise. Isto pode ocorrer devido à presença de átomos mais eletronegativos que o carbono, como átomos de oxigênio, ligados aos grupos metilenos, os quais tendem a atrair o elétron do ^1H para si, diminuindo o efeito do campo magnético produzido pela circulação de elétrons sobre o próton ^1H . As demais correlações visualizadas entre 31,883 a 22,615 ppm do espectro do ^{13}C e 1,254 ppm do espectro ^1H são características de grupos metilenos em cadeias alifáticas acíclicas.

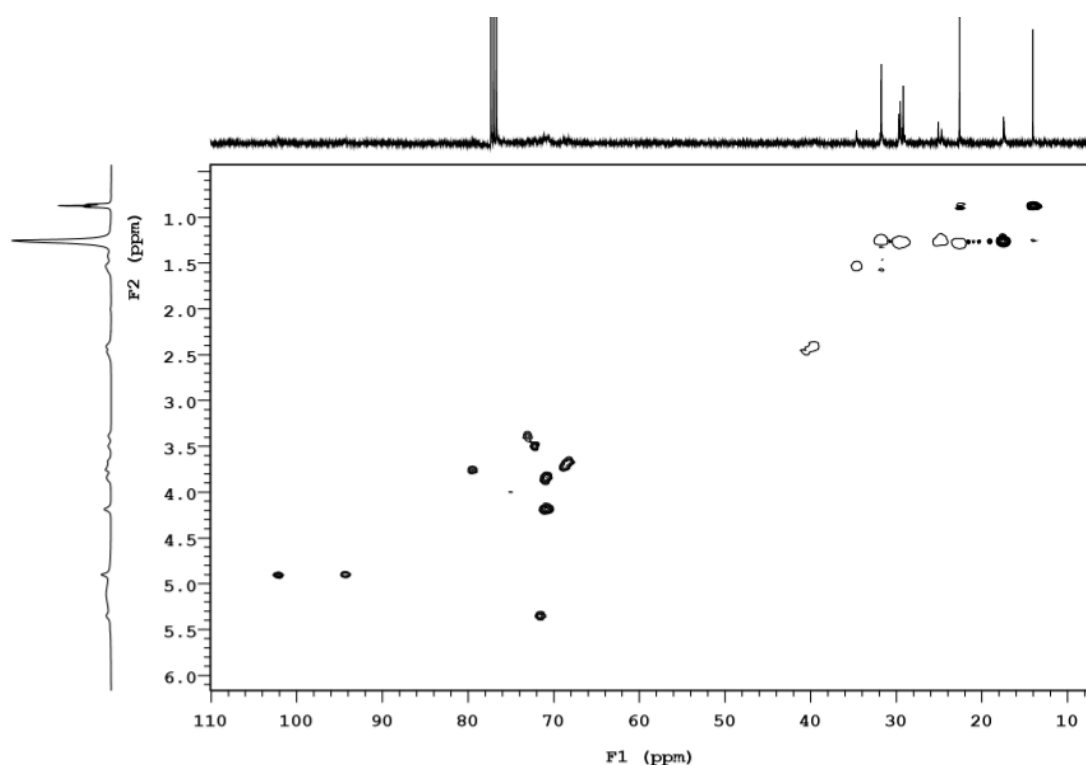


Figura 22 - Espectro parcial da ^1H - ^{13}C HSQC RMN (CDCl_3 , 27°C , 400 MHz) do ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07.

Dessa forma, verificou-se que o ramnolípídeo produzido pela linhagem TGC07 apresenta duas moléculas L-ramnose e uma estrutura alquila com duas cadeias de ácidos graxos apolares unidas por uma ligação éster, sendo assim um di-ramnolípídeo constituído por ramnosil-ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato, mesmo composto indicado na CCDA.

Com base na comparação dos dados espectrais de RMN obtidos para o di-ramnolípídeo do presente trabalho (Tabela 9) com os sinais relatos da literatura para di-ramnolípídeos, verificou-se que a substância purificada na fração TGC07 é semelhante ao di-ramnolípídeo descrito por Varjania e Upasani (2016) e Monteiro et al. (2007), produzidos por *P. aeruginosa*, como apresentado na Figura 23.

Tabela 9 - Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos ramnolípídeos produzido por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07.

Regiões	Numeração do carbono	Autor		Varjania e Upasani (2016)		Monteiro et al. (2007)	
		^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
		(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Ramnose 1	C-1''	4,900	102,170	5,40	103,39	4,73	102,5
	C-2''	3,892	74,633	3,73	73,84	3,86	70,4
	C-3''	3,632	68,256	3,46	75,00	3,40	68,1
	C-4''	3,384	72,180	3,34	74,05	3,13	73,3
	C-5''	3,755	70,563	3,70	71,34	3,56	70,9
	C-6'' (CH ₃)	1,254	17,484	1,27	17,60	1,11	17,2
Ramnose 2	C-1'	4,900	94,336	5,60	99,41	4,76	94,9
	C-2'	3,667	79,459	3,59	80,66	3,57	79,4
	C-3'	3,672	68,795	3,76	74,22	3,56	68,5
	C-4'	3,496	73,030	3,64	74,23	3,26	72,5
	C-5'	3,842	70,745	3,70	71,34	3,59	70,5
	C-6' (CH ₃)	1,254	17,431	1,27	17,60	1,10	16,4
Cadeia de ácidos graxos A	C-1	4,187	70,745	4,09	77,39	4,05	71,6
	C-2	2,469	41,750	2,52	40,64	2,28	39,4
	(CH ₂) _n	1,254	22,615/31,883	1,34	22,94/31,65	1,37/1,404	22,1/34,2
	C-3(CH ₃)	0,888	14,068	1,00	14,02	-	14,0
Cadeia de ácidos graxos B	-COOR	-	171,690	-	171,12	-	171,6
	C-4	5,352	71,603	5,67	75,16	5,24	70,8
	C-5	2,410	38,990	2,43	39,45	2,38	38,9
	(CH ₂) _n	1,254	22,615/31,883	1,34	22,94/31,65	1,37/1,404	22,1/34,2
	C-6(CH ₃)	0,873	14,053	0,99	14,02	-	14,0
	-COOH	-	173,980	-	173,78	-	173,6

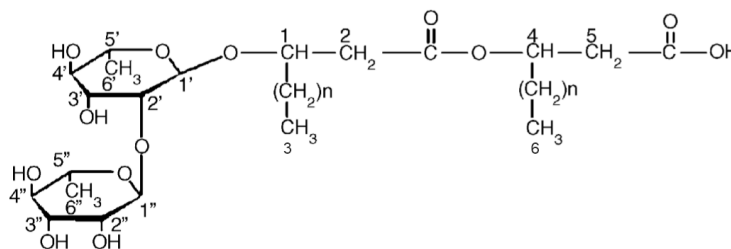


Figura 23 - Estrutura química de um di-ramnolípido.

Fonte: Adaptado de Monteiro et al. (2007).

4.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAVACO DE EUCALIPTO

O cavaco do *Eucalyptus grandis* utilizados nas hidrólises enzimáticas foi submetido ao pré-tratamento hidrotérmico por explosão a vapor a 200°C durante 10 min. Segundo Doria et al. (2014), durante este tratamento por vapor, com ou sem explosão (quando a despressurização do reator é lenta, até a pressão atmosférica), ocorre a auto-hidrólise, onde, além de solubilizar os extrativos da biomassa, provoca a degradação das hemiceluloses pelo ácido acético liberado por hidrólise dos grupos acetila da própria hemicelulose, sem causar degradação significativa da celulose e lignina. Na Tabela 10 é apresentada a composição química do cavaco de *Eucalyptus grandis* tratado por explosão a vapor.

Tabela 10 - Composição química do cavaco de *Eucalyptus grandis*.

Composição química	Proporção (%)
Celulose	69,47±1,56
Hemicelulose	2,19±0,01
Lignina total	36,61±4,11
Cinzas	1,42±0,04
Total	109,69±4,39

Segundo Lanças (2004), o valor do balanço de massa considerado exato em uma análise química é de 100±5%. Porém, na caracterização química de biomassas, como são determinados separadamente os precursores individuais da estrutura holocelulósica e as frações de lignina e cinzas, são aceitáveis, para exatidão, valores de balanço de massa entre 70 e 120% (GOUVEIA et al., 2009). Como o valor total da composição química do eucalipto, 109,69±4,39%, esteve entre os limites dos valores aceitáveis para exatidão, a caracterização química do cavaco de eucalipto realizada no presente estudo foi aceitável.

Na literatura, há poucos estudos que apresentam os teores dos principais componentes lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) do eucalipto submetido ao tratamento

hidrotérmico, com ou sem explosão. Santos e Caraschi (2009) e Santiago e Caraschi (2008), encontraram teores de celulose de 60,89 e 52,53%, respectivamente, submetendo o *Eucalyptus urograndis* ao tratamento a 170°C e 30 min, sem explosão. Romani et al. (2011), ao realizar o tratamento hidrotérmico com explosão do *Eucalyptus globulus* entre 185 e 205°C, obtiveram teor de celulose de 54,30 a 61,40%, respectivamente.

Em termos da hemicelulose, Santos e Caraschi (2009) e Santiago e Caraschi (2008), após um tratamento hidrotérmico na madeira de *Eucalyptus urograndis* a 170°C e 30 min, sem explosão, encontraram o teores de 5,02 e 5,77%, respectivamente.

Em relação à proporção de lignina, Longue-Junior. e Colodette (2011), obtiveram 24,5 e 25,4% para o *E. urograndis* submetidos ao tratamento por vapor sem explosão a 170°C e 30 min e a 170°C e 15 min, respectivamente. Romaní et al. (2011), ao realizar o tratamento hidrotérmico com explosão a 190°C, obtiveram o teor de lignina de 30,8%.

Conforme se pode observar, os valores determinados na caracterização química do *Eucalyptus grandis* tratado por explosão a vapor, apresentados na Tabela 10, foram próximos aos resultados reportados na literatura.

4.6 ATIVIDADE DA CELLIC® CTEC1

Na Figura 24 é apresentado o gráfico da concentração da enzima da Cellic® Ctec1 ($\text{mL}_{\text{enzima}} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função da massa de glicose (mg) liberada durante a reação enzimática.

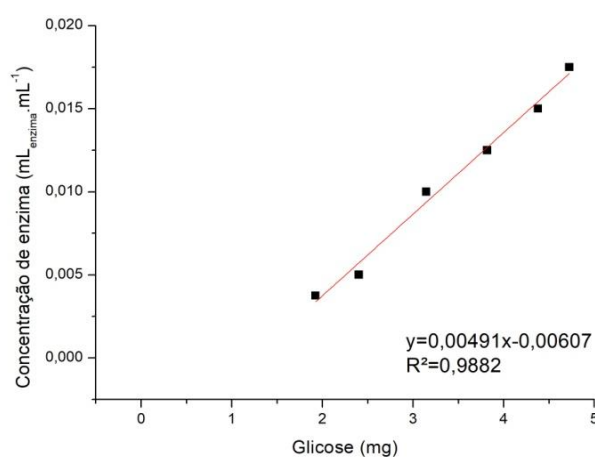


Figura 24 - Concentração da enzima em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL da enzima diluída.

A equação da reta referente à relação da concentração de enzima ($\text{mL}_{\text{enzima}} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a massa de glicose (em mg) está apresentada na Equação 19.

$$\text{Concentração de enzima } (C_E) = 0,00491 * \text{Massa de glicose } (m_G) - 0,00607 \text{ (Eq. 19)}$$

Segundo NREL (2008) e Ghose (1987), uma unidade de atividade das celulasas em papel de filtro por mililitros de enzima ($\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$), baseia-se na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose, logo foi determinado a concentração de enzimas presente na diluição enzimática que liberou exatamente 2,0 mg de glicose na reação:

$$C_E = 0,00491 * (2) - 0,00607 = 0,0037 \text{ mL}_{\text{enzima}} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Com o valor da concentração de enzima que liberou 2,0 mg de glicose em 60 min de reação, a atividade da Cellic® Ctec1 foi calculada conforme a Equação 7.

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \frac{0,37}{0,0037} = 100 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Portanto, a Cellic® Ctec1 apresentou uma atividade enzimática de $100 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$. Este resultado foi coerente com os valores reportados por Wang et al. (2012) e Bari et al. (2013), os quais encontraram atividades enzimáticas de 120 e $84 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a Cellic® CTec1, respectivamente.

A partir do valor obtido da atividade da Cellic® Ctec1, foi possível calcular o volume necessário de enzima a ser adicionado em cada experimento de hidrólise, segundo a carga enzimática de 14,4 e $28,8 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$.

4.7 HIDRÓLISES DO EUCALIPTO COM E SEM OS RAMNOLIPÍDEOS

Com o intuito de verificar a atuação dos biossurfactantes ramnolipídicos, especificamente os di-ramnolipídeos, na sacarificação enzimática do cavaco de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, nesta etapa verificada as hidrólises enzimáticas com e sem os biossurfactantes.

Na Figura 25 são apresentadas as concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas com e sem ramnolipídeos variando a carga de substrato a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) e a concentração enzimática a 14,4 (Figura 25a) e 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 25b).

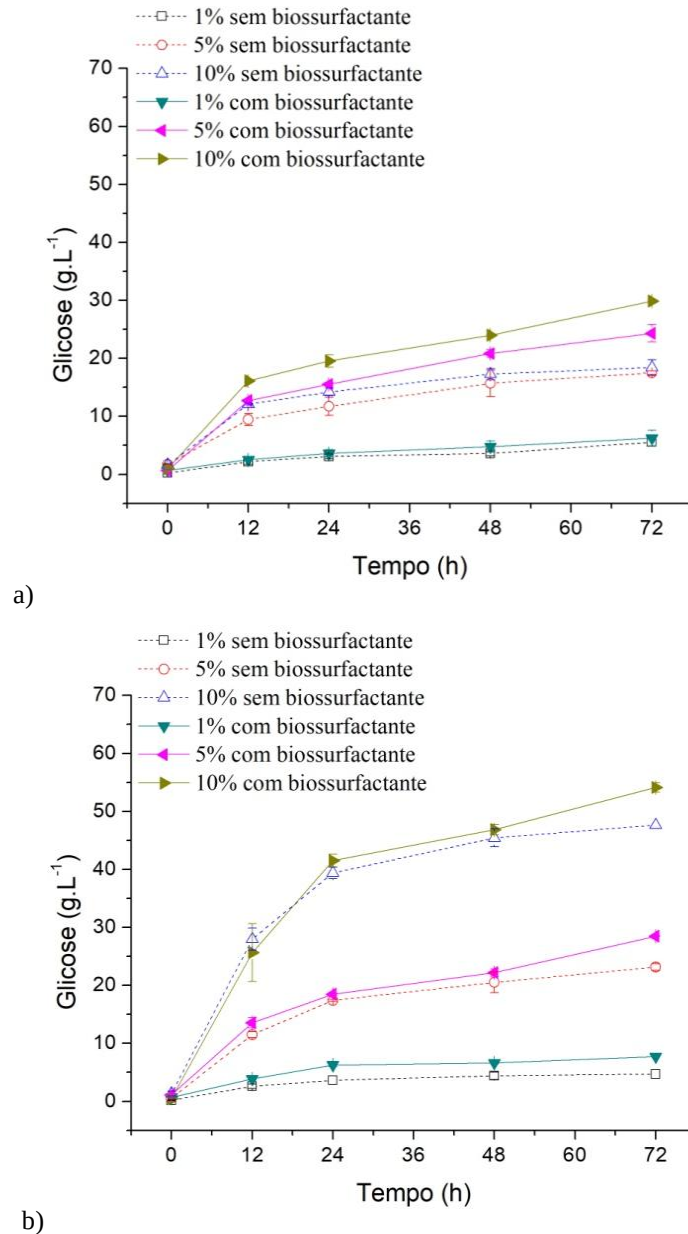


Figura 25: Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos.

Na Figura 26 são apresentadas as velocidades iniciais da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto para as condições com a carga enzimática de 14,4 (Figura 26a) e de 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 26b). Na Figura 27 são apresentadas as concentrações de glicose obtidas com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto para as condições com a carga enzimática a 14,4 (Figura 27a) e 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 27b).

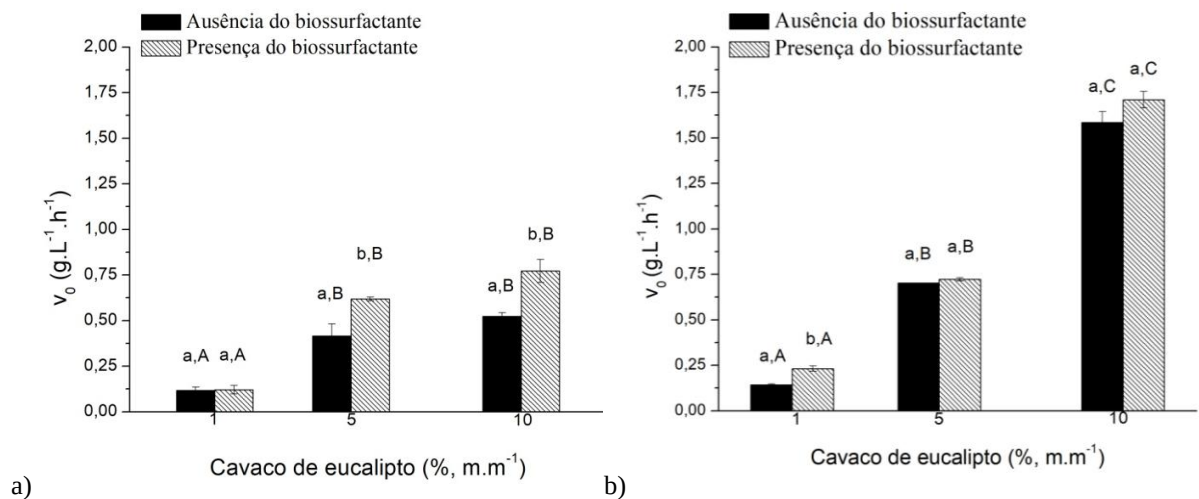


Figura 26: Velocidades iniciais da reação de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais de hidrólise na presença ou ausência do biossurfactante.

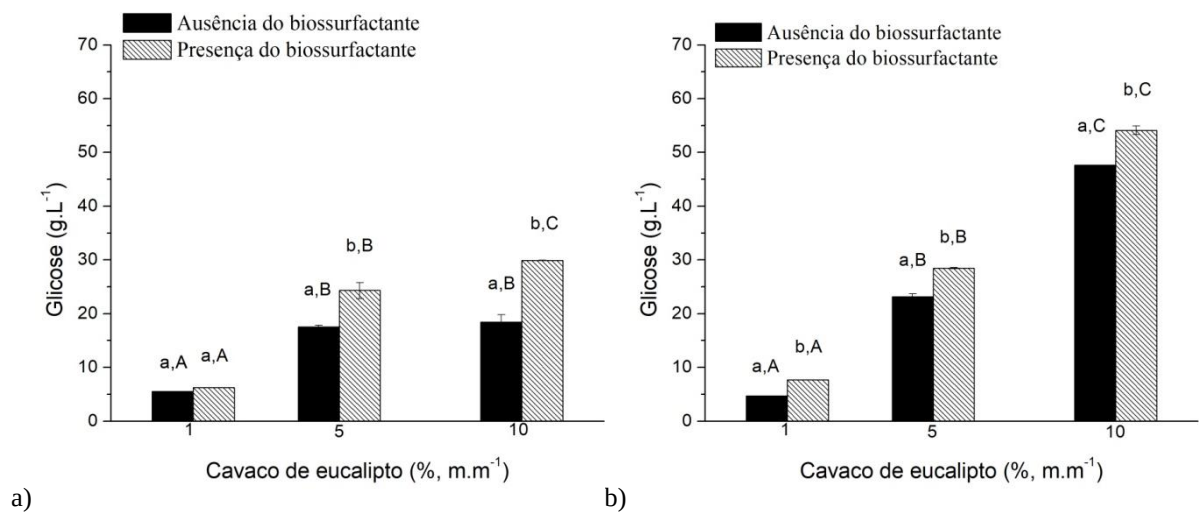


Figura 27: Concentrações de glicose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose de hidrólise na presença ou ausência do biossurfactante.

Observou-se que em todas as condições testadas, o perfil da concentração de glicose das hidrólises contendo os di-ramnolipídeos foi superior ao perfil de glicose do processo sem

o biossurfactante. Verificou-se também que em todas as condições, as concentrações de glicose aumentaram durante o período avaliado, apresentando os maiores valores com 72 h.

Nas hidrólises com 1% de cavaco e $14,4 \text{ FPU.g}^{-1}$ de carga enzimática, mesmo com o perfil das concentrações de glicose da condição com biossurfactante sendo superior ao perfil de glicose da condição sem surfactante, as velocidades iniciais de reação e as concentrações de glicose com 72 horas oriundas das duas condições não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que a adição de ramnolipídeos não impulsionou a produção de glicose na hidrólise enzimática nesta condição. Isto provavelmente ocorreu devido à baixa carga de substrato e enzima utilizada nesta condição. Segundo Nelson e Cox (2014), em baixas concentrações de substrato e enzima no processo, há uma dificuldade em ocorrer a interação enzima-substrato, pois os mesmos tendem a ficar dispersos no meio reacional, impedindo a adsorção e difusão das enzimas sobre o substrato sólido, onde, mesmo na presença de um indutor, a sacarificação pode não ser favorecida.

No processo com 5 e 10% a $14,4 \text{ FPU.g}^{-1}$, a presença do biossurfactante impulsionou as velocidades iniciais da hidrólise, proporcionando, com 72 horas, aumentos significativos nas concentrações de glicose. Inclusive as hidrólises a 5 e 10% contendo o biossurfactante apresentaram com 24 horas a mesma concentração de glicose que o processo com 5 e 10% na ausência surfactante com 72 horas, 17 e 19 g.L^{-1} , respectivamente. Isto ocorreu devido ao efeito estimulador dos ramnolipídeos sobre a hidrólise da celulose, onde estes biossurfactantes, provavelmente, reduziram as adsorções improdutivas das celulasas à lignina neste processo, elevando a taxa inicial de reação enzimática e acarretando em uma produção de glicose mais expressiva, em termos de velocidade.

Observou-se também no processo com $14,4 \text{ FPU.g}^{-1}$ que as concentrações de glicose da condição contendo 5% com biossurfactante foram maiores que a condição com 10% na ausência de tensoativos. No processo com alta quantidade de biomassa e baixa carga enzimática, a lignina facilmente adsorve as celulasas em sua superfície, impedindo que as mesmas se difundam até a celulose ou retornem ao meio reacional, inibindo, assim, a ação das enzimas na sacarificação da biomassa (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Segundo Ogeda e Petri (2010), em altas concentrações de substrato há uma maior formação de produtos, os quais, também dificultam a adsorção e difusão da enzima sobre o substrato sólido. Isto porque as enzimas se difundem através da estrutura do substrato até chegar aos centros ativos. Em seguida, o produto se difunde para o meio reacional, mas as moléculas de produto ainda presentes nos sítios de adsorção podem atuar como inibidoras do transporte de enzima para outros centros ativos, tendo como consequência a diminuição da eficiência da hidrólise

enzimática. Logo, estas adsorções podem ter ocorrido na hidrólise com 10% de cavaco e 14,4 FPU.g⁻¹ sem surfactante, acarretando em concentrações de glicose inferiores ao obtidos no processo com a biomassa a 5% e 14,4 FPU.g⁻¹ contendo os ramnolipídeos.

Entretanto, verificou-se que a hidrólise com 10% e 14,4 FPU.g⁻¹ contendo o biossurfactante demonstrou um perfil de glicose superior ao perfil de glicose da condição com 5% e 14,4 FPU.g⁻¹ com o biossurfactante. Logo, a presença dos ramnolipídeos na hidrólise enzimática com 10% e 14,4 FPU.g⁻¹, provavelmente, diminuiu tanto as adsorções improdutivas das celulasas a lignina como as adsorções dos produtos da hidrólise nos sítios ativos das enzimas, impulsionando a sacarificação enzimática da celulose.

Na hidrólise com 1% e 28,8 FPU.g⁻¹, a condição contendo o biossurfactante apresentou uma velocidade inicial de hidrólise maior que a velocidade da condição na ausência de biossurfactante, proporcionando, com 72 horas, um aumento na concentração de glicose de 64,4% que o processo sem surfactante,.

Nos processos com 5 e 10% a 28,8 FPU.g⁻¹, observou-se que as velocidades iniciais de hidrólise das condições com e sem surfactante não demonstraram diferenças significativas, apresentando, até as 48 horas, perfis de glicose equivalentes. Porém, com 72 horas, as condições com 5 e 10% contendo os ramnolipídeos apresentaram aumentos na concentração de glicose de 23,0 e 13,6% que as condições sem surfactante, respectivamente, os quais foram significativos. Este comportamento provavelmente ocorreu devido à influência do ramnolipídeos na estabilidade das celulasas. Segundo Lin et al. (2017) e Hong-Yuan et al., (2011) os surfactantes não iônicos possuem a capacidade de interagir com as enzimas, aumentando sua estabilidade, evitando sua desnaturação durante a hidrólise. Logo, além de prevenir as adsorções das celulasas à superfície da lignina e dos produtos da hidrólise no sítio ativo das enzimas, os ramnolipídeos, provavelmente, podem ter agido sobre as enzimas, estabilizando as mesmas e, conseqüentemente, mantendo sua atividade na hidrólise no decorrer do tempo, acarretando com 72 horas, em um aumento na produção de glicose.

Verificou-se também que, nas condições com e sem o biossurfactante, ao aumentar a carga de substrato, como era de se esperar, ocorreu um aumento significativo nos valores das velocidades iniciais das hidrólises e das concentrações de glicose com 72 horas, exceto para as condições a 14,4 FPU.g⁻¹ sem surfactante, onde, mesmo aumentando a carga de substrato de 5 a 10%, as respostas das velocidades iniciais e concentrações de glicose com 72 h foram similares. Dessa forma, no processo com a carga enzimática a 14,4 FPU.g⁻¹ na ausência de biossurfactante, o aumento na carga de biomassa para 10%, não resultou em um aumento na produção de glicose. Entretanto, nas hidrólises com 14,4 FPU.g⁻¹ na presença de

ramnolipídeos e com $28,8 \text{ FPU.g}^{-1}$, com e sem biossurfactante, o incremento na carga de sólidos proporcionou uma maior obtenção de glicose. Embora a hidrólise com alta carga de sólidos seja economicamente viável devido à geração de um caldo com elevada concentração de açúcares fermentescíveis, a alta consistência de biomassa pode trazer problemas relacionados à inibição das enzimas, diminuindo sua atividade catalítica, acarretando em uma menor conversão de celulose e em perdas de matéria-prima (LIMA et al., 2013).

Na Figura 28 são apresentadas as conversões de celulose durante as hidrólises enzimáticas com e sem ramnolipídeos variando a carga de substrato a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) e a concentração enzimática a 14,4 (Figura 28a) e 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 28b).

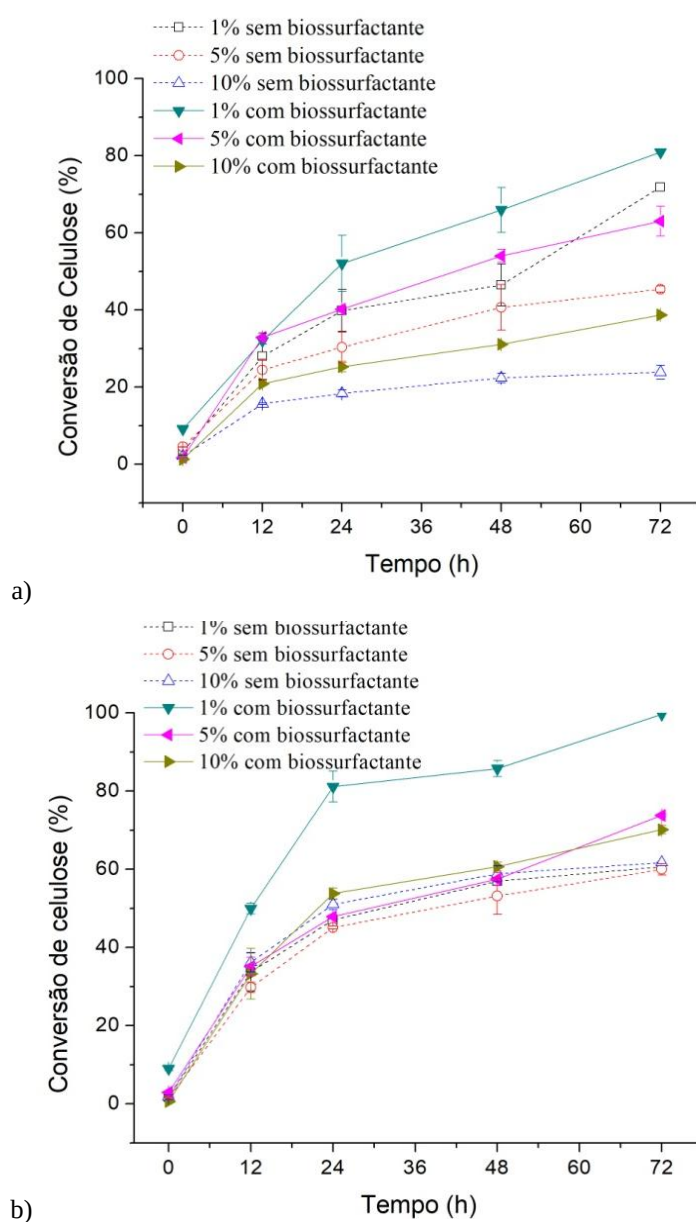


Figura 28: Conversões de celulose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos.

Na Figura 29 são demonstradas as conversões de celulose obtidas com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto para as condições com a carga enzimática a 14,4 (Figura 29a) e 28,8 FPU.g⁻¹ (Figura 29b).

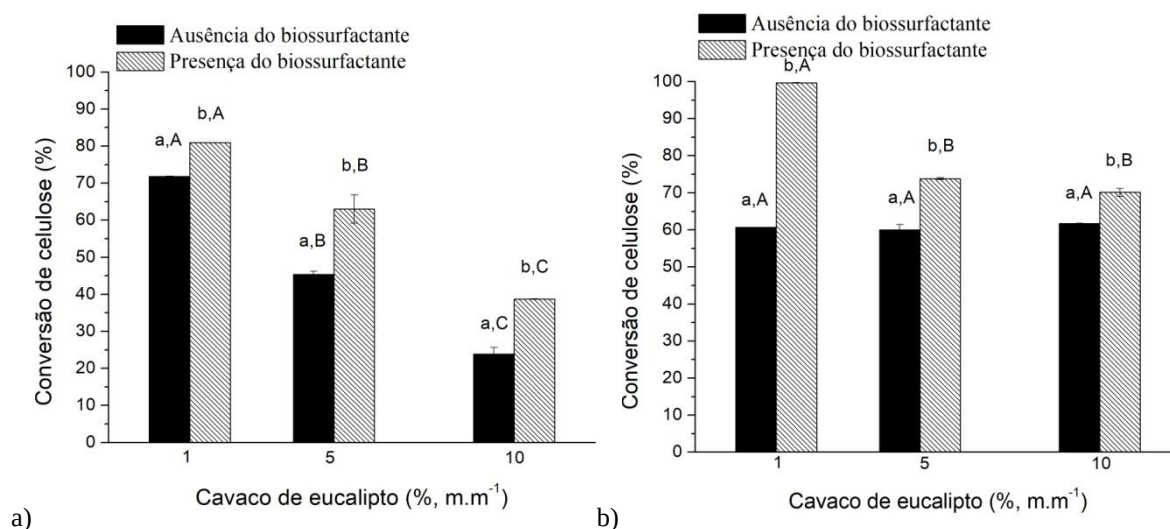


Figura 29: Conversão de celulose com 72 horas de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ (b) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose na presença ou ausência do biossurfactante.

Observou-se que em todas as condições testadas, o perfil da conversão de celulose das hidrólises contendo os di-ramnolipídeos foi superior ao perfil da conversão do processo sem o biossurfactante, e, como era de se esperar, em todas as condições, as conversões de celulose aumentaram durante o período avaliado, apresentando os maiores valores com 72 horas.

Nas hidrólises com 1% de cavaco e 14,4 FPU.g⁻¹, a condição com biossurfactante apresentou um perfil de conversões de celulose superior ao perfil de conversão da condição sem surfactante, demonstrando com 72 horas, um aumento na conversão de celulose de 12,6%, o qual foi significativo. Logo, mesmo com as condições com e sem biossurfactante apresentando concentrações de glicose semelhantes, a adição dos ramnolipídeos influenciou positivamente a sacarificação enzimática do cavaco de eucalipto a 1% e 14,4 FPU.g⁻¹.

No processo com 5% e 14,4 FPU.g⁻¹, aos ramnolipídeos impulsionaram a decomposição enzimática do eucalipto, atingindo valores de conversão de celulose acima de 60% e proporcionando, as 72 horas, um aumento na conversão de celulose de 38,8% em relação a condição sem surfactante.

Nas hidrólises a 10% e 14,4 FPU.g⁻¹, foi verificado que os ramnolipídeos melhoraram a sacarificação enzimática do cavaco, apresentando com 72 horas uma diferença na conversão de celulose de 62,2%. Entretanto, os valores da conversão de celulose desta condição, mesmo na presença dos ramnolipídeos, foram menores que 40%, evidenciando que altas concentrações de biomassa e baixas cargas enzimáticas, facilitaram as adsorções improdutivas das celulasas à lignina como as adsorções dos produtos da hidrólise nos sítios ativos das enzimas, não sendo favoráveis para a hidrólise enzimática do eucalipto.

Em relação à hidrólise com 1% e 28,8 FPU.g⁻¹, observou-se, nas primeiras 24 horas, que a condição contendo o biossurfactante apresentou uma elevada taxa na decomposição de celulose, em termos de velocidade, alcançando, com 24 horas, uma conversão de celulose de 81,15±3,98%, enquanto que neste mesmo momento, a condição sem surfactante apresentou o valor da conversão de celulose menor que 50%. Nesta mesma condição, com 72 horas de hidrólise, os ramnolipídeos proporcionaram uma conversão de celulose de 99,68±0,05%, a qual foi 64,4% maior que a conversão da condição sem surfactante. Logo, nesta condição, os ramnolipídeos impulsionaram a sacarificação enzimática do eucalipto, proporcionando uma conversão de celulose mais expressiva, em termos de velocidade.

No processo com 5 e 10% e 28,8 FPU.g⁻¹, devido à equivalência nas velocidades iniciais da hidrólise, as condições com e sem surfactante apresentaram taxas de decomposição enzimática semelhantes nas primeiras 48 horas. Entretanto, devido principalmente ao efeito dos ramnolipídeos em estabilizar as enzimas, mantendo sua atividade catalítica no decorrer do tempo, com 72 horas de hidrólise, as condições a 5 e 10% e 28,8 FPU.g⁻¹ contendo o biossurfactante demonstraram aumentos significativos na conversão de celulose que estas condições sem surfactante, com conversões de celulose acima de 60%.

Observou-se também que, nas hidrólises a 14,4 FPU.g⁻¹, com e sem o biossurfactante, ao aumentar a carga de substrato, ocorreu uma diminuição significativa nas conversões de celulose. Entretanto, na sacarificação com 28,8 FPU.g⁻¹ com os ramnolipídeos, ao elevar a carga de eucalipto de 1 para 5%, ocorreu uma redução na conversão de celulose de 25,9%, enquanto que de 5 para 10% de biomassa, houve uma estabilização na conversão de celulose. Na hidrólise com 28,8 FPU.g⁻¹ na ausência de surfactante, as condições com 1, 5 e 10%, não demonstraram diferenças significativas entre suas conversões de celulose. Segundo Ogeda e Petri (2010), geralmente é esperado obter uma diminuição ou uma estabilização na conversão de celulose com o aumento da carga de sólidos para uma quantidade fixa de enzima, devido à saturação dos sítios ativos das enzimas no meio reacional e pela liberação de uma maior quantidade de produtos com caráter inibidor da atividade enzimática. Logo, nas hidrólises

com 14,4 e 28,8 FPU.g⁻¹, o incremento na carga de biomassa, mesmo proporcionando um aumento significativo na produção de glicose, não resultou em uma maior conversão de celulose, influenciando negativamente na taxa de conversão de celulose.

Na Figura 30 são apresentadas as conversões de celulose com 72 horas nas hidrólises enzimáticas a 14,4 e 28,8 FPU.g⁻¹ com carga de biomassa a 1% (Figura 30a), 5% (Figura 30b) e 10% (Figura 30c).

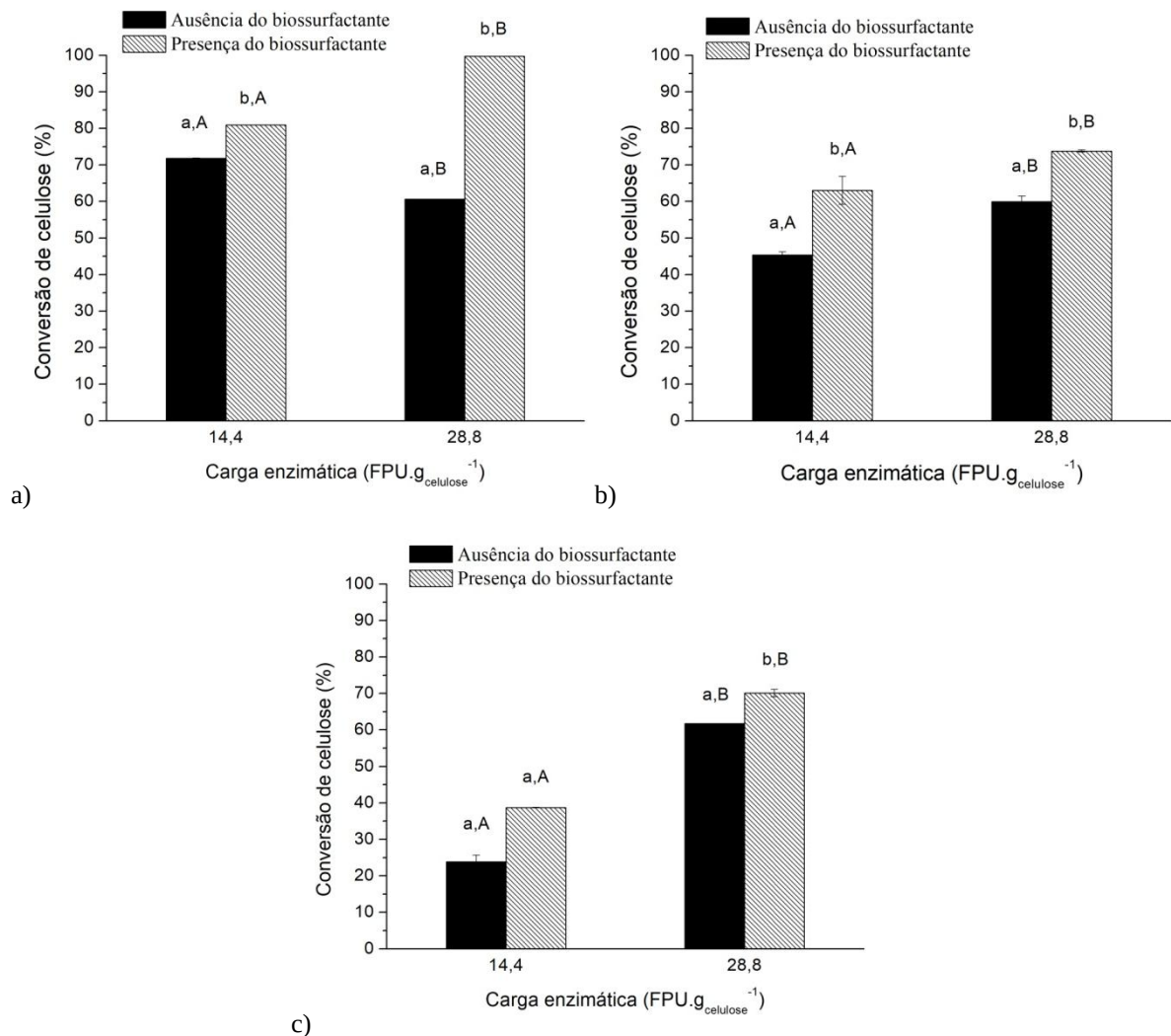


Figura 30: Conversão de celulose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ e carga de sólidos a 1 (a), 5 (b) e 10% (m.m⁻¹) (c) na presença e ausência dos ramnolipídeos. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga enzimática; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose na presença ou ausência do biossurfactante.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que em todas as condições em estudo, ao dobrar a carga enzimática de 14,4 para 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹, ocorreu um aumento na conversão

de celulose, exceto para condição com 1% sem surfactante, onde houve uma redução na conversão de celulose de 15,6%. Segundo Castro e Perreira Jr. (2010), quanto maior a carga de enzima aplicada na reação, maior é a taxa de conversão de celulose, porém, a relação entre a concentração das enzimas e a eficiência da hidrólise não é necessariamente linear, pois, o incremento na carga de enzimas pode promover a liberação em maior escala de produtos de caráter inibidor da atividade das celulasas, os quais podem diminuir a eficiência da sacarificação enzimática. Logo, este fator pode ter ocorrido na condição com 1% sem surfactante, fazendo com que o aumento da carga enzimática de 14,4 para 28,8 FPU.g⁻¹ não resultasse em uma maior sacarificação da celulose. Entretanto, nas demais condições, independentemente da presença de ramnolipídeos, o incremento da carga enzimática acarretou em uma maior taxa de conversão de celulose, elevando a eficiência da sacarificação enzimática.

Em geral, foi possível verificar a influência positiva dos di-ramnolipídeos na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor em diferentes concentrações de biomassa e cargas enzimáticas, demonstrando ser um potencial indutor da hidrólise do eucalipto, proporcionando, assim, um processo economicamente mais viável, visto que foi possível elevar a conversão da celulose sem aumentar a carga de enzimas.

Segundo Lin et al. (2017) e Hong-Yuan et al., (2011), durante a hidrólise enzimática da celulose, os surfactantes não-iônicos podem reduzir as adsorções improdutivas das enzimas a lignina, interagindo hidrofobicamente com a superfície desta, liberando para o meio reacional as enzimas não especificamente ligadas à lignina. Além disto, este efeito indutor dos surfactantes também ocorre devido: aos surfactantes aumentarem a estabilidade da enzima, evitando sua desnaturação durante a hidrólise; e aos agentes tensoativos afetarem a estrutura do substrato e torná-lo mais acessível para hidrólise enzimática. Logo, esses mecanismos provavelmente ocorreram durante a hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto ao se utilizar os ramnolipídeos, fazendo com que este biossurfactante apresentasse melhor desempenho na conversão celulósica do eucalipto que o processo na ausência de surfactantes.

Pode-se observar também que o eucalipto, independente da presença dos ramnolipídeos, demonstrou ser um potencial substrato nas hidrólises enzimáticas, indicando ser um recurso lignocelulósico viável para geração de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, etanol de segunda geração.

4.8 HIDRÓLISES DO EUCALIPTO COM OS RAMNOLIPÍDEOS E O TRITON X-100

Nesta etapa foi verificada a influência dos di-ramnolipídeos na hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor em comparação com o surfactante sintético Triton X-100.

Na Figura 31 são apresentadas as concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas com o Triton X-100 variando a carga de substrato a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) e a concentração enzimática a 14,4 e 28,8 FPU.g^{-1} .

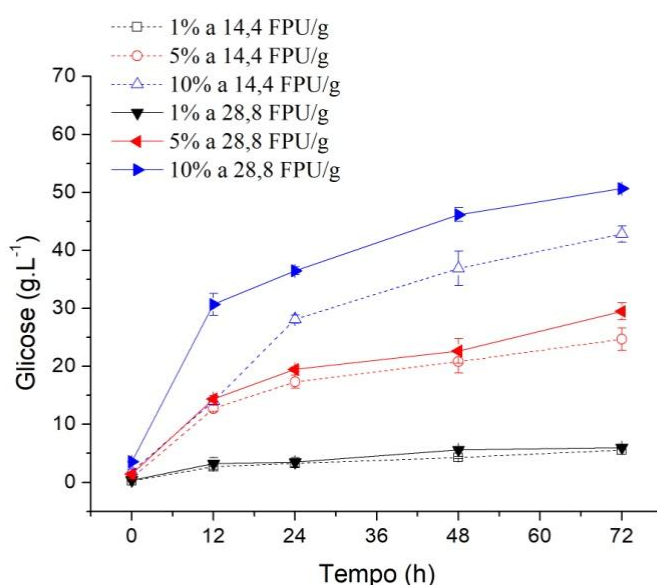


Figura 31 - Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ com o Triton X-100.

Na Figura 32 são demonstradas as velocidades iniciais da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto com a carga enzimática a 14,4 (Figura 32a) e 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 32b) para as condições com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Na Figura 33 são apresentadas as concentrações de glicose obtidas com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto para estas condições com a carga enzimática a 14,4 (Figura 33a) e 28,8 FPU.g^{-1} (Figura 33b).

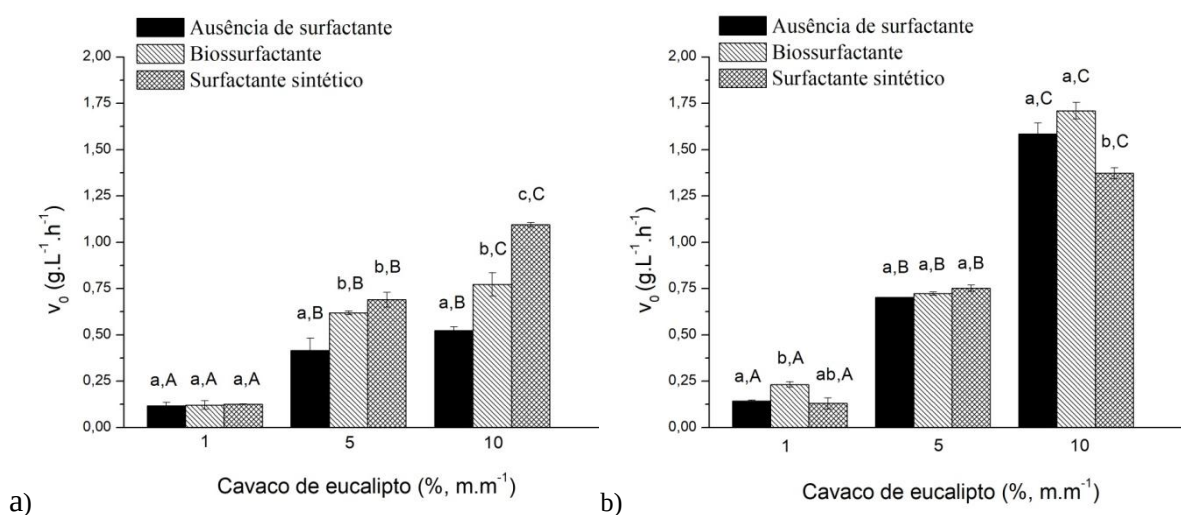


Figura 32 - Velocidades iniciais da reação de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as velocidades iniciais de cada grupo.

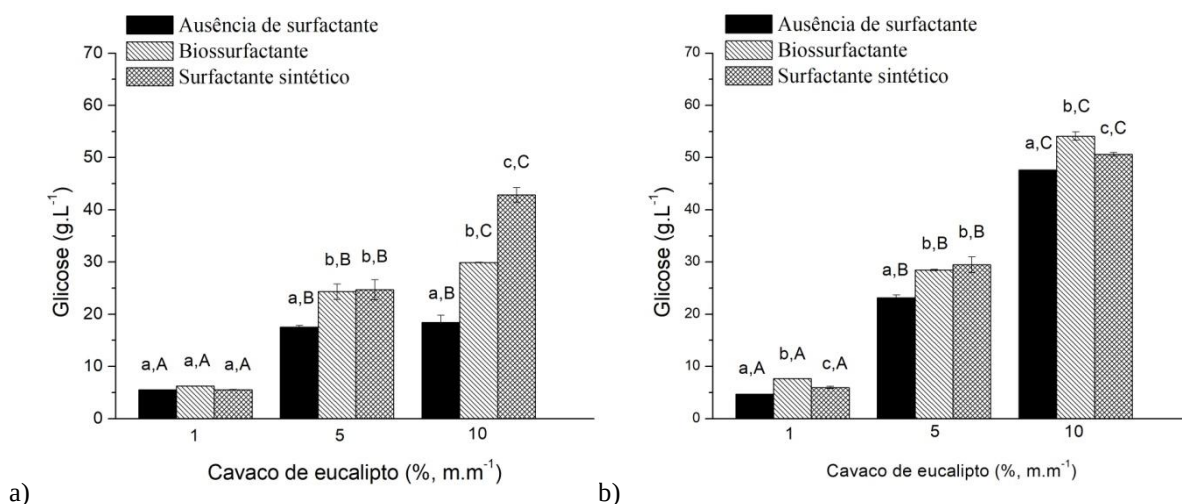


Figura 33 - Concentrações de glicose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de glicose com 72 horas de cada grupo.

Observou-se que em todas as condições testadas, as concentrações de glicose aumentaram durante o período avaliado, obtendo os maiores valores com 72 horas.

Comparando os resultados da Figura 31 com os dados obtidos na Figura 25, verificou-se que em todas as condições, os perfis da concentração de glicose das hidrólises contendo os di-ramnolipídeos foram iguais ou superiores aos perfis de glicose do processo com o Triton X-100, exceto para a condição com 14,4 FPU.g⁻¹ e 10%, onde a condição com surfactante sintético apresentou concentrações de glicose maiores que a condição com biossurfactante. Observou-se também que as concentrações de glicose contendo os agentes tensoativos foram maiores que as concentrações deste açúcar da condição na ausência de surfactantes.

Em relação ao processo com 1% de cavaco e 14,4 FPU.g⁻¹ de carga enzimática, observou-se que os perfis de glicose das condições com o surfactante sintético, o biossurfactante e sem surfactantes foram equivalentes, acarretando em velocidades iniciais e concentrações de glicose com 72 horas sem diferenças significativas.

Na hidrólise com 5% e 14,4 FPU.g⁻¹, as concentrações de glicose das condições com o surfactante sintético e o biossurfactante foram semelhantes no decorrer do tempo, acarretando em velocidades iniciais e concentrações de glicose com 72 horas equivalentes. Entretanto, no processo com 10%, o perfil de glicose da condição com o Triton X-100 foi superior ao perfil de glicose da condição contendo os ramnolipídeos, resultando, com 72 horas, em um aumento na concentração de glicose de 43,4%. Porém, os agentes surfactantes, nestas duas condições, demonstraram perfis de glicose superiores aos perfis de glicose obtidos na ausência de surfactante.

Quanto ao processo com 1% e 28,8 FPU.g⁻¹, as concentrações de glicose da condição contendo os ramnolipídeos foram maiores que as concentrações da condição com o surfactante sintético, porém, o perfil da concentração de glicose do Triton X-100 neste processo foi superior ao perfil de glicose da condição sem surfactante.

Na hidrólise com 5% e 28,8 FPU.g⁻¹, as concentrações de glicose da condição com o surfactante sintético e o biossurfactante apresentaram perfis similares, demonstrando o mesmo desempenho na produção de glicose. Observou-se também que, mesmo apresentando velocidades iniciais equivalentes à velocidade da condição na ausência de surfactante, os agentes tensoativos no processo a 5% e 28,8 FPU.g⁻¹, proporcionaram aumentos significativos nas concentrações de glicose com 72 horas que a condição sem surfactante.

No processo com 10% e 28,8 FPU.g⁻¹, a condição com o biossurfactante proporcionou um perfil de glicose superior ao perfil de glicose da condição com o surfactante sintético, acarretando, com 72 horas, um aumento na concentração de glicose de 13,6%. Entretanto, a condição com 10% e 28,8 FPU.g⁻¹ contendo o surfactante sintético demonstrou concentrações de glicose maiores que esta condição sem surfactante, indicando que o Triton X-100, nesta

condição, impulsionou a sacarificação enzimática do cavaco de eucalipto, entretanto com uma influência menor na hidrólise que os ramnolipídeos.

Foi observado nas condições com o surfactante sintético que ao aumentar a carga de substrato, ocorreram aumentos significativos nos valores das velocidades iniciais das hidrólises e das concentrações de glicose com 72 horas, comportamento este também apresentado pelo biosurfactante. Logo, no processo com 14,4 e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹, na presença de um agente surfactante, o aumento na carga de biomassa para 10% proporcionou uma maior produção de glicose. Entretanto, como dito anteriormente, a hidrólise enzimática com alta consistência de biomassa resulta em uma elevada geração de glicose, porém, pode acarretar em uma menor conversão de celulose e em perdas de matéria-prima.

Na Figura 34 são apresentadas as conversões de celulose durante as hidrólises enzimáticas com o Triton X-100 variando a carga de substrato a 1, 5 e 10% (m.m⁻¹) e a concentração enzimática a 14,4 e 28,8 FPU.g⁻¹.

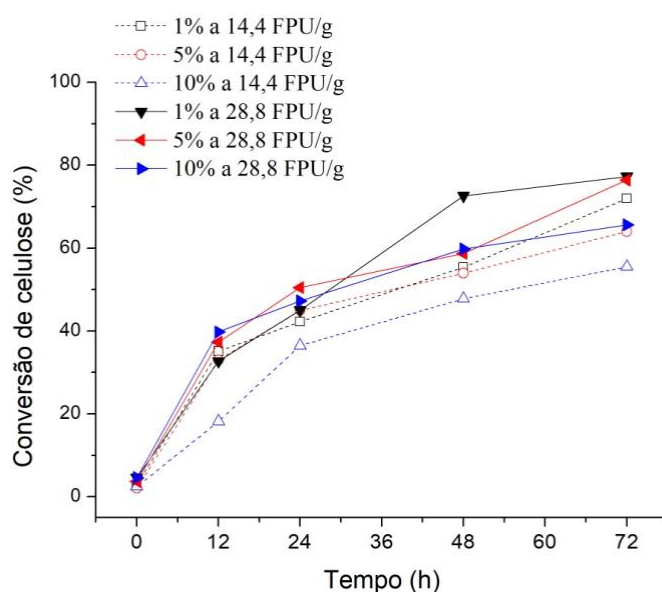


Figura 34 - Conversões de celulose das hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m⁻¹) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ com o Triton X-100.

Na Figura 35 são apresentadas as conversões de celulose obtidas com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto para as condições com a carga enzimática a 14,4 (Figura 35a) e 28,8 FPU.g⁻¹ (Figura 35b).

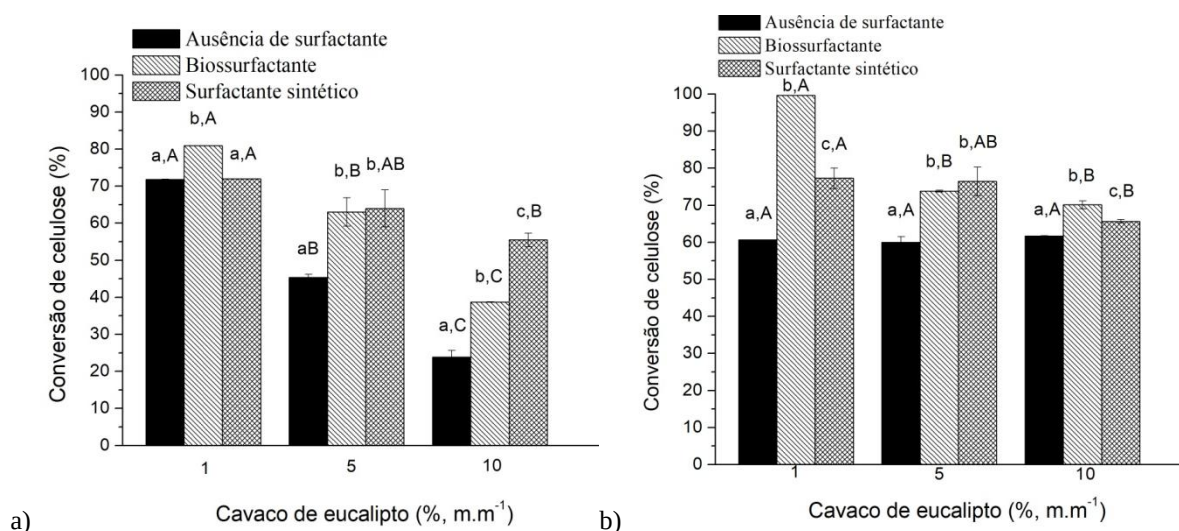


Figura 35 - Conversão de celulose com 72 horas de hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto a 1, 5 e 10% (m.m^{-1}) utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 (a) e 28,8 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$ (b) com o Triton X-100, os ramnolipídeos e na ausência de surfactante. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga de substrato; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose de cada grupo.

Comparando os resultados da Figura 34 com os dados obtidos na Figura 28, no que se refere ao processo com 1% de biomassa e 14,4 FPU.g^{-1} de carga enzimática, mesmo apresentando concentrações de glicose equivalentes, o perfil das conversões de celulose na presença do di-ramnolipídeo foi maior que o perfil das conversões contendo o Triton X-100, proporcionando um aumento na conversão de celulose com 72 horas de 14,4% que o surfactante sintético.

Observou-se também que na condição com 1% e 14,4 FPU.g^{-1} , o perfil da conversão de celulose do surfactante sintético e do processo na ausência de surfactante foram semelhantes, não demonstrando diferenças significativas nas conversões de celulose com 72 horas. Logo, o Triton X-100 não influenciou a hidrólise enzimática do eucalipto a 1% e 14,4 FPU.g^{-1} , enquanto que os ramnolipídeos, nesta condição, promoveram a sacarificação enzimática do eucalipto.

Na hidrólise com 5% e 14,4 FPU.g^{-1} , as condições com os agentes surfactantes apresentaram o mesmo perfil de conversão de celulose, alcançando conversões de celulose acima de 60%, e, consequentemente, demonstrando conversões de celulose superiores às conversões da condição sem surfactante.

Na hidrólise com 10% e 14,4 FPU.g^{-1} , o surfactante sintético demonstrou um melhor desempenho que os ramnolipídeos na decomposição enzimática da celulose, porém, os

valores da conversão de celulose obtidos por estas condições foram menores que 60%, evidenciando que processos com altas concentrações de biomassa e baixas cargas enzimáticas, mesmo contendo agentes surfactantes, não são favoráveis para a hidrólise enzimática do eucalipto.

Em relação ao processo com 28,8 FPU.g⁻¹, na hidrólise com 1%, os ramnolipídeos proporcionaram um melhor desempenho na decomposição enzimática do cavaco que o Triton X-100, alcançando, com 72 horas, um aumento na conversão de celulose de 29,0%. Entretanto, neste mesmo processo, o surfactante apresentando conversões de celulose maiores que a condição na ausência de surfactante.

No processo com 5 e 10%, devido à equivalência nas concentrações de glicose, o surfactante sintético e o biosurfactante demonstraram a mesma eficiência na sacarificação enzimática do eucalipto, com conversões de celulose acima de 65%, e consequentemente, conversões de celulose maiores que a condição na ausência de surfactante.

Observou-se também que, independentemente na presença de surfactantes, nas hidrólises a 14,4 FPU.g⁻¹, ao aumentar a carga de substrato, ocorreu uma diminuição nas conversões de celulose, enquanto que no processo a 28,8 FPU.g⁻¹, as condições com 5 e 10% não demonstraram diferenças significativas entre suas conversões de celulose. Logo, na hidrólise com 14,4 e 28,8 FPU.g⁻¹, com agentes surfactantes, o aumento na carga de eucalipto, mesmo elevando a produção de glicose, não acarretou em uma maior conversão de celulose, influenciando negativamente na taxa de conversão de celulose, e, consequentemente na eficiência da sacarificação enzimática.

Na Figura 36 são demonstradas as conversões de celulose com 72 horas nas hidrólises enzimáticas do cavaco de eucalipto a 14,4 e 28,8 FPU.g⁻¹ com carga de sólidos a 1% (Figura 36a), 5% (Figura 36b) e 10% (m.m⁻¹) (Figura 36c).

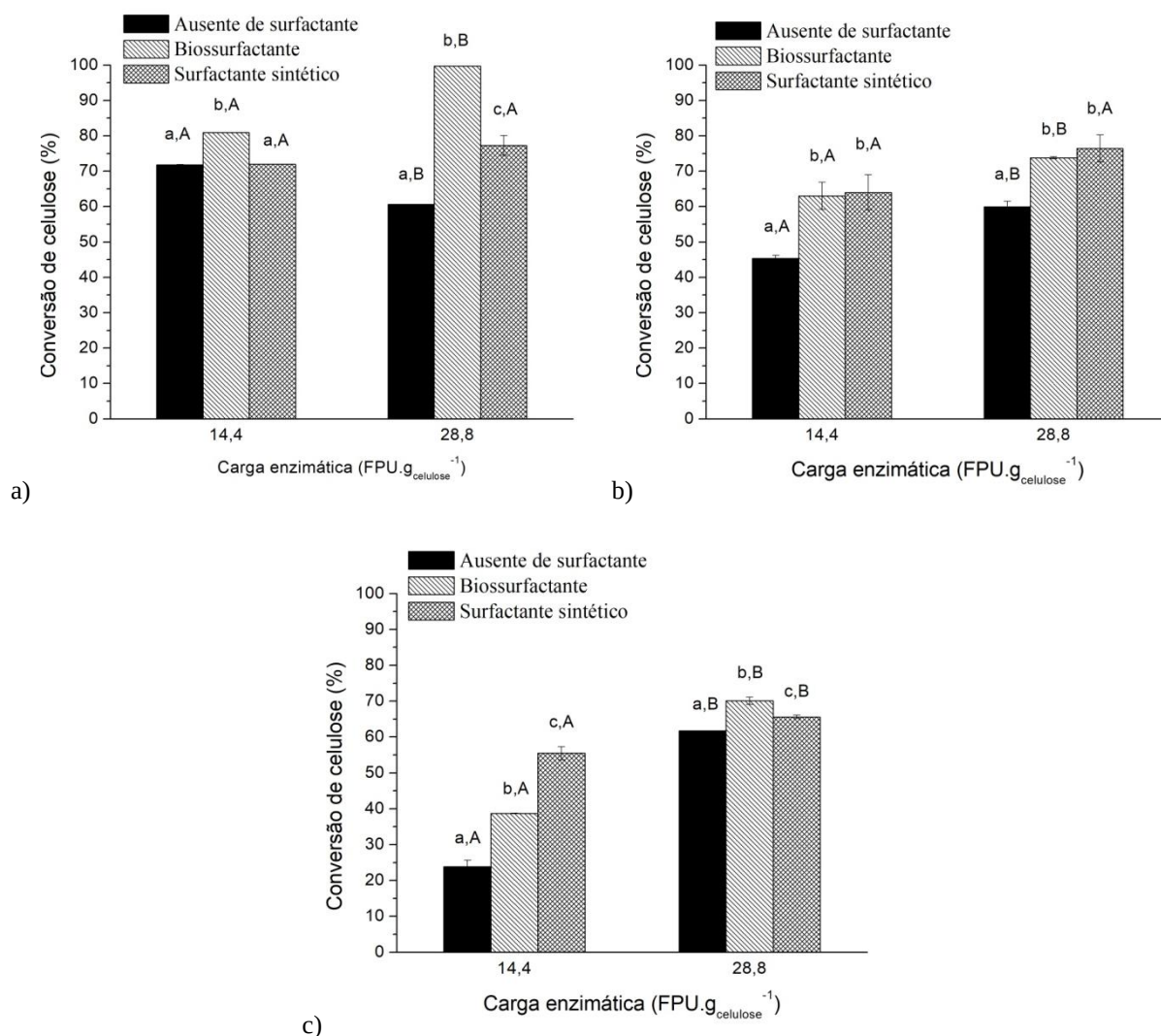


Figura 36 - Conversão de celulose com 72 horas da hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto utilizando a Cellic® CTec1 a 14,4 e 28,8 FPU.g_{celulose}⁻¹ e carga de sólidos a 1 (a), 5 (b) e 10% (m.m⁻¹) (c) com os ramnolipídeos e o Triton X-100. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose para cada carga enzimática; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as conversões de celulose de cada grupo.

Em relação as hidrólise com o surfactante sintético, nas condições com 1 e 5%, o incremento da carga de enzimas não promoveu a conversão de celulose, enquanto que na hidrólise a 10%, ao dobrar a carga enzimática de 14,4 para 28,8 FPU.g⁻¹, ocorreu um aumento na conversão de celulose de 18,21%. Logo, ao elevar a carga enzimática no processo com 1 e 5% de eucalipto na presença do surfactante químico, os fatores como a competição pelo substrato, a adsorção inespecífica e a liberação em maior escala de produtos de caráter inibidor das enzimas interferiram na atividade das celulasas, não promovendo a decomposição enzimática do eucalipto. Entretanto, na condição com 10% com o Triton X-100, o aumento da

carga enzimática acarretou em uma maior taxa de conversão de celulose, proporcionando uma maior eficiência da sacarificação enzimática. Entretanto, como dito anteriormente, o aumento da carga enzimática de 14,4 para 28,8 FPU.g⁻¹ com e sem ramnolipídeos acarretou em uma maior taxa de conversão de celulose, elevando a eficiência da sacarificação enzimática do cavaco de eucalipto, exceto para a condição com 1% e 14,4 FPU.g⁻¹ na ausência de surfactante.

Em geral, observou-se que a adição do Triton X-100 e dos di-ramnolipídeos impulsionaram a hidrólise enzimática do cavaco eucalipto do cavaco de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, evidenciando que os agentes surfactantes promoveram uma influência positiva sobre a sacarificação enzimática da celulose do eucalipto. Entretanto, os di-ramnolipídeos apresentaram uma eficiência igual ou superior na hidrólise enzimática do eucalipto que o Triton X-100, demonstrando ser um potencial substituto deste surfactante sintético na sacarificação enzimática do cavaco de eucalipto, proporcionando um processo com menor impacto ambiental.

Na Tabela 11, são apresentadas as conversões de celulose das sacarificações enzimáticas do cavaco de eucalipto com e sem tensoativos obtidas no presente estudo.

Tabela 11 - Conversões de celulose das hidrólises enzimáticas do *Eucalyptus grandis*.

Carga enzimática (FPU.g⁻¹)	Carga de biomassa (%, m.m⁻¹)	Tensoativo	Conversão de celulose (%)
14,4	1	Ausente de tensoativos	72
14,4	5	Ausente de tensoativos	45
14,4	10	Ausente de tensoativos	24
14,4	1	Ramnolipídeos	81
14,4	5	Ramnolipídeos	63
14,4	10	Ramnolipídeos	39
14,4	1	Triton X-100	72
14,4	5	Triton X-100	64
14,4	10	Triton X-100	55
28,8	1	Ausente de tensoativos	61
28,8	5	Ausente de tensoativos	60
28,8	10	Ausente de tensoativos	62
28,8	1	Ramnolipídeos	99
28,8	5	Ramnolipídeos	74
28,8	10	Ramnolipídeos	70
28,8	1	Triton X-100	77
28,8	5	Triton X-100	76
28,8	10	Triton X-100	65

Na hidrólise com 1%, observou-se que a condição com 14,4 FPU.g⁻¹ contendo os ramnolipídeos obteve uma conversão de celulose 32,8% maior que a condição com o dobro de

carga enzimática na ausência de surfactante. Na hidrólise com 5%, a diferença das conversões de celulose destas condições foi de apenas 5,0%. Estes mesmas relações foram observadas entre a condição com 14,4 FPU.g⁻¹ com o surfactante Triton X-100 e o processo com o dobro de carga enzimática sem tensoativos, nas hidrólises com 1 e 5% de biomassa. Logo, nas sacarificações a 1 e 5% (m.m⁻¹), com adição de surfactantes, foi possível obter conversões de celulose acima de 60% sem a necessidade de duplicar a carga de enzimas.

Na hidrólise com 10%, a hidrólise com maior carga enzimática e sem surfactante apresentou uma maior conversão de celulose que a condição com 14,4 FPU.g⁻¹ contendo tanto os ramnolipídeos quanto o Triton X-100. Isto ocorreu, provavelmente, devido à quantidade do agente surfactante usada nas hidrólises, 100 mg.L⁻¹, não ter sido suficiente para promover a sacarificação enzimática do eucalipto a 10% (m.m⁻¹).

Dessa forma, a adição de biossurfactantes ramnolipídicos pode proporcionar um processo economicamente mais viável, visto que, em determinadas condições, foi possível elevar a conversão da celulose sem dobrar a carga de enzimas. Porém, são necessários mais estudos de hidrólises enzimáticas com o cavaco de eucalipto variando a carga de biomassa e a concentração de biossurfactante.

Pode-se observar também que o eucalipto, independente da presença dos ramnolipídeos, demonstrou ser um potencial substrato nas hidrólises enzimáticas, indicando ser um recurso lignocelulósico viável para geração de açúcares fermentescíveis e, consequentemente, etanol de segunda geração.

4.9 COMPARATIVOS COM HIDRÓLISES DE EUCALIPTO DESLIGNIFICADO

Biomassas lignificadas apresentam maior resistência à hidrólise enzimática, promovendo a perda de atividade por adsorção improdutiva das celulasas a superfície da lignina (OGEDA e PETRI, 2010). Logo, para aumentar o rendimento das hidrólises de biomassas lignocelulósicas, geralmente, a lignina precisa ser removida ou modificada através de soluções alcalinas (PALONEN et al., 2004; LINDER et al., 1995).

O cavaco de *Eucalyptus grandis* tratado por explosão a vapor apresentou uma composição química contendo 36,61±4,11% de lignina total. A sacarificação do eucalipto pré-tratado e lignificado contendo os di-ramnolipídeos resultou em conversões de celulose acima de 70%. Logo, foi realizada uma comparação dos dados obtidos no presente estudo, com os resultados de hidrólises enzimáticas com *Eucalyptus* pré-tratados e deslignificados, apresentados na Tabela 2.

Cebreiros et al. (2018) ao realizarem a hidrólise enzimática do *Eucalyptus grandis* pré-tratado e deslignificado a 16% (m.v⁻¹) e 25 FPU.g⁻¹ de enzimas, obtiveram uma conversão de celulose 32% maior que a conversão obtida com o eucalipto sem deslignificação. No presente trabalho, a hidrólise do eucalipto pré-tratado e sem deslignificação, para as cargas de substrato e de enzima de 10% (m.m⁻¹) e 28 FPU.g⁻¹, respectivamente, e com adição do biossurfactante apresentou conversão 13% maior que a conversão sem surfactante.

A hidrólise do *Eucalyptus globulus* pré-tratado e deslignificado com tratamento hidrotrópico por Mou e Wu (2016), a 20% (m.v⁻¹) e 50 FPU.g⁻¹, apresentou uma conversão de celulose 17,1% maior que a conversão obtida no presente trabalho da sacarificação do eucalipto com 10% e 28 FPU.g⁻¹ na presença dos di-ramnolipídeos.

Romaní et al (2014) submetendo *Eucalyptus globulus* pré-tratado e deslignificado a hidrólise enzimática a 25 % (m.m⁻¹) e 10,3 FPU.g⁻¹ de celulase e 51,5 IU.g⁻¹ de β -glicosidase, obtiveram uma conversão 40% menor que o resultado obtido no presente trabalho da hidrólise do eucalipto pré-tratado e lignificado a 10% e 28 FPU.g⁻¹ na presença dos di-ramnolipídeos.

Os estudos de Sun et al. (2014), Lima et al. (2013) e Park et al. (2012), ao realizarem a hidrólise enzimática do eucalipto deslignificado com carga de biomassa a 2, 5% (m.v⁻¹) e 5% (m.m⁻¹), e carga enzimática a 17, 25 e 30 FPU.g⁻¹, respectivamente, obtiveram conversões 10,8% menor que a conversão obtida no presente trabalho da sacarificação do eucalipto lignificado a 5% e 28 FPU.g⁻¹ contendo os di-ramnolipídeos.

Com base nestes comparativos, verificou-se que adição dos di-ramnolipídeos impulsionou a sacarificação enzimática do eucalipto não deslignificado, demonstrando um aumento na eficiência da hidrólise do eucalipto equivalente aos diferentes tratamentos de deslignificação utilizados atualmente, indicando que o seu uso pode ser uma alternativa a estes tratamentos. Todavia, são necessários mais estudos utilizando ramnolipídeos em hidrólises enzimáticas de biomassas com e sem deslignificação.

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que ambas as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC07 demonstraram eficiência similar em relação à produção dos ramnolipídeos, particularmente em termos de comportamento cinético e rendimento produtivo. Observou-se que a produção dos ramnolipídeos não esteve associada ao crescimento das *Pseudomonas aeruginosa*, comportando-se como metabólicos secundários. Notou-se que síntese dos ramnolipídeos ainda estava em ascensão, não atingindo a máxima concentração do biossurfactante nas condições deste estudo, indicando que um aumento do tempo do cultivo, provavelmente, poderá elevar a produção deste metabólito.

Observou-se que as linhagens TGC02 e TGC07 também podem ser utilizadas na síntese de piocianina, porém, é preciso uma investigação de sua produção.

Conclui-se também a boa atividade emulsificante dos ramnolipídeos produzidos pelas linhagens TGC02 e TGC07, proporcionando índices de emulsificação E24 entre 55 e 65%, indicando que estes biossurfactantes são bons agentes emulsificantes. Foi observado que a concentração dos biossurfactantes ramnolipídicos não apresenta uma relação proporcional com sua atividade emulsificante, porém as emulsões formadas tendem a permanecer estáveis com uma maior quantidade de biossurfactante no meio.

Através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, verificou-se que o ramnolipídeo produzido pela linhagem TGC07 foi um di-ramnolipídeo constituído por ramnosil-ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato.

Verificou-se que o uso de biossurfactantes ramnolipídicos aumentou a conversão de celulose de cavacos de eucalipto pré-tratados a vapor, revelando a influência positiva dos ramnolipídeos na hidrólise enzimática do eucalipto em diferentes concentrações de biomassa e cargas enzimáticas.

Foi possível observar que a adição do Triton X-100 e dos di-ramnolipídeos impulsionaram a hidrólise enzimática do cavaco de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, evidenciando que os agentes surfactantes promovem uma influência positiva sobre a sacarificação enzimática da celulose do eucalipto. Entretanto, os biossurfactantes ramnolipídicos apresentam eficiência similar ou superior na hidrólise de eucalipto que o Triton X-100, podendo ser uma alternativa como substituto deste surfactante sintético na hidrólise enzimática do eucalipto, proporcionando um processo com menor impacto ambiental.

Observou-se também a viabilidade no aproveitamento do eucalipto como substrato lignocelulósico para geração de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, etanol de segunda geração.

Verificou também que a adição dos di-ramnolipídeos na hidrólise enzimática do eucalipto pode proporcionar um processo economicamente mais viável, visto que, em determinadas condições, foi possível elevar a conversão da celulose sem dobrar a carga de enzimas. Entretanto, são necessários mais estudos de hidrólises enzimáticas com o eucalipto variando a carga de biomassa e a concentração de biossurfactante.

Concluiu-se que o uso de biossurfactantes ramnolipídicos na hidrólise enzimática do eucalipto pode ser uma alternativa aos tratamentos de deslignificação reportados na literatura, contribuindo, assim, para um processo com economia de tempo e com menos impactos ambientais. Porém, são necessários mais estudos utilizando este biossurfactante em hidrólises enzimáticas de biomassas com e sem a deslignificação. Entretanto, novos estudos são necessários utilizando ramnolipídeos na hidrólise enzimática de biomassas com e sem deslignificação.

REFERÊNCIAS

- ABYANEH, A. S.; FAZAELIPOORE, M. H. Evaluation of rhamnolipid (RL) as a biosurfactant for the removal of chromium from aqueous solutions by precipitate flotation. **Journal of Environmental Management**, v. 165, p.184-187, 2016.
- AGBOR, V. B. CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁRQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ARAÚJO, C. K. C. **Avaliação da influencia de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática da casca de coco verde após pré-tratamento acido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2016.
- ARAÚJO, C. K. C.; CAMPOS, A. O.; PADILHA, C. E. A.; JÚNIOR, F. C. S.; NASCIMENTO, R. J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Enhancing enzymatic hydrolysis of coconut husk through *Pseudomonas aeruginosa* AP 029/GLVIIA rhamnolipid preparation. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 20–26, 2017.
- ARAÚJO, J. C. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* AP029/GLVIIA usando glicose como substrato e aplicações**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2018.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BAI, L.; MCCLEMNETS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71-79, 2016.
- BANAT, P. I. M. **Les biosurfactants, plus que jamais sollicités**. Biofutur 198, Mars 2000.
- BANDIKARI, R.; POONDLA, V.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. **Biotechnology**, v. 4, p. 655–664, 2014.
- BARI, I.; LIUZZI, F.; VILLONE, A.; BRACCIO, G. Hydrolysis of concentrated suspensions of steam pretreated *Arundo donax*. **Applied Energy**, v. 102, p. 179-189, 2013.

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*. Pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. **Arkiv Chem Mineral Geol.**, v. 23, n.13, p. 1–12, 1946.

BETANCUR, G. J. V.; SILVA, N. L. C.; VASQUEZ, M. P.; GOMES, E. B.; PEREIRA, N. Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 928–936, 2011.

BEZERRA, K. G. O. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* e sua aplicação na hidrólise enzimática de material lignocelulósico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2017.

BEZERRA, M. S.; HOLNADA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de Biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, v.1, p. 14, 2012.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BOUCHARD, J.; NGUYEN, T. S.; CHORNET, E.; OVEREND, R. Analytical methodology for biomass pretreatment. **Solid residues Biomass**, v. 23, p. 243-261, 1990.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola Superior em Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, SP, 2011.

BRAGATTO, J. Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para produção de bioetanol. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola Superior em Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010: Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm> Acesso em: 02 de Novembro de 2018.

BRISTOW, J. A., KOLSETH, P. Paper, structure and properties. **M. Dekker**, New York, USA, 1986.

CAMPOS, A. O. **Avaliação do pré-tratamento alcalino na hidrólise enzimática dos resíduos da palha de carnaúba**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2017.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A., FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n.44, p.48-54, 2010.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, n. 99, p. 1869-1876. 2008.

CASCIATORI, P. A. **Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e Aplicação na Sacarificação do Bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Biociências, Universidade Estadual paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2015.

CASSOL, G. O. **Modelagem de pré-tratamentos e hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar visando à produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

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

CEBREIROS, F.; FERRARI, M. D.; LAREO, M. Combined autohydrolysis and alkali pretreatments for cellulose enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus grandis* Wood. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2018.

CHONH, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n.137, p. 1-12, 2017.

CLARKE, K. G.; BALLOT, F.; REID, S. J. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2179-2184, 2010.

COSTA, S. G. V. A. O. Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Rhamnolipídios e Polihidroxialcanoatos (PHAs). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2010.

CRUZ-JUNIOR, I. J. **Separação dos principais componentes do cavaco de eucalipto, hidrólise enzimática da celulose e caracterização das frações obtidas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2016.

DAMIÃO, A. O. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com rhamnolipídeos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2012.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbiology Mol. **Biological Reviews**, v. 61, p. 47, 1997.

DÉZIEL E, LÉPINE F, MILOT S, VILLEMUR R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1485, p. 145–152, 2000.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzymes. **Academic Press**, New York, EUA, 1979.

DORIA, E.; ALTOBELLI, E.; GIROMETTA, C.; NIELSEN, E.; ZHANG, T.; SAVINO, E. Evaluation of lignocellulolytic activities of ten fungal species able to degrade poplar Wood. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 94, p. 160 -166. 2014.

EMMEL, A. Caracterização do efeito da explosão a vapor sobre as propriedades físico-químicas da lignina de *Eucalyptus grandis*. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1999.

ESCORBAR, J. F. **A produção sustentável de biomassa florestal para energia no Brasil: o caso dos pellets de madeira**. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Energia e Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2016.

FARIAS, D. **Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo à vácuo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2014.

FCIENCIAS. **Triton X-100: Molécula da Semana**. Disponível em: <<https://www.fciencias.com/2016/04/14/triton-x-100-molecula-da-semana/>>. Acesso em: 21 de Março de 2019.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, p. 613, 1989.

FENG, Y.; JIANG, J.; ZHU, L.; YUE, L.; ZHANG, J.; HAN, S. Effects of tea saponin on glucan conversion and bonding behavior of cellulytic enzymes during enzymatic hydrolysis of corn cob residue with high lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-8, 2013.

FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. **Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol**. **Biomass**, v. 18, p. 31-42, 1989.

FREITAS, F.; ALVES V. D. ; CARVALHEIRA, M.; COSTA N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 549-556, 2009.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, no. 2, p. 257 - 268. 1987.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GLICK, R.; GILMOUR, C.; TREMBLAY, J.; SATANOWER, S. AVIDAN, O.; DÉZIEL, E.; GREENBERG, E. P.; POOLE, K.; BANIN, E. Increase in rhamnolipid synthesis under ironlimiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.192, p. 2973-2980, 2010.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; FREITAS, V.; et al. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 144–150, 2016.

HASSETT, D. J.; CHARNIGA, L.; BEAN, K.; OHMAN, D. E.; COHEN, M. S. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 328–336, 1992.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATKA, C. HAUSMANNC, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207–1219, 2012.

HONG-YUAN, W.; FAN, B. Q.; LI, C. H.; LIU, S.; LI, M. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hidrolisis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6515-6521, 2011.

HOU, J.; ZHANG, S.; QIU, Z.; HAN, H. Zhang, q. Stimulatory effect and adsorption behavior of rhamnolipids on lignocelluloses degradation system. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 465–472, 2017.

IBÁ- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Dados Estatísticos**. Disponível em: <<https://www.iba.org/dados-estatisticos>>. Acesso em: 21 de Novembro de 2018.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2017**. Rio de Janeiro, RJ, v. 32, p. 1-8, 2017.

KANG, S.W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153–156, 2004.

KLINKE, H. B., THOMSEN, A. B., AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10-26, 2004.

KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**, 3. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2005.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 31, 2009.

KRISTENSEN, J. B.; BÖRJESSON, J.; BRUUN, M. H.; TJERNELD, F.; JORGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 888–895, 2007.

LANÇAS, M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Rima: São Paulo, 2004.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p. 22–32, 1999.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735-764, 2012.

- LEE, D., YU, A. H. C., WONG, K. K. Y., et al. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, p. 407–415, 1994
- LI, J. H.; LI, S. Z.; FAN, C. Y.; YAN, Z. P. The mechanism of poly(ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 203–210, 2012.
- LIMA, M. A.; LAVORENTE, G. B.; DA SILVA, H. K.; BRAGATTO, J.; REZENDE, C. A.; BERNARDINELLI, O. D.; POLIKARPOV, I. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 75, 2013.
- LIN, X.; LOU, H.; QIU, X.; PANG, Y.; YANG, D. Effect of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide cationic surfactant on the enzymatic hydrolysis of Avicel and corn stover. **Cellulose**, v. 24, p. 669–676, 2017.
- LINDER, M.; MATTINEN, M.L.; KONTTELI, M.; LINDEBERG, G.; STÅHLBERG, J.; DRAKENBERG, T.; REINIKAINEN, T.; PETTERSSON, G.; ANNILA, A. et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Protein Science**, v. 4, p. 1056–1064, 1995.
- LINO, J. M. **Aperfeiçoamento da deslignificação com oxigênio e do branqueamento de polpa celulósica kraft de eucalipto para dissolução**. Dissertação (Profissional em Tecnologia de Celulose e Papel). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- LIU, J. WU, G; YANG, S; MU, B. Structural characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain FIN2 isolated from oil reservoir water. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 30:1473–1484, 2014.
- LONGUE-JUNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 3, p. 541-550, 2011.
- LOU, H. M.; LAI, H. R.; WU, S.; LI, X. L.; YANG, D. J.; QIU, X. Q.; HUANG, J. H.; YI, C. H. Enhancing enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose and lignocellulose by adding long-chain fatty alcohols. **Cellulose**, v. 21, p. 3361–3369, 2014.
- LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, p. 741–761, 1996.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p 588-565, 2012.
- MARTÍNEZ, J. D. A. **Modelagem cinética da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.
- MCINTOSH, S.; ZHANG, Z.; PALMER, J.; WONG, H.; DOHERTY, W. O. S.; VANCOR, T. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, p. 346–358, 2016.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel**, v. 133, p. 232-240, 2014.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals e biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MESQUITA, R. M. F. **Aproveitamento de casca de laranja e cavaco de madeira para a produção de celulase por *Aspergillus niger* utilizando fermentação em estado sólido. Trabalho de conclusão de curso.** Trabalho de conclusão de curso. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

MFRURAL. **Mercado Físico Rural.** Disponível em: <<https://www.mfrural.com.br/busca.aspx?palavras=cavaco+eucalipto>>. Acesso em 04 de Fevereiro de 2019.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestre em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemie**, n. 84, p. 499-510, 2002.

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

MONTEIRO, S. A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.** Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2007.

MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1–13, 2007.

MORAIS, R. K. S. **Produção de biosurfactantes a partir de substratos de baixo custo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., DRESCHER, R., et al. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production, **American Chemical Society Meeting**, New Orleans, v. 103, 2003.

MOU, H. Y.; WU, S. Comparison of organosolv and hydrotropic pretreatments of eucalyptus for enhancement of enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, n. 220, p. 637-640, 2016.

MOUSSA, A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of Di-Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN T. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867 – 880, 2014.

MUKHERJEE, A. K; DAS, K. Microbial Surfactants and their potential applications: an overview. **Biosurfactants**, Springer New York, p.54-64, 2010.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183–198, 2005.

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids - Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 366–380, 2012.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6 Edição, Artmed, 2014.

NICOLÒ, M.S.; FRANCO, D.; CAMARDA, V.; GULLACE, R.; RIZZO, G. M.; FRAGALÀ, M.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, A. F.; GUGLIELMINO, S, P. P. Integrated Microbial Process for Bioconversion of Crude Glycerol from Biodiesel into Biosurfactants and PHAs. **Chemical engineering transactions**, v. 38, 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quim. Nova**, V. 25, p. 772-776, 2002.

NONAKA, H.; KOBAYASHI, A.; FUNAOKA, M. Lignin isolated from steam-exploded eucalyptus wood chips by phase separation and its affinity to *Trichoderma reesei* cellulase. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 431– 434, 2013.

NREL, NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **Measurement of Cellulase Activities**. Laboratory Analytical Procedure, Colorado, EUA, 2008.

O'MALLEY, Y. Q.; RESZKA, K. J.; SPITZ, D. R.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 1, p. 94-103, 2004.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33 , n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHFUJI, K.; SATO, N.; HAMADA-SATO, N.; KOBAYASHI, T. Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 1237–1244, 2004.

OLIVEIRA, A. C. S. M. **Recuperação e Purificação de Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-GVIIA utilizando Melaço de Cana como substrato**. Tese (Doutora em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2010.

OLSSON, L; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme microbial technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

ONWOSI C. O.; ODIBO F. J. C. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 937-942, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J.C. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

OUYANG, J.; DONG, Z. W.; SONG, X. Y.; LEE, X.; CHEN, M.; YONG, Q. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. **Bioresource Technology**, v. 101 p. 6685–6691, 2010.

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65–72, 2004.

PARK, J.; KANG, M.; KIM, J. S.; LEE, J.; CHOI, W.; LEE, J. Enhancement of enzymatic digestibility of *Eucalyptus grandis* pretreated by NaOH catalyzed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 707-712, 2012.

PATEL, R. M; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters In Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1977.

PARTOVI, M.; LOTFABAD, T. B.; ROOSTAAZAD, R.; BAHMAEI, M.; TAYYEBI, S. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* MR01. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29 n. 6, p. 1039-1047, 2013.

PERFUMO, A., RUDDEN, M.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R.; STEVENSON, P. S.; PARRY, N. J.; BANAT, I. M. Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: implications for their biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7297-306, 2013.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e de palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação de (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

PRABU, R.; KUILA, A.; RAVISHANKAR, R.; RAO, P. V. C.; CHOUDARYA, N. V.; VELANKAR, H. R. Microbial rhamnolipid production in wheat straw hydrolysate supplemented with basic salts. **RSC Advances**, v. n. 64, p. 51642-51649, 2015.

PRIYAJA, P.; JAYESH, P.; CORREYA, N. S.; SREELAKSHMI, B., SUDHEER, N. S.; PHILIP, R.; BRIGHT, I. S. B. Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, p. 76–84, 2014.

PRIYAJA, P.; JAYESH, P.; PHILIP, R.; BRIGHT, I. S. B. Pyocyanin induced in vitro oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological applications. **Cytotechnology**, v. 68, p. 143-155, 2016.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using LowCost Raw Materials. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, P.; DUSANE, D.; ZINJARDE, S.; VENUGOPALAN, V.; MCLEAN, R.; WEBER, M. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 159–184, 2010.

RAZA, Z. A; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, p. 367–1373, 2009.

RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; RÍO, J.C. Lipid and lignin composition of woods from different eucalypt species. **Holzforschung**, v. 61, p. 165–174, 2007.

REYES, E. A. P.; BALE, M. J.; CANNON, W. H., MATSEN, J. M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocinin production on Tech Ágar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, p. 456-458, 1981.

RIKALOVIĆ, M. G.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; VRVIĆ, M. M.; KARADŽIĆ, I. J. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **Journal Serbian Chemical Society**, v. 77, p. 27–42, 2012.

RIVERA, E.C.; RABELO, S.C.; DOS REIS GARCIA, D.; FILHO, R.M.; DA COSTA, A.C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 85, p. 983–992. 2010.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871–874, 1989.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, C. M.; MORÁN, P.; LAGO, F.; ESPÍÑEIRA, M.; BECKMANN, M.; CONSUEGRA, S. Detection and quantification of tissue of origin in salmon and veal products using methylation sensitive AFLPs. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1493–1498, 2012.

ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; FRANCISCO, L.; JUAN, C. P. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5896-5904, 2011.

ROMANÍ, A.; RUIZ, H. A.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* wood at high-solid loadings. **Fuel**, v. 135, p. 482491, 2014.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTIAGO, L. F. F.; CARASCHI, J. C. **Processo de pré-hidrólise para madeira de *Eucalyptus urograndis***. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 16, Piracicaba, SP, 2008.

SANTOS, E. K. R.; ANDRADE, R. H. C.; GOUVEIA, E. R. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, p. 56-61, 2017.

SANTOS, L. A. **Propriedades e aplicações dos biossurfactantes**. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis, SP, 2012.

SANTOS, R.; CARASCHI, J. C. **Influência da pré-hidrólise na madeira de *Eucalyptus urograndis***. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 17, São Carlos, SP, 2009.

SARTO, C.; SANSIGOLO, C. A. Cinética da remoção dos extrativos da madeira de *Eucalyptus grandis* durante polpação Kraft. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 3, p. 227-235, 2010.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J.; FERRARIO, F.M.; NITA, V. The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts. **Environmental Development**, v.15, p. 3–34, 2015.

SCHULEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p.71-81, 1997.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.45, p.1823-1828, 1997.

SILVA, L. **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 12523-12542, 2014.

SILVA, S. N. R. L. **Glicerol como substrato para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, 2009.

SILVA, T. A. L.; LUNA, J. M.; FILHO, M. A. M.; TAMBOURGI, E. B.; CAMPOS TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, p. 19-26, 2010.

SILVA-JUNIOR, O. B.; FARIA, D. A.; GRATTAPAGLIA, D. A flexible multi-species genome-wide 60K SNP chip developed from pooled resequencing of 240 *Eucalyptus* tree genomes across 12 species. **New phytologist**, v.206, i.4, p:1527 -1540, 2015.

SILVEIRA, M. H. L.; AGUIAR, R. S.; SIIKA-AHO, M.; RAMOS, L. P. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 392–396, 2014.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de rhamnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v.37, p.431-441, 2014.

SUN, S. N.; CAO, X. F.; SUN, S. L.; XU, F.; SONG, X. L.; JONES, G. L. Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, p. 116, 2014.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p.1621-1651, 2008.

THAVASI, R.; NAMBARU, V. R. M. S.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 30–36, 2011.

TREDGET, E. E.; SHANKOWSKY, H. A.; RENNIE, R.; BURRELL, R. E., LOGSETTY, S. *Pseudomonas* infections in thermally injured patient, **Burns**, v. 30, p. 3-26, 2004.

TSORAEVA, A.; MARTÍNEZ. Comparison of two culture media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, p. 149-154, 2000.

TU, M.; SADDLER, J. N. Potential Enzyme Cost Reduction with the Addition of Surfactant during the Hydrolysis of Pretreated Softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161:274–287, 2010.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Core Flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 175–182, 2016.

VUKOMANOVIC, D. V.; ZOUTMAN, D. E.; STONE, J. A.; MARKS, G. S.; BRIEN, J. F.; NAKATSU, K. Electrospray mass-spectrometric, spectrophotometric and electrochemical methods do not provide evidence for the binding of nitric oxide by pyocyanine at pH 7. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 25–29, 1997.

WANG, H. Y.; FAN, B. Q.; LI, C. H.; LIU, S.; LI, M. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v.102, p. 6515– 6521, 2011.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99, p. 23-31, 2012.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p.146–154, 2005.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PAHcontaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**. v. 7, p. 415–423, 1997.

YU, Q.; ZHUANG, X.; WANG, Q.; QI, W.; TAN, X.; YUAN, Z. Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water. **Bioresource Technology**, v.116, p. 220–225, 2012.

YU, Z.; ZHANG, H. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, p. 257-262, 2003.

ZHANG, Q.; HE, G.; WANG, J.; CAI, W.; XU, Y. Mechanisms of the stimulatory effects of rhamnolipid biosurfactant on rice straw hydrolysis. **Applied Energy**, v.86, p.233–237, 2009.

ZHANG, Y.; LI, Q.; SU, J.; LIN, Y.; HUANG, Z.; LU, Y.; SUN, G.; YANG, M.; HUANG, A.; HU, H.; ZHU, Y. A green and efficient technology for the degradation of cellulosic materials: Structure changes and enhanced enzymatic hydrolysis of natural cellulose pretreated by synergistic interaction of mechanical activation and metal salt. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 176-181, 2015.

ZHAO, J.; WU, Y.; ALFRED, A. T.; XIN, X.; YANG, S. Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* M14808. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 177-182, 2013.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 136–143, 2015.

ZHU, K.; ROCK, C. Rhla converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3147-3154, 2008.

APÊNDICE A - DADOS OBTIDOS DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA E DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA COM OS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* TGC07

Tabela 12 - Massas das frações 1 a 41 recolhidas durante a cromatografia em coluna dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07 e seus respectivos fatores de retenção na cromatografia em camada delgada analítica.

Cromatografia em coluna					Cromatografia em camada delgada analítica			
Frações	MeOH:CHCl ₃ (v.v ⁻¹)	Massa do frasco vazio (mg)	Massa do Frasco com a amostra seca (mg)	Massa da amostra (mg)	MeOH:CHCl ₃ (v.v ⁻¹)	Distancia percorrida pela amostra (cm)	Distancia percorrida pela fase móvel (cm)	R _f
1	95:5	19432	19433	1	-	-	-	-
2		15832	15835	3	-	-	-	-
3		20896	20898	2	-	-	-	-
4		16473	16476	3	-	-	-	-
5		17100	17102	2	-	-	-	-
6		22151	22152	1	-	-	-	-
7		21504	21504	0	-	-	-	-
8	90:10	20731	20731	0	-	-	-	-
9		20857	20857	0	-	-	-	-
10		15749	15749	0	-	-	-	-
11		20642	20642	0	-	-	-	-
12		17110	17110	0	-	-	-	-
13		22103	22104	1	-	-	-	-
14		16338	16340	2	-	-	-	-
15		20921	20922	1	-	-	-	-
16		9818	9819	1	-	-	-	-
17		20302	20304	2	-	-	-	-
18		16618	16619	1	-	-	-	-
19		16378	16378	0	-	-	-	-
20		9783	9783	0	-	-	-	-
21		21306	21306	0	-	-	-	-
22		19823	19823	0	-	-	-	-
23		16204	16204	0	-	-	-	-
24		16157	16157	0	-	-	-	-
25		16515	16515	0	-	-	-	-
26		17105	17105	0	-	-	-	-
27	80:20	19745	19745	0	-	-	-	-
28		20826	20826	0	-	-	-	-
29		7453	7453	0	-	-	-	-
30		9669	9669	0	-	-	-	-
31		16536	16537	1	-	-	-	-
32		17060	17061	1	-	-	-	-
33		14400	14401	1	-	-	-	-
34		17814	17815	1	-	-	-	-
35		16187	16189	2	-	-	-	-
36		7550	7550	0	-	-	-	-
37		14278	14278	0	-	-	-	-
38		7342	7343	1	20:80	1,4	2,7	0,5185
39		16462	16467	5	20:80	1,4	2,7	0,5185
40		20510	20518	8	20:80	1,4	2,7	0,5185
41		17417	17420	3	20:80	1,4	2,7	0,5185

Tabela 13 - Massas das frações 42 a 81 recolhidas durante a cromatografia em coluna dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* TGC07 e seus respectivos fatores de retenção na cromatografia em camada delgada analítica.

Cromatografia em coluna				Cromatografia em camada delgada analítica				Rf
Frações	MeOH:CHCl ₃ (v.v ⁻¹)	Massa do frasco vazio (mg)	Massa do Frasco com a amostra seca (mg)	Massa da amostra (mg)	MeOH:CHCl ₃ (v.v ⁻¹)	Distancia percorrida pela amostra (cm)	Distancia percorrida pela fase móvel (cm)	
42	50:50	17037	17041	4	20:80	1,4	2,7	0,5185
43		9740	9745	5	20:80	1,4	2,7	0,5185
44		7456	7457	1	20:80	1,4	2,7	0,5185
45		14846	14849	3	20:80	1,4	2,7	0,5185
46		13970	13972	2	20:80	1,05	2,7	0,3889
47		17119	17121	2	20:80	1,05	2,7	0,3889
48		9490	9494	4	20:80	1,1	2,7	0,4074
49		7496	7500	4	20:80	1,1	2,7	0,4074
50		17065	17065	0	20:80	1,1	2,7	0,4074
51		14502	14503	1	20:80	1,1	2,7	0,4074
52		7442	7445	3	20:80	1,1	2,7	0,4074
53		14720	14723	3	20:80	1,1	2,7	0,4074
54	70:30	14009	14011	2	20:80	1,1	2,7	0,4074
55		9736	9738	2	20:80	1,1	2,7	0,4074
56		20413	20415	2	20:80	1,1	2,7	0,4074
57		21060	21061	1	20:80	1,15	3	0,3833
58		14220	14221	1	20:80	1,15	3	0,3833
59		15013	15013	0	20:80	1,15	3	0,3833
60		14381	14385	4	20:80	1,15	3	0,3833
61		21131	21132	1	20:80	1,15	3	0,3833
62		16244	16246	2	20:80	0	3	0
63		7413	7415	2	20:80	0	3	0
64		7539	7539	0	20:80	0	3	0
65		21841	21841	0	20:80	0	3	0
66		13997	13998	1	20:80	0	3	0
67		15174	15174	0	-	-	-	-
68		17849	17849	0	-	-	-	-
69		17431	17431	0	-	-	-	-
70		17380	17380	0	-	-	-	-
71		16085	16086	1	-	-	-	-
72		7472	7474	2	-	-	-	-
73		14838	14840	2	-	-	-	-
74		16067	16069	2	-	-	-	-
75		14606	14608	2	-	-	-	-
76		14336	14336	0	-	-	-	-
77		22507	22508	1	-	-	-	-
78		21466	21466	0	-	-	-	-
79		7555	7555	0	-	-	-	-
80		14754	14754	0	-	-	-	-
81		20250	20250	0	-	-	-	-

APÊNDICE B - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM 280 nm

O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a curva de calibração da concentração de lignina em função da absorvância em 280 nm, a qual esta apresentada na Figura 37 e descrita nas Equações 20 e 21.

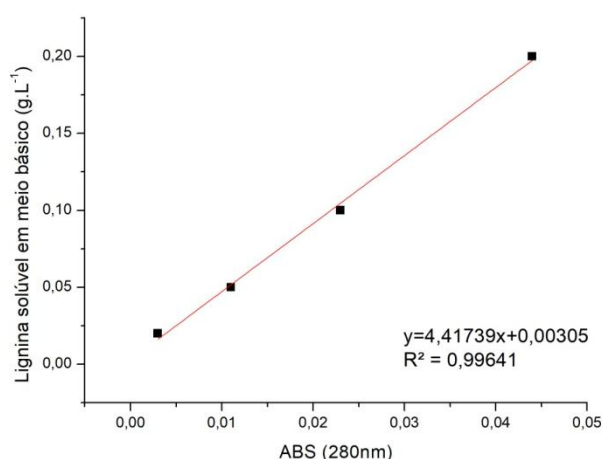


Figura 37 - Concentração de lignina solúvel em função da absorvância em 280nm.

$$C_{lig} = 4,41739(A_T - A_{pd}) + 0,00305 \quad (\text{Eq. 20})$$

$$A_{pd280} = [C_{Furf} \cdot \varepsilon_{Furf} + C_{HMF} \cdot \varepsilon_{HMF}] \quad (\text{Eq. 21})$$

Onde, C_{lig} é a concentração de lignina solúvel (g.L^{-1}), A_T é a absorvância da solução de lignina junto com os produtos de decomposição da celulose e hemicelulose (furfural e HMF), em 280 nm, A_{pd} é a absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares, C_{Furf} e C_{HMF} são, respectivamente, a concentração de furfural e HMF, as quais foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ε_{Furf} e ε_{HMF} são suas respectivas absorvidades, 146,85 e 114,00 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

APÊNDICE C - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR TOTAL

A curva padrão do açúcar redutor foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 0,08 a 2,70 mg.mL⁻¹, onde as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram utilizados para construir um gráfico das absorbâncias em relação à concentração de glicose, onde a equação da reta está apresentada na Figura 38 e descrita na Equação 22.

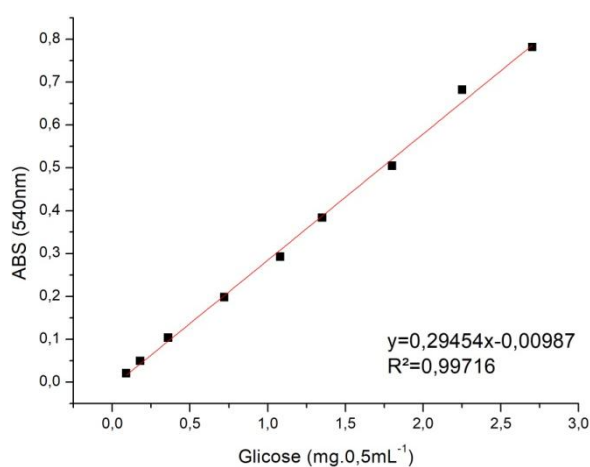


Figura 38 - Absorbância, a 540 nm, em função da concentração de glicose em mg.0,5mL⁻¹.

(Eq. 22)

Sendo, ABS a absorbância das amostras em 540 nm, C_{AR} a concentração dos açúcares redutores e *F* o fator de diluição. As absorbâncias das amostras resultantes das reações enzimáticas foram subtraídas das absorbâncias correspondentes aos controles das enzimas e do substrato.

APÊNDICE D - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DAS LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC07

Para determinar a concentração em g.L^{-1} das linhagens bacterianas por turbidimetria, foram construídas curvas de calibração relacionando a densidade óptica em função da concentração da biomassa de cada linhagem, com coeficiente de determinação (R^2) maior que 99,3%, as quais estão apresentadas na Figura 39 e descritas nas Equações 23 e 24.

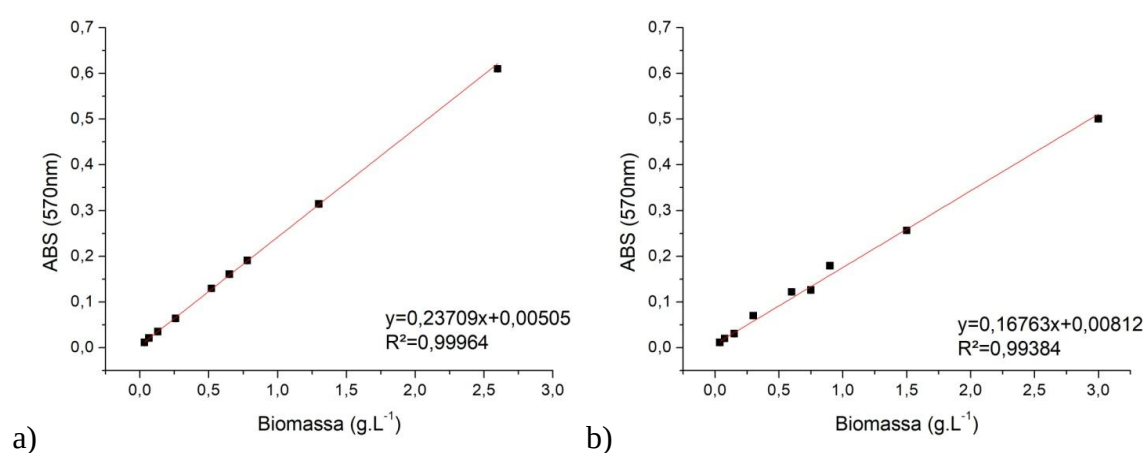


Figura 39 - Absorbância em 570 nm em função da concentração de biomassa da linhagem TGC02 (a) e TGC07 (b).

(Eq. 23)

(Eq. 24)

Onde, a A_{570} é a absorbância a 570nm, F é o fator de diluição, X_{TGC02} e X_{TGC07} são as concentrações das linhagens TGC02 e TGC07, em g.L^{-1} , respectivamente.

APÊNDICE E - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA L-RHAMNOSE

A curva de calibração da L-rhamnose (Sigma) foi obtida a partir da curva preparada com diferentes concentrações deste açúcar em relação à diferença das absorbâncias em 400 e 430 nm, a qual está demonstrada na Figura 40 e descrita na Equação 25.

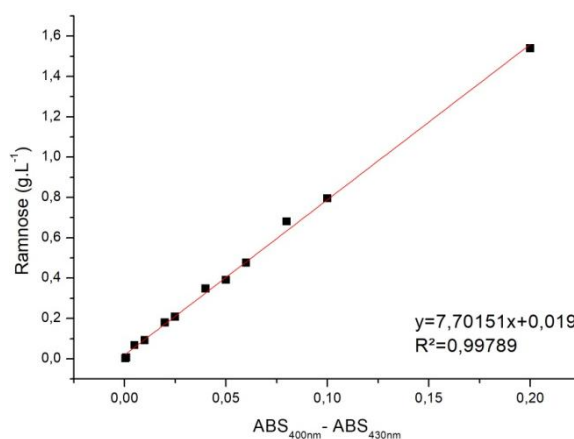


Figura 40 - Concentração de ramnose em função da diferença entre as absorbâncias de 400 e 430 nm.

(Eq. 25)

Onde Rm é a concentração de ramnose em $g.L^{-1}$, e são as absorbâncias a 400 e 430 nm, respectivamente e F é o fator de diluição.