



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

THIAGO OKUBO PROCÓPIO PINTO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELOS FUNGOS
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756, Thermomyces
lanuginosus, Trichoderma reesei QM9414 e Penicillium
viridicatum RFC3 E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM DIFERENTES PRÉ-
TRATAMENTOS.

São José do Rio Preto, SP

2010

THIAGO OKUBO PROCÓPIO PINTO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELOS FUNGOS
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*,
Trichoderma reesei QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 E APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM
DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP
2010

Pinto, Thiago Okubo Procópio.

Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CMBAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos / Thiago Okubo Procópio Pinto. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

91 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Fungos. 4. Bagaço de cana. 5. Cana-de-açúcar. I. Da Silva, Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

THIAGO OKUBO PROCÓPIO PINTO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELOS FUNGOS
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*,
Trichoderma reesei QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 E APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM
DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Nei Pereira Júnior
UFRJ - Rio de Janeiro

Prof. Dr. Maurício Boscolo
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, concedendo-me persistência, intuição e, sobretudo, sabedoria para compreensão do que quero, do que posso e do que consigo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto da Silva e à Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes, pelo privilégio e oportunidade concedidos, e, sobretudo, pela confiança, orientação e apoio para realização deste trabalho;

À toda minha família, especialmente meus queridos pais, pelo grande amor e apoio incondicional;

À todos os amigos que conheci durante o mestrado, pelos bons momentos dentro e fora da faculdade;

Aos Profs Dr. Maurício Boscolo e Nei Pereira Júnior pela participação na banca de defesa;

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo pela participação na banca de qualificação;

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, com quem convivi durante o mestrado, pela constante demonstração de amizade;

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Aline, Ana Lúcia, André, Andréia, Ariane, Bárbara Bonine, Bárbara Garcia, Carol Merheb, Carol Bezerra, Cristiane, Ellen, Fabiana, Fernanda, Gisele, Josiane, Isabel, Larissa, Márcia, Marcelo, Milla, Natália, Rafaela, Ruan, Sara e Tássia, e do laboratório de Tecnologia de Cereais, Raquel e Thaís, por todo o suporte durante o mestrado;

Aos amigos Ariane, Daniela, Lílian, Michelle, Ricardo, Rodrigo, Rodolfo e Sarah que contribuíram no desenvolvimento e realização do projeto;

À CNPq, pela concessão da bolsa de estudos; e à Fapesp pela concessão de auxílio pesquisa;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Estrutura da parede celular vegetal..... | 17 |
| Figura 2 | Principais componentes da parede celular de plantas..... | 18 |
| Figura 3 | Representação da fibra lignocelulósica..... | 19 |
| Figura 4 | Polímero de celulose..... | 19 |
| Figura 5 | Representação esquemática das unidades estruturais precursoras da lignina..... | 21 |
| Figura 6 | Processo de produção convencional de etanol..... | 23 |
| Figura 7 | Processo de produção de etanol a partir de material lignocelulósico..... | 24 |
| Figura 8 | Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose..... | 32 |
| Figura 9 | Produção de CMCase por <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. reesei</i> e <i>P. viridicatum</i> | 47 |
| Figura 10 | Produção de Xilanase por <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 47 |
| Figura 11 | Produção de β -glicosidase por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. lanuginosus</i> | 49 |
| Figura 12 | Produção de β -glicosidase por <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 49 |
| Figura 13 | Produção de β -xilosidase por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. lanuginosus</i> | 50 |
| Figura 14 | Produção de β -xilosidase por <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 50 |
| Figura 15 | Produção de poligalacturonase por <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 50 |
| Figura 16 | Quantificação de açúcar redutor solúvel nos extratos de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. lanuginosus</i> | 52 |
| Figura 17 | Quantificação de açúcar redutor solúvel nos extratos de <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 52 |
| Figura 18 | Quantificação de açúcares totais nos extratos de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. lanuginosus</i> | 53 |
| Figura 19 | Quantificação de açúcares totais nos extratos de <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 53 |
| Figura 20 | Quantificação de proteínas totais nos extratos de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. lanuginosus</i> | 53 |
| Figura 21 | Quantificação de proteínas totais nos extratos de <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 53 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 22 | Cromatografia de papel com a fração líquida do pré-tratamento térmico com ácido clorídrico 0,1 M..... | 58 |
| Figura 23 | Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> . Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 60 |
| Figura 24 | Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de <i>T. lanuginosus</i> . Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 61 |
| Figura 25 | Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de <i>T. reesei</i> . Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 61 |
| Figura 26 | Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de <i>P. viridicatum</i> . Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 62 |
| Figura 27 | Sacarificação enzimática por <i>T. reesei</i> com extrato concentrado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 7..... | 63 |
| Figura 28 | Sacarificação enzimática por <i>T. aurantiacus</i> com extrato concentrado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 7..... | 64 |
| Figura 29 | Sacarificação enzimática por <i>T. aurantiacus</i> de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 65 |
| Figura 30 | Sacarificação enzimática por <i>T. aurantiacus</i> de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e não lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 65 |
| Figura 31 | Sacarificação enzimática por <i>T. reesei</i> de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 66 |
| Figura 32 | Sacarificação enzimática por <i>T. reesei</i> de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e não lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 66 |
| Figura 33 | Hidrólise enzimática do bagaço EV lavado com a mistura de extratos enzimáticos (1:1) de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> . Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5..... | 68 |
| Figura 34 | Cromatograma dos compostos inibidores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV original com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> | 71 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 35 | Cromatograma dos compostos inibidores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV original com extrato enzimático de <i>T. reesei</i> | 72 |
| Figura 36 | Cromatograma dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV lavado com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> | 74 |
| Figura 37 | Cromatograma dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV lavado com extrato enzimático de <i>T. reese</i> | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1 | Uso do etanol como combustível em alguns países..... | 22 |
| Tabela 2 | Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática..... | 33 |
| Tabela 3 | Resumo dos tempos de melhor produção e respectivas atividades de cada enzima dos fungos termofílicos..... | 51 |
| Tabela 4 | Resumo dos tempos de melhor produção e respectivas atividades de cada enzima dos fungos mesofílicos..... | 51 |
| Tabela 5 | Perfil enzimático dos extratos de <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 55 |
| Tabela 6 | Determinação de pH, proteínas e açúcares nos extratos de <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 55 |
| Tabela 7 | Atividades enzimáticas dos extratos concentrados de <i>T. aurantiacus</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>T. reesei</i> | 56 |
| Tabela 8 | Quantificação dos açúcares redutores na fração líquida proveniente do pré-tratamento de diferentes frações do bagaço de cana-de-açúcar..... | 57 |
| Tabela 9 | Quantificação dos açúcares redutores na fração líquida proveniente do pré-tratamento com diferentes soluções..... | 59 |
| Tabela 10 | Determinação dos teores de umidade do bagaço comum esterilizado e dos pré-tratados com explosão a vapor..... | 59 |
| Tabela 11 | Quantificação dos açúcares e determinação da perda de peso do bagaço pré-tratado com explosão a vapor..... | 60 |
| Tabela 12 | Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes tipos de pré-tratamento..... | 69 |
| Tabela 13 | Compostos fenólicos totais presentes nos diferentes tipos de pré-tratamento..... | 70 |
| Tabela 14 | Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC nos hidrolisados com extrato enzimático do fungo <i>T. aurantiacus</i> | 71 |
| Tabela 15 | Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC nos hidrolisados com extrato enzimático do fungo <i>T. reesei</i> | 72 |
| Tabela 16 | Determinação de açúcares redutores nos hidrolisados com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> | 72 |
| Tabela 17 | Determinação de açúcares redutores nos hidrolisados com extrato enzimático de <i>T. reesei</i> | 74 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 15 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 3.1 | Biomassa..... | 16 |
| 3.2 | Biomassa vegetal..... | 17 |
| 3.2.1 | Celulose..... | 19 |
| 3.2.2 | Hemicelulose..... | 20 |
| 3.2.3 | Lignina..... | 21 |
| 3.3 | O etanol como fonte de energia renovável..... | 22 |
| 3.4 | Processo convencional de produção de etanol..... | 23 |
| 3.5 | Aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais..... | 24 |
| 3.6 | Bagaço de cana-de-açúcar..... | 26 |
| 3.7 | Pré-tratamento do material lignocelulósico..... | 27 |
| 3.8 | Pré-tratamentos térmicos..... | 29 |
| 3.8.1 | Água quente..... | 29 |
| 3.8.2 | Pré-tratamento térmico em combinação com ácido ou álcalis..... | 29 |
| 3.8.3 | Explosão a vapor..... | 30 |
| 3.9 | Enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa..... | 31 |
| 3.9.1 | Celulases..... | 31 |
| 3.9.2 | Hemicelulases..... | 32 |
| 3.10 | Sacarificação enzimática..... | 33 |
| 3.11 | Vias de produção do etanol de segunda geração..... | 34 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 | Produção das enzimas por fermentação em estado sólido..... | 36 |
| 4.1.1 | Pré-inóculo..... | 36 |
| 4.1.2 | Solução nutriente..... | 36 |
| 4.1.3 | Fermentadores..... | 36 |
| 4.1.4 | Substrato para crescimento e produção das enzimas..... | 37 |
| 4.1.5 | Inóculo..... | 37 |
| 4.1.5.1 | <i>Termofílicos</i>..... | 37 |
| 4.1.5.2 | <i>Mesofílicos</i>..... | 37 |
| 4.1.6 | Fermentação em estado sólido..... | 38 |
| 4.2 | Extração enzimática..... | 38 |
| 4.3 | Determinação das atividades enzimáticas..... | 38 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.3.1 | Avicelase..... | 38 |
| 4.3.2 | CMCase..... | 39 |
| 4.3.3 | Xilanase..... | 39 |
| 4.3.4 | β -glicosidase..... | 39 |
| 4.3.5 | β -xilosidase..... | 39 |
| 4.3.6 | Arabinofuranosidase..... | 39 |
| 4.3.7 | Atividade papel de filtro (PFase)..... | 40 |
| 4.3.8 | Poligalacturonase..... | 40 |
| 4.3.9 | Lacase..... | 40 |
| 4.3.10 | Manganês Peroxidase..... | 41 |
| 4.3.11 | Lignina Peroxidase..... | 41 |
| 4.4 | Determinação quantitativa de açúcar redutor solúvel..... | 41 |
| 4.5 | Determinação quantitativa de açúcares totais..... | 41 |
| 4.6 | Determinação quantitativa de proteína..... | 41 |
| 4.7 | Concentração do extrato enzimático bruto..... | 42 |
| 4.8 | Determinação da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar a ser pré-tratado..... | 42 |
| 4.9 | Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para hidrólise..... | 42 |
| 4.10 | Pré-tratamento com explosão a vapor..... | 43 |
| 4.11 | Determinação do teor de umidade..... | 43 |
| 4.12 | Hidrólise enzimática..... | 44 |
| 4.13 | Determinação de fenóis totais..... | 44 |
| 4.14 | Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC..... | 45 |
| 4.15 | Determinação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática..... | 45 |
| 5 | RESULTADOS..... | 47 |
| 5.1 | Atividades enzimáticas..... | 47 |
| 5.1.1 | Avicelase..... | 47 |
| 5.1.2 | CMCase..... | 47 |
| 5.1.3 | Xilanase..... | 48 |
| 5.1.4 | β -glicosidase..... | 48 |
| 5.1.5 | β -xilosidase..... | 49 |
| 5.1.6 | Poligalacturonase (PGase)..... | 50 |
| 5.1.7 | Lacase / Manganês Peroxidase / Lignina Peroxidase..... | 51 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.1.8 | Resumo das produções enzimáticas obtida por cada fungo..... | 51 |
| 5.2 | Determinação quantitativa de açúcar redutor solúvel..... | 52 |
| 5.3 | Determinação quantitativa de açúcares totais..... | 52 |
| 5.4 | Determinação quantitativa de proteína..... | 53 |
| 5.5 | Produção dos extratos enzimáticos para a hidrólise..... | 53 |
| 5.6 | Concentração do extrato enzimático bruto..... | 56 |
| 5.7 | Determinação da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar a ser pré-tratado..... | 56 |
| 5.8 | Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para hidrólise..... | 59 |
| 5.9 | Determinação do teor de umidade..... | 59 |
| 5.10 | Hidrólise enzimática..... | 60 |
| 5.11 | Hidrólise com os extratos concentrados..... | 62 |
| 5.12 | Hidrólise do bagaço pré-tratado com explosão a vapor..... | 64 |
| 5.13 | Hidrólise do bagaço com a mistura dos extratos enzimáticos de <i>Thermoascus aurantiacus</i> e <i>Trichoderma reesei</i>..... | 68 |
| 5.14 | Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes tipos de pré-tratamento..... | 69 |
| 5.15 | Determinação de fenóis totais..... | 69 |
| 5.16 | Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC..... | 70 |
| 5.17 | Determinação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática por HPLC..... | 73 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 76 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 78 |

RESUMO

O aproveitamento de resíduos agrícolas e agro-industriais como fonte de energia pode se tornar uma alternativa viável. O alvo principal para esta empreitada, pela sua disponibilidade e proximidade das indústrias fermentativas é o bagaço de cana, que ainda retém 2/3 da energia presente na cana, é largamente disponível no Brasil e hoje é parcialmente rejeitado ou subaproveitado. Uma forma de aproveitamento que tem se mostrado bastante promissora refere-se ao uso dessa biomassa na produção do bioetanol. No presente trabalho, avaliou-se o perfil de produção enzimática dos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414, através de fermentação em estado sólido em meio com bagaço de cana e farelo de trigo. Aplicou-se esses extratos enzimáticos na hidrólise de bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos térmicos: água quente, explosão a vapor, e água quente em combinação com HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, H₂O₂ ou NaOH. Determinou-se os principais inibidores (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e açúcares redutores (glicose, xilose, arabinose, galactose, xilobiose e celobiose) gerados no processo. O fungo *T. aurantiacus* foi o melhor produtor de enzimas celulolíticas (536,3 U/g de CMCase) e hemicelulolíticas (3419,2 U/g de xilanase), apresentando juntamente com o extrato enzimático de *T. reesei* os melhores rendimentos na sacarificação do bagaço. Os extratos enzimáticos foram mais eficientes na hidrólise do bagaço pré-tratado com NaOH e explosão a vapor com rendimentos de 3,87 e 1,21 mg/mL de açúcares redutores, respectivamente. A mistura dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* e *T. reesei* aumentou em 31,4% a eficiência da hidrólise com o bagaço pré-tratado com explosão a vapor. A concentração dos extratos por precipitação por etanol foi eficiente para a maioria das atividades enzimáticas e resultou em um aumento de aproximadamente 50% na eficiência da hidrólise. Os compostos inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural estavam presentes apenas em pequenas concentrações em todos os hidrolisados avaliados. Os seis açúcares redutores avaliados foram encontrados em todos os hidrolisados, sendo a glicose o principal produto formado no processo.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, enzimas, pré-tratamento térmico, explosão a vapor, hidrólise enzimática, etanol celulósico, biocombustível.

ABSTRACT

The utilization of agricultural and agro-industrial residues as energy source can become a viable alternative. The main target for this venture, for its availability and proximity to fermentation industries is the sugarcane bagasse, which still retains two thirds of the energy present in the cane, is widely available in Brazil and today is partly rejected or underused. One form of exploitation that has shown promising refers to the use of biomass in the production of bioethanol. In this study, we evaluated the profile of enzymatic production of fungi *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium viridicatum* RFC3 and *Trichoderma reesei* QM9414 through solid state fermentation in a medium with sugar cane bagasse and wheat bran. These enzymatic extracts were applied on the hydrolysis of sugarcane bagasse under different thermic pre-treatments: hot water, steam explosion, and hot water in combination with HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, NaOH or H₂O₂. The main inhibitors (furfural and 5-hydroxymethylfurfural) and reducing sugars (glucose, xylose, arabinose, galactose, xilobiose and cellobiose) generated in the process were determined. The fungus *T. aurantiacus* was the best producer of cellulolytic (536.3 U/g CMC_{ase}) and hemicellulolytic enzymes (3419.2 U/g xylanase), exhibiting along the enzymatic extract from *T. reesei* the best yields in the saccharification of bagasse. The enzymatic extracts were more efficient in the hydrolysis of bagasse pretreated with NaOH and steam explosion with a yield of 3.87 and 1.21 mg/mL of reducing sugars, respectively. The mixture of enzyme extract of *T. aurantiacus* and *T. reesei* increased 31.4% the efficiency of hydrolysis with bagasse pre-treated with steam explosion. The concentration of the extracts by precipitation with ethanol was effective for most enzymatic activities and resulted in an increase of approximately 50% of hydrolysis efficiency. The inhibitors furfural and 5-hydroxymethylfurfural were present only in small concentrations in all hydrolysates evaluated. The six sugars studied were found in all hydrolysates, glucose being the main product formed in the process.

Keywords: Sugar cane bagasse, enzymes, thermic pré-treatment, steam explosion, enzymatic hydrolysis, cellulosic ethanol, biofuel.

1. INTRODUÇÃO

O limitado número de reservas de combustíveis fósseis e a instabilidade no preço do barril de petróleo provocaram uma crescente busca por fontes renováveis e novas tecnologias que possibilitam a autonomia energética. Em vista disso, o Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, por dominar a produção de álcool combustível a partir de uma fonte agrícola renovável, a cana-de-açúcar.

O desenvolvimento da tecnologia para produção de álcool a partir da cana-de-açúcar promove uma série de benefícios, tais como: aumento da energia nacional segura, redução na emissão de gases poluentes na atmosfera, uso de recursos renováveis, independência do mercado mundial de petróleo e melhor desempenho econômico (diminuição das importações de petróleo).

Quando analisada a longo prazo, a viabilidade econômica do etanol produzido por fermentação alcoólica da sacarose está diretamente condicionada à disponibilidade de matéria prima e ao problema da ocupação dos solos. Dessa forma, o aumento da demanda, nacional e internacional, pelo álcool combustível ocorrido nos últimos anos resultou numa grande expansão do cultivo da cana-de-açúcar. Apesar do benefício da independência energética, a expansão de culturas para essa finalidade, também tem um efeito negativo, pois reduz a fertilidade do solo bem como sua disponibilidade para a produção de alimentos. Em vista disso, torna-se fundamental a aplicação de uma política agrícola adequada, de forma a promover o equilíbrio entre a extensão territorial destinada a esse plantio e outros tipos de culturas alimentícias, sem que ocorra prejuízo no fornecimento de matéria-prima às indústrias alcooleiras.

Uma alternativa que tem atraído a atenção dos pesquisadores é o aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais como fonte de energia, visto que, além de serem matérias-primas de baixo custo, sua utilização diminui problemas ambientais. Tradicionalmente essa biomassa é utilizada para combustão direta, gerando de calor e energia elétrica. Porém, ela ainda pode ser processada para a produção de combustíveis para o setor de transporte, ou ainda funcionando como matéria prima na elaboração de produtos químicos.

A geração de etanol a partir de biomassa lignocelulósica pode ser realizada seguindo basicamente as seguintes etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise da celulose e hemicelulose e fermentação dos açúcares por leveduras.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o perfil de produção enzimática dos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium viridicatum* e *Trichoderma reesei* QM9414, bem como a aplicação dos seus extratos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas dos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium viridicatum* e *Trichoderma reesei* QM9414.
- Avaliar a eficiência destes extratos na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetidos a diferentes tipos de pré-tratamentos.
- Determinar a presença de compostos inibidores gerados nos pré-tratamentos.
- Identificar e quantificar os açúcares produzidos no processo de hidrólise.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomassa

A biomassa pode ser considerada como a massa orgânica de qualquer material biológico, geralmente composto por celulose, hemicelulose, lignina, lipídeos, proteínas, extrativos, açúcares simples, amido, água e cinzas sendo os três primeiros os principais constituintes (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). Trata-se da quarta maior fonte de energia do mundo, logo após o carvão, petróleo e gás natural, e fornece aproximadamente 14% do consumo global de energia (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

A biomassa é utilizada para satisfazer diferentes necessidades energéticas, incluindo a geração de eletricidade, combustíveis para veículos e fornecendo calor para processos industriais (BRIDGEWATER, 1999). Além de armazenar eficientemente a energia solar, a biomassa é, dentre todas as fontes de energia renováveis, a única fonte de carbono capaz de ser convertida em combustíveis sólidos, líquidos e gasosos através de diferentes processos (OZBAY et al., 2001).

Uma grande variedade de recursos de biomassa está disponível no nosso planeta para a conversão em bioprodutos. Dentre esses recursos pode-se incluir a madeira e seus resíduos, as safras agrícolas e seus subprodutos e resíduos, resíduos do processamento de alimentos, materiais de origem marinha (plantas aquáticas e algas), e os resíduos municipais e industriais (BALAT et al., 2009).

A maior parte da energia produzida a partir de biomassa utiliza a madeira e seus resíduos (64%), seguida dos resíduos sólidos municipais (24%), resíduos agrícolas (5%) e gases de aterros sanitários (5%) (BALAT, 2008a). No entanto, muitos tipos de biomassa podem ser cultivados com o específico propósito de produção energética, tais como a cana de açúcar, milho, beterraba, grãos, algas marinhas, entre outros (DEMIRBAS, 2005a). Neste caso, é importante que a colheita tenha um alto rendimento de material seco por unidade de terra (toneladas/hectares), resultando em uma diminuição das áreas necessárias ao plantio, bem como no custo de produção da energia a partir desta biomassa (DEMIRBAS, 2005b).

Todos esses recursos podem ser utilizados na criação de novos biomateriais e, para isso, é necessário um completo entendimento da composição da matéria prima, seja ela a planta inteira ou algum de seus constituintes, para que os elementos funcionais desejados possam ser obtidos e utilizados na produção do bioproduto (HOWARD et al., 2003).

3.2. Biomassa vegetal

A parede celular das plantas é uma estrutura biológica complexa contendo polímeros e outras moléculas cujas proporções e organização estrutural variam conforme o tipo e idade da planta. Está dividida em lamela média, parede primária e parede secundária, sendo que esta última compreende-se em 3 camadas: S_1 , S_2 e S_3 como se observa na Figura 1 a seguir.

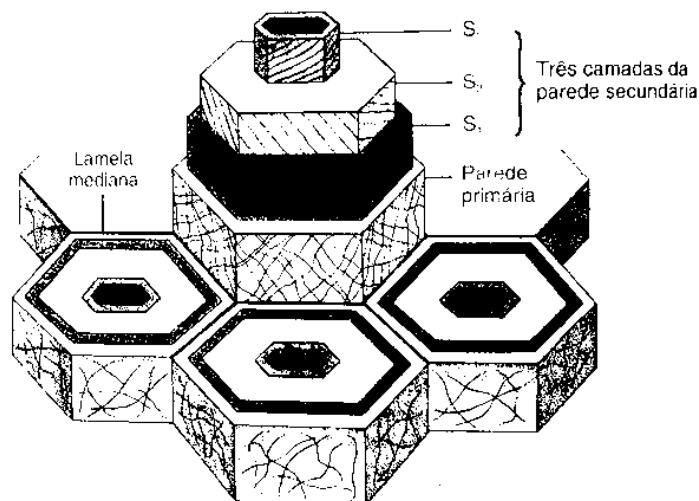


Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2003).

Os blocos da parede celular primária são constituídos basicamente de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas estruturais (Figura 2). As fortes microfibrilas de celulose cristalina encapsulam a célula em uma estrutura de malha, e a hemicelulose se associa intimamente com as microfibrilas de celulose fortalecendo a estabilidade (TEERI et al., 2007). As pectinas unem-se por ligações cruzadas covalentes e iônicas para formar redes estruturais independentes, mas com sinergismo com a rede de celulose/hemicelulose (CHANLIAUD et al., 2002). As propriedades físicas da hemicelulose e pectina são largamente determinadas pela natureza e abundância de cadeias laterais, e dependem das concentrações locais de sais ligados ionicamente e covalentemente (como cálcio e boro) e potenciais agentes ligantes, como os ácidos ferúlico e cumárico (GRABBER et al., 2004). Variando as estruturas ou o meio químico desses polímeros, as propriedades mecânicas das paredes celulares podem ser alteradas durante os estágios de desenvolvimento e em diferentes tecidos da planta (BURGERT, 2006).

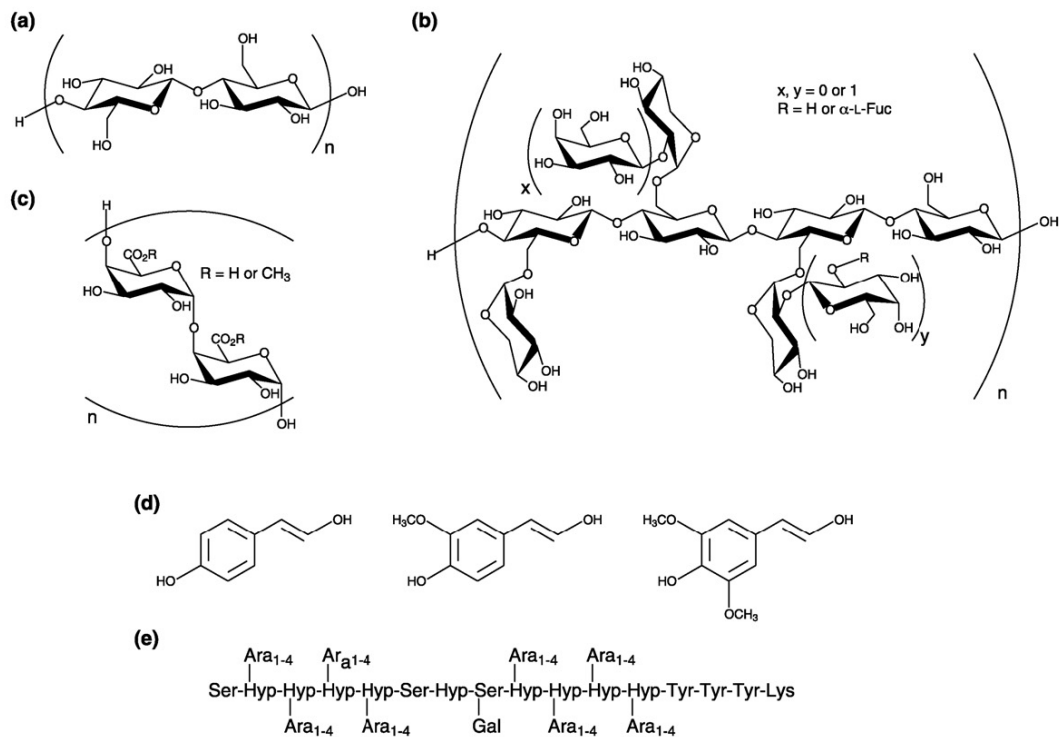


Figura 2: Principais componentes da parede celular de plantas. a) Unidade básica do polímero de celulose. b) Unidade de xiloglucana, um dos componentes da hemicelulose. c) Parte da estrutura de poligalacturônico, um polissacarídeo péctico. d) Componentes dos blocos de lignina. e) Seqüência de aminoácidos de uma proteína encontrada nas paredes celulares (TEERI et al., 2007).

As paredes secundárias contêm cadeias poliméricas das paredes primárias e são lignificadas nos estágios posteriores de formação do vegetal (Figura 3). As microfibrilas de celulose são depositadas nas paredes secundárias por um processo altamente organizado, levando a uma estrutura hierárquica com três camadas (S_1 , S_2 e S_3). Na camada dominante, S_2 , as microfibrilas de celulose são muito alinhadas, contribuindo para a resistência mecânica do vegetal (TEERI et al., 2007).

Sendo assim, a estrutura básica de toda biomassa lenhosa consiste essencialmente de três polímeros: celulose $(C_6H_{10}O_5)_x$, hemiceluloses como a xilana $(C_5H_8O_4)_m$, e lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}]_n$ no tronco, folhagem e casca. A proporção entre esses três constituintes varia entre as espécies, e ainda há diferenças distintas entre as madeiras duras e moles. As madeiras duras possuem uma maior proporção de celulose, hemicelulose e extrativos que as madeiras moles, porém estas possuem uma maior proporção de lignina. De maneira geral, as madeiras duras contêm aproximadamente 43-47% de celulose, 25-35% de hemicelulose, 16-24% de lignina e 2-8% de extrativos, enquanto a proporção das madeiras moles é de 40-44% de celulose, 25-31% de lignina, 25-29% de hemicelulose e 1-5% de extrativos (RYDHOLM, 1965).

Devido à linearidade da cadeia de celulose, bem como ao grande número de grupos hidroxilas e sua capacidade de formar ligações de hidrogênio, as cadeias laterais unem-se para formar uma estrutura agregada e insolúvel na maioria dos solventes que varia de comprimento e largura. Essa fibra de celulose apresenta regiões cristalinas, altamente ordenadas e de difícil degradação, e regiões amorfas, menos regulares (RAMOS, 2003).

As regiões cristalinas são formadas pela configuração paralela das cadeias lineares, o que resulta na formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, contribuindo para a insolubilidade da celulose e sua baixa reatividade, ao mesmo tempo tornando-a mais resistente à hidrólise ácida e enzimática, dificultando a entrada de água e modificando a elasticidade das fibras (DA SILVA; GOMES; FRANCO, 1997; BOBBIO; BOBBIO, 2003; NELSON; COX, 2004).

3.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é definida como a fração da parede celular que pode ser extraída com álcali (MOHR; SCHOPFER, 1995). As hemiceluloses das plantas são polissacarídeos cuja natureza química varia de tecido para tecido e de espécie para espécie. Estes polissacarídeos são formados por diversas pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácidos galacturônicos), freqüentemente acetilados, e formando cadeias ramificadas (MARTÍNEZ et al., 2005).

As hemiceluloses estão estruturalmente mais relacionadas com a celulose do que a lignina e são depositadas na parede celular nos primeiros estágios da biosíntese. Elas são derivadas principalmente de cadeias de pentose, e atuam como um material cimentante, mantendo unidas as micelas e fibras de celulose (DEMIRBAS, 2008). A xilana é o principal polímero desta fração, e consiste num polissacarídeo composto de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas, contendo ramificações de pentoses e hexoses. Trata-se do maior polissacarídeo estrutural das células vegetais e o segundo polissacarídeo mais abundante em vegetais, calcula-se que esteja entre as três primeiras fontes de carbono orgânico renovável (BEG et al., 2001; KATAPODIS; CHRISTAKOPOULOU; CHRISTAKOPOULOU, 2006). As hemiceluloses possuem um peso molecular menor que a celulose, sendo que o número de repetições dos monômeros é de aproximadamente apenas 150, comparado com o da celulose varia entre 5000 e 10000 (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

O aproveitamento eficiente da xilana é imprescindível quando se deseja utilizar a biomassa lignocelulósica para processos de bioconversão, seja nos processos para a fermentação alcoólica ou para a indústria de alimentos na produção do adoçante xilitol (DA SILVA, 1992).

3.2.3. Lignina

A lignina é o principal componente não-carboidrato da biomassa da planta. É depositada na rede de carboidratos da parede celular durante o crescimento da parede secundária. Trata-se de uma substância complexa formada por polímeros aromáticos naturais, sendo a fonte mais abundante na natureza (LORA; GLASSER, 2002; SUHAS; CARROTT; RIBEIRO CARROTT, 2007).

Essas macromoléculas tridimensionais de origem fenilpropanóica são constituídas de unidades básicas de p-hidroxifenilpropano (p-H), guaiacilpropano (G) e siringilpropano (S). A estrutura resultante é uma macromolécula complexa com uma grande variedade de grupos funcionais (Figura 5). Devido a essas complexas estruturas as ligninas formam polímeros com regiões amorfas (TSUJINO; KAWAMOTO; SAKA, 2003; POUTEAU et al., 2003).

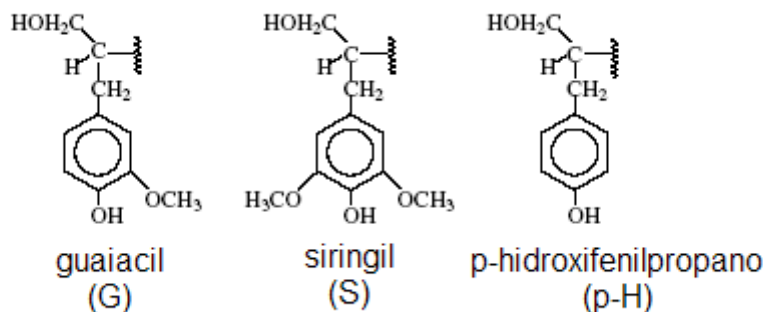


Figura 5. Representação esquemática de unidades estruturais precursoras da lignina.

Sua estrutura principal provém dos precursores primários, álcool trans coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-para-cumário (SACON; WEISSHEIMER, 1996). A complexa matriz formada pelas ligações entre esses precursores resulta em uma grande variedade de grupos funcionais, tais como hidroxil, metoxil e carbonil, que concedem uma alta polaridade à macromolécula de lignina (FELDMAN et al., 1991)

A lignina também está covalentemente ligada à hemicelulose, através de ligações éster com a xilana, formando uma complexa matriz que envolve as microfibrilas de celulose. A propriedade física mais importante dessa macromolécula orgânica é a rigidez, que não apenas promove força aos tecidos da planta, mas

também previne o colapso dos elementos condutores de água e previne o ataque de microorganismos celulolíticos à parede celular da planta (SANDGREN;STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

A concentração de lignina varia entre diferentes espécies de plantas, sendo essa diferença de concentração é devido à proporção desses alcoóis que formam a lignina (BAURHOO; RUIZ-FERIA; ZHAO, 2008). O teor de lignina em base seca, geralmente varia entre 20 e 40% do peso nas madeiras duras e moles, e de 10 a 40% para espécies herbáceas, como o bagaço de cana de açúcar, a espiga de milho, casca de amendoim, casca de arroz e a palha (YAMAN, 2004).

3.3. O etanol como fonte de energia renovável

O aumento da demanda energética mundial e o uso indiscriminado das reservas de petróleo pela humanidade motivaram a busca por fontes renováveis de energia, especialmente por aquelas derivadas de materiais renováveis como a biomassa (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009). Além disso, a preocupação mundial com o aumento das emissões de CO₂ na atmosfera e as conseqüentes mudanças climáticas decorrentes do efeito estufa encorajaram cada vez mais o uso do etanol como aditivo ou substituto para a gasolina (Tabela 1) (BUCKERIDGE; SANTOS; DE SOUZA, 2009; BALAT; BALAT; ÖZ, 2008b).

Tabela 1. Uso do etanol como combustível em alguns países.

| País | Matéria-prima | Porcentagem de etanol nas misturas com gasolina (%v/v) |
|----------------|---------------------------------|--|
| Brasil | Cana-de-açúcar | 24 |
| Estados Unidos | Milho | 10 |
| Canadá | Milho, trigo, cevada | 7,5-10 |
| Colômbia | Cana-de-açúcar | 10 |
| Suécia | Trigo | 5 |
| Índia | Cana-de-açúcar | 5 |
| Tailândia | Mandioca, cana-de-açúcar, arroz | 10 |

Fonte: Sanchez; Cardona 2008.

Atualmente, os biocombustíveis, como é o caso do etanol, são produzidos predominantemente a partir de biomassa. De acordo com Demirbas (2008) existem algumas vantagens na utilização de biomassa como matéria-prima, tais como: são fontes renováveis que podem ser sustentavelmente desenvolvidas no futuro; aparentam propriedades ambientais muito positivas, como menores emissões de dióxido de carbono e conteúdo sulfúrico; além do potencial econômico promovido nos momentos de altas do preço dos combustíveis fósseis.

Foi neste contexto, há cerca de quatro décadas atrás, que o Brasil iniciava um programa de produção em larga escala do etanol visando à substituição da gasolina e, conseqüentemente, uma menor dependência política e econômica do mercado externo em períodos de instabilidade. Com a intensificação dos investimentos em estudos agrícolas e tecnológicos, o país passou a ser um dos maiores produtores mundiais de etanol ocupando uma posição privilegiada em termos de segurança energética (SOCCOL et al., 2010).

No Brasil, o etanol é utilizado como combustível (álcool hidratado), misturado (álcool anidro) com a gasolina em proporções próximo a 25%, ou ainda em qualquer proporção nos carros com motores “flex” (álcool hidratado). Segundo o Ministério de Minas e Energia (2010) os carros “flex” passaram por um significativo aumento de vendas ao longo dos anos e já correspondem a 36% da frota total de veículos leves, refletindo no mercado como um contínuo aumento da demanda por este tipo de combustível.

3.4. Processo convencional de produção do etanol

Devido às vantagens de se produzir açúcar e etanol simultaneamente, a configuração de engenho mais adotada no Brasil foi unir uma destilaria de etanol com uma usina de açúcar. O processo começa com a limpeza e trituração da cana-de-açúcar, separando o suco do bagaço (que é destinado às caldeiras para geração de energia para usina). O suco levemente tratado e concentrado segue para a fermentação, produzindo um vinho, que resultará no etanol hidratado após a destilação (Figura 6). Este etanol hidratado pode ser estocado como produto final ou é desidratado para a produção do álcool anidro (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

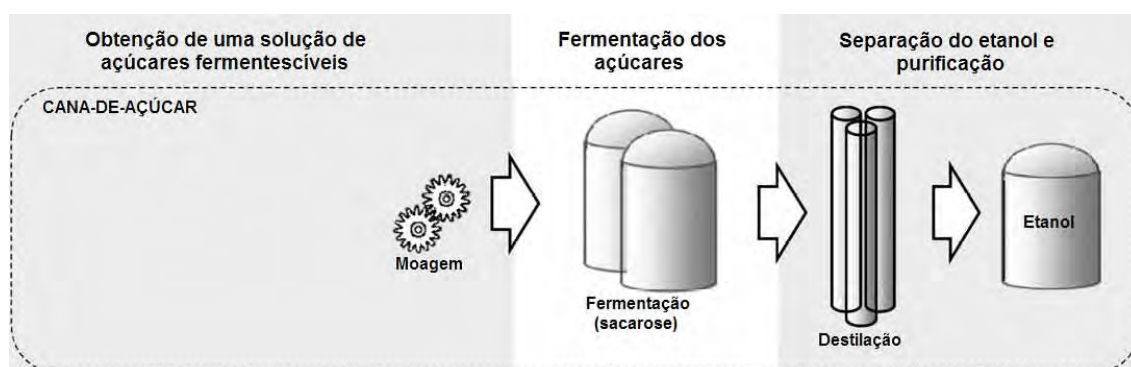


Figura 6: Processo de produção convencional de etanol (MUSATTO et al, 2010).

Esse processo depende da qualidade da cana (conteúdo de sacarose) e da eficiência da utilização da sacarose. A eficiência industrial da recuperação da

sacarose atualmente está em torno de 90%, e dificilmente espera-se uma grande evolução nesse aspecto considerando somente as tecnologias comerciais atuais. Portanto, as possibilidades de um aumento no rendimento de etanol se restringem basicamente ao melhoramento da qualidade da cana (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

Sendo assim, os subprodutos do processo convencional de produção do etanol são o bagaço de cana-de-açúcar, a energia elétrica, a vinhaça, entre outros. Tendo em vista a necessidade de aumentar os rendimentos do processo, muitos estudos têm focado na utilização de materiais lignocelulósicos, como é o caso do bagaço da cana, que apesar de ainda ser tratado como resíduo agroindustrial, possui também um grande potencial como matéria-prima para produção de etanol.

Em contrapartida, a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica compreende resumidamente nas seguintes etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise da celulose e hemicelulose, fermentação dos açúcares, separação da lignina residual e, finalmente, recuperação e purificação do etanol até as especificações desejadas para o combustível (Figura 7) (ALVIRA et al., 2010).

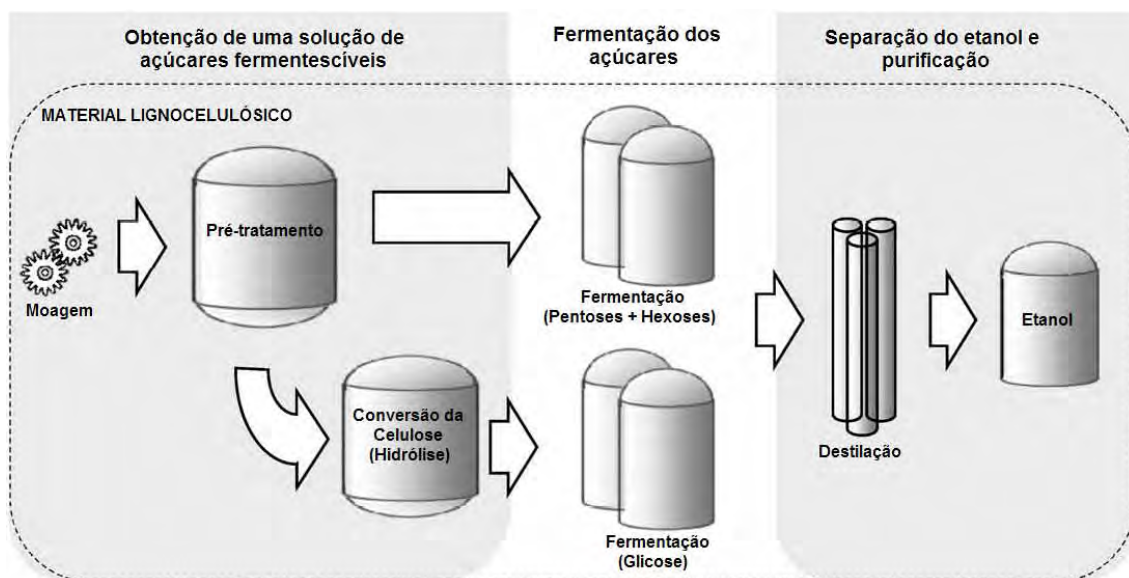


Figura 7: Processo de produção de etanol a partir de material lignocelulósico (MUSATTO et al, 2010).

3.5. Aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais

A economia brasileira é mundialmente reconhecida por suas atividades agrícolas e agroindustriais, sendo importante produtor de café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, etc. Muitos desses produtos são exportados, contribuindo para o desenvolvimento da sua economia, no entanto, essa crescente produção gera grandes

quantidades de resíduos que provocam sérios problemas ambientais (PANDEY et al., 2000a).

Desta forma, diversos trabalhos têm sido direcionados na busca de alternativas para uma eficiente utilização e adição de valor aos resíduos agroindustriais, como a polpa e casca de café, farelo de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, palha de arroz, casca de amendoim, entre outros (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Por serem nutritivos, parte destes resíduos é usada diretamente como alimento ou componente para a indústria de formulação de ração para gados (YANG et al., 2001; GRAMINHA et al., 2008). No entanto, ainda existem aplicações mais nobres, e muitas publicações descrevem os bioprocessos que têm sido desenvolvidos utilizando esses resíduos como matéria prima para elaboração de produtos da química fina, como proteína de célula única (SPC), enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários. Portanto, a aplicação desses resíduos agroindustriais em bioprocessos não somente fornece uma alternativa para esses substratos, como também auxilia na solução de problemas ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Dentro deste contexto, os processos biotecnológicos, em especial a técnica de fermentação em estado sólido (FES), têm contribuído enormemente para tal utilização. A FES emprega uma técnica simples, de fácil aplicação, onde o substrato (resíduo agroindustrial) tem a função de fornecer os nutrientes e atuar como suporte para o crescimento microbiano. A partir dela é possível então obter diversos produtos de interesse comercial, como enzimas, ácidos orgânicos e aromas (KOLICHESKI et al., 1997; STERTZ et al., 1999; MEDEIROS et al., 2001).

A seleção do substrato para a fermentação em estado sólido depende de diversos fatores, principalmente relacionados com o seu custo e viabilidade. Além disso, outro importante fator é o tamanho das partículas do material escolhido. Partículas pequenas oferecem maior superfície de contato, possibilitando maior acesso do microrganismo aos nutrientes, mas dificulta a aeração e disponibilidade de oxigênio entre os grãos, limitando o crescimento microbiano. Enquanto isso, as partículas grandes promovem uma melhor eficiência na aeração, mas a limitada superfície de contato dificulta o acesso do microrganismo ao interior dessas partículas, interferindo no seu crescimento (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000b).

3.6. Bagaço de cana-de-açúcar

Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque. Trata-se de uma lavoura em contínua expansão no Brasil, sendo os maiores índices de aumento encontrados em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais. A área de cana colhida destinada à atividade sucroalcooleira, na safra 2009, foi estimada em 7,5 milhões de hectares, distribuída em todos estados produtores. O Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 4,1 milhões de hectares. A produtividade média brasileira foi estimada em 81.293 kg/hectare, 0,4% maior que a da safra 2008, mostrando equilíbrio nas duas safras (CONAB, 2009).

Na safra de 2009, a agroindústria sucroalcooleira brasileira processou 612,2 milhões de toneladas de cana. Desse total, (45,1%) foram destinadas à produção de açúcar, que ficou em torno de 34,6 milhões de toneladas, enquanto o restante (54,9%) foi utilizado para a produção de álcool, que atingiu um volume da ordem de 25,8 bilhões de litros (CONAB, 2009).

Trata-se de um setor da economia que vem mantendo uma contínua expansão ao longo dos últimos anos, podendo ser observada pela construção de novas usinas em todo território nacional. Essa expansão do setor é acompanhada da ampliação da área plantada, da produção de cana-de-açúcar e de etanol no país. Assim, o bagaço de cana representa a maior porcentagem de resíduos da agroindústria brasileira, chegando a produzir 155 milhões de toneladas no ano de 2009 (UNB, 2010).

Em geral, o processamento de uma tonelada de cana gera em torno de 280 kg de bagaço. Embora boa parte deste bagaço seja utilizada para fins energéticos, essa quantidade representa uma grande oportunidade para agroindústria nacional. Há, portanto, um amplo reconhecimento de que a produção anual de bagaço de cana atinge cifras vultuosas e que o aproveitamento deste resíduo é uma necessidade nacional, com amplo espaço para o desenvolvimento de atividades mais nobres do que a geração direta de energia por combustão. Portanto, muito tem se investido no desenvolvimento de novas tecnologias para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar, particularmente no que tange à produção de etanol e de outros produtos de maior valor agregado. Segundo alguns autores, a utilização do bagaço excedente viabiliza economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo (GÁMEZ et al., 2006).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso resultante da extração do suco pela moagem da cana, e é composto por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Devido ao baixo teor de cinzas (2,4%), o bagaço apresenta uma grande vantagem para o processo de bioconversão por microrganismos quando comparado com outros resíduos, como a palha de arroz e de trigo, que contêm aproximadamente 17,5 e 11% de cinzas, respectivamente (PANDEY et al., 2000a).

Além disso, em comparação com outros resíduos agroindustriais, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório de energia solar devido ao seu alto rendimento (aproximadamente 80 t/ha, em comparação com 1, 2 e 20 t/ha para trigo, gramíneas e árvores, respectivamente) e capacidade de regeneração anual (PANDEY et al., 2000a)

3.7. Pré-tratamento do material lignocelulósico

A importância desta etapa no processamento do bagaço fica evidente ao se observar a natureza da matéria presente neste resíduo. A parede celular dessa planta é composta por uma malha de celulose contendo regiões amorfas e cristalinas e hemicelulose ligadas covalentemente à lignina, o que dificulta a ação de enzimas que poderiam hidrolisar esses compostos em açúcares fermentescíveis. A estrutura cristalina da celulose também representa um obstáculo extra à hidrólise enzimática. Somente com a remoção da lignina e a ruptura da celulose cristalina as enzimas teriam acesso aos polímeros de açúcar.

Portanto, o primeiro passo para a conversão da biomassa em etanol é o pré-tratamento, visando à desestruturação do complexo lignocelulósico. Este processo tem como objetivo aumentar o tamanho dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose. Assim, o pré-tratamento visa fundamentalmente o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose. Um eficiente pré-tratamento pode reduzir substancialmente a quantidade necessária de enzimas que será empregada, conduzindo a uma redução dos custos de produção (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Na realidade, o custo da etapa de pré-tratamento já foi descrito como o segundo mais caro na conversão da lignocelulose em etanol nos processos baseados em hidrólise enzimática, precedendo os custos da matéria-prima (MOSIER et al., 2005a)

De maneira geral, o pré-tratamento deve promover os seguintes requisitos: aumentar a formação de açúcares ou facilitar a subsequente hidrólise enzimática; evitar a degradação ou perda de carboidratos; evitar a formação de subprodutos

inibitórios para as etapas de hidrólise e fermentação; ser viável do ponto de vista econômico (SUN; CHENG, 2002).

Nesse sentido, diferentes alternativas tecnológicas têm sido estudadas para ser empregadas como pré-tratamentos, que podem ser divididos em físicos, físico-químicos, químicos e biológicos. Assim, a literatura reporta estudos realizados com amônia, CO₂ (MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006a), água quente (LASER et al., 2002), peroxidação (MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006a), H₂SO₄, HCl (SUN; CHENG, 2002), ácido peracético (TEIXEIRA; LINDEN; SCHROEDER, 1999) explosão alcalina amônia (HOLTZAPPLE et al., 1991), microondas (ZHU et al., 2006), ultra-som (VARGAS et al., 2004), radiação ionizante (RUDNEV; FONAKOVA; ELKABBANI, 1993), explosão a vapor (MARTIN; GALBE; JONSSON, 2002; MARTIN et al., 2006b) e aplicação de fungos como agentes desestruturantes de material lignocelulósico (FAN; GHARPPURAY; LEE, 1987).

Apesar da grande variedade de métodos propostos como pré-tratamentos para o processo de hidrólise, os estudos têm mostrado que estes processos sempre geram compostos secundários durante o tratamento do bagaço. Estes compostos inibem a atividade fermentativa dos microrganismos e, em especial, da levedura (ROSSELL, 2006).

De acordo com Dominguez (2003), esses produtos de degradação com potencial inibidor se agrupam em três categorias: derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos.

Os derivados do furano são provenientes da degradação dos açúcares originados na hidrólise da hemicelulose, entre os quais se pode destacar: o furfural, formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), resultante da degradação de hexoses (glicose, manose e galactose). Os ácidos alifáticos são formados através de processos de degradação e polimerização dos furfurais e HMF originando diferentes ácidos, tais como o fórmico e levulínico.

Os compostos fenólicos originam-se da degradação da lignina durante a etapa de pré-tratamento. Trata-se de um grupo de compostos muito heterogêneo que podem ser encontrados na forma de monômeros, dímeros e polímeros com uma grande variedade de substituintes. Alguns exemplos encontrados são o ácido 4-hidroxibenzoico, seringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído e os ácidos salicílico, vanílico, siríngico, gentísico entre outros.

Muitos dos mecanismos de ação desses compostos sobre a levedura no processo de fermentação alcoólica ainda não foram completamente estudados, mas já foi demonstrado que eles podem reagir com moléculas biológicas da célula (lipídeos,

proteínas e ácidos nucleicos), ou ocasionando danos à membrana celular com conseqüente perda da seletividade, e ainda, inibindo enzimas glicolíticas e fermentativas. De qualquer forma, estes compostos produzem efeitos negativos na fermentação por meio da redução da taxa específica de crescimento do microrganismo e da diminuição da produtividade de etanol (ROSSELL, 2006).

3.8. Pré-tratamentos térmicos

3.8.1. Água quente

Trata-se de um tratamento térmico que não exige rápida descompressão e não emprega nenhum agente catalítico ou químico. A pressão é aplicada para manter a água no estado líquido em temperaturas elevadas (160-240 °C) e provocar alterações na estrutura do material lignocelulósico (ALVIRA et al., 2010).

O objetivo de pré-tratar com água quente é solubilizar principalmente a hemicelulose para tornar a celulose mais acessível às enzimas e também evitar a formação de inibidores. Para evitar a formação de inibidores da fermentação, o pH deve ser mantido entre 4 e 7, pois entre esses valores a formação de monossacarídeos é minimizada e, conseqüentemente, há uma redução na formação dos produtos de sua degradação. Se degradação catalítica dos açúcares ocorrer, resultará numa série de reações de difícil controle levando à produção de produtos indesejáveis (MOSIER et al., 2005b).

Este pré-tratamento mostrou-se capaz de remover acima de 80% da hemicelulose e aumentar a digestibilidade enzimática do material pré-tratado em forragem de milho (MOSIER et al., 2005b) e bagaço de cana-de-açúcar (LASER et al., 2002). Parte da lignina também é solubilizada durante o pré-tratamento, mas a completa deslignificação não é possível usando somente água, pois ocorre a recondensação de componentes solúveis originados da lignina (ALVIRA et al., 2010). A principal vantagem deste processo é que a solubilização da hemicelulose e dos produtos da lignina estão em menores concentrações quando comparados com o pré-tratamento com vapor, devido a maior quantidade de água empregada (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

3.8.2. Pré-tratamento térmico em combinação com ácidos ou álcalis

O principal objetivo do tratamento ácido é solubilizar e hidrolisar a fração de hemicelulose da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas. Esse tipo de

pré-tratamento pode ser realizado com ácidos diluídos ou concentrados, porém a utilização do ácido na forma concentrada induz a formação de compostos inibidores, sendo menos atrativa para o processo de produção de etanol (ALVIRA et al., 2010).

O efeito de determinadas bases na biomassa lignocelulósica depende do conteúdo de lignina do material. Esse pré-tratamento aumenta a digestibilidade da celulose e é mais efetiva na solubilização da lignina, tendo um menor efeito na solubilização da celulose e hemicelulose que os processos ácidos ou térmicos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

O emprego de água quente em combinação com um ácido ou álcali é uma forma de melhorar o pré-tratamento térmico, podendo diminuir a temperatura ótima do processo e melhorar a hidrólise enzimática do processo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

3.8.3. Explosão a vapor

Uma forma de atenuar o caráter altamente recalcitrante da lignocelulose é o emprego da explosão a vapor, considerado o pré-tratamento físico-químico mais empregado em biomassa lignocelulósica. Este tratamento promove um desarranjo substancial da estrutura lignocelulósica, hidrólise da fração de hemicelulose e despolimerização da lignina (MONIRUZZAMAN, 1996). Conseqüentemente, o aumento da área superficial possibilita uma maior susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática.

Neste método a biomassa é tratada com vapor de alta pressão. A pressão é então rapidamente reduzida, fazendo com que o material passe por uma descompressão explosiva. A explosão a vapor é tipicamente iniciada a temperaturas de 160 °C a 260 °C por vários segundos, ou alguns minutos, antes do material ser exposto à pressão atmosférica (KURABI et al., 2005). Assim, ele combina forças mecânicas com efeitos químicos atribuídos à hidrólise (autohidrólise) de grupamentos acetil presentes na hemicelulose. A autohidrólise ocorre quando as altas temperaturas promovem a formação de ácido acético. Os efeitos mecânicos são causados devido a repentina descompressão promovendo a separação das fibras (ALVIRA et al., 2010).

Comparado com outros pré-tratamentos, as vantagens da explosão com vapor incluem uma significativa diminuição do impacto ambiental, baixo capital de investimento, menos processos químicos perigosos e completa recuperação dos açúcares (LI et al., 2001).

Este processo, quando utilizado em condições extremas, também gera compostos tóxicos que podem afetar as etapas seguintes de hidrólise e fermentação, além de provocar perda parcial da hemicelulose. Os principais inibidores produzidos

são derivados de furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos (OLIVA et al., 2003; ALVIRA et al., 2010). Desta forma, as condições ótimas do tratamento são aquelas em que os parâmetros (temperatura, pressão e tempo) são menos severos, visando à obtenção dos maiores rendimentos possíveis de sacarificação do material lignocelulósico sem, contudo, produzir resíduos químicos inibidores.

A eficiência de um pré-tratamento pode ser avaliada de diferentes formas: pela hidrólise enzimática do material sólido para determinar a digestibilidade; pela fermentação do líquido para determinar o efeito de inibidores potenciais sobre o microrganismo fermentador; e/ou pela sacarificação e fermentação simultânea (SFS) do material pré-tratado (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Um ponto importante a se ressaltar é que a desintoxicação do hidrolisado para uma plena atividade fermentativa representa uma etapa de custo elevado, o que tem limitado muitas iniciativas de produção comercial de etanol a partir do bagaço de cana (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996).

3.9. Enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa

3.9.1. Celulases

A hidrólise total da celulose somente ocorre através da ação sinérgica de pelo menos três diferentes enzimas: endoglucanase ou endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase ou celobioidrolase (EC 3.2.1.91) e a β -1,4-glicosidase ou celobiase (EC 3.2.1.21).

As endoglucanases atuam hidrolisando as cadeias aleatoriamente, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no grau de polimerização da cadeia. As exoglucanases atuam sobre a celulose a partir das extremidades não redutoras removendo unidades de celobiose (dímeros de glicose). Finalmente, as β -glicosidases hidrolisam a celobiose e outras ciclodextrinas a glicose (Figura 8) (LEITE, 2004; PALMA-FERNANDEZ, 2002).

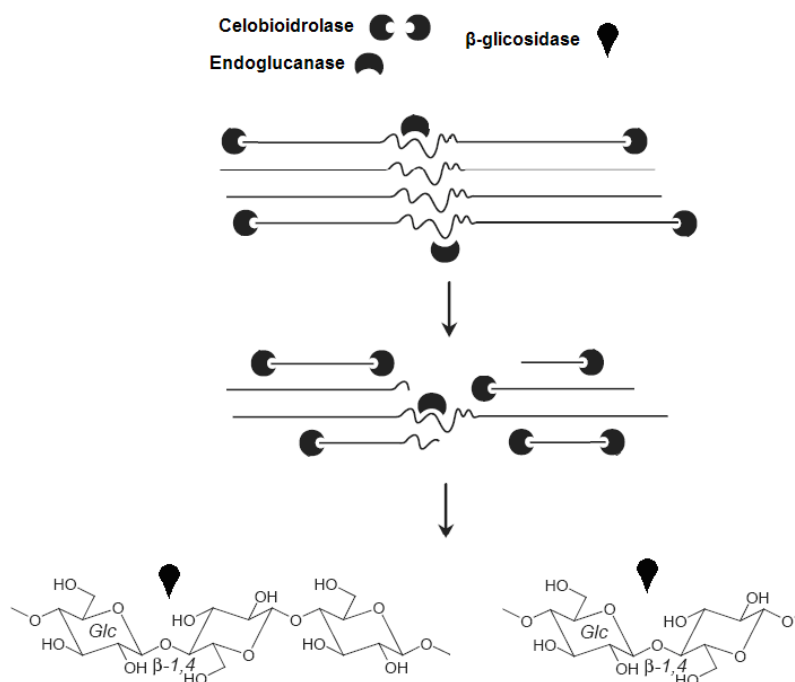


Figura 8: Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

É importante ressaltar que as três enzimas deste complexo sofrem inibição pelos produtos finais da hidrólise. Como as endo- e exoglucanases são inibidas pela celobiose, a β -glicosidase desempenha um papel crucial na degradação da celulose, ao prevenir o acúmulo de celobiose. No entanto, esta enzima também sofre inibição pelo produto final da reação, no caso, a glicose (PARRY, et al., 2002; LEITE et al., 2007).

3.9.2. Hemicelulases

Para a completa degradação da xilana, principal componente da fração de hemicelulose, são necessárias diversas enzimas. As endo-1,4- β -xilanas, clivam as ligações internas da cadeia principal de xilana, resultando em uma redução no grau de polimerização. Os xilooligossacarídeos são os principais produtos formados pela ação desta enzima. As β -xilosidases atuam sobre a xilobiose e os xilooligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de xilose. É uma enzima importante no processo por evitar que as endoxilanas sejam inibidas pelos seus próprios produtos de degradação. Ainda existem as exo- β -L-arabinofuranosidase (hidrolisa as ligações das ramificações de arabinoses), endo-1,5- β -L-arabinofuranosidase (ativa apenas próxima às arabinoses lineares), β -D-

glucuronidases, endo-1,4- β -D-mananases, β -manosidases, acetil xilana esterases, α -glucuronidases, α -galactosidases e esterases ácidas ferúlicas (POLIZELI et al., 2005; JORGENSEN; KUTTER; OLSSON, 2003).

3.10. Sacarificação enzimática

O aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar só é possível se houver a hidrólise (ou sacarificação) do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis utilizados pela levedura. Esse processo pode ser realizado por meio de ácidos ou enzimas. Entretanto, essas últimas apresentam vantagens em relação ao uso dos ácidos, pois hidrólise enzimática é conduzida sob condições brandas, atingindo aproximadamente 100% de degradação da celulose, enquanto a hidrólise ácida requer altas temperaturas e baixo pH, resultando em condições corrosivas, além de não alcançar um rendimento tão alto (OGIER et al., 1999). Ainda, a conversão enzimática é específica pelo substrato, evitando a geração de compostos secundários que poderiam inibir a etapa seguinte de fermentação (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Por outro lado, a hidrólise enzimática também tem sua limitação quando comparada à hidrólise ácida. O uso de enzimas requer um tempo maior (dias) para que ocorra a hidrólise (TENGBORG; GALBE; ZACCHI, 2001), enquanto apenas alguns minutos são necessários para a ação do ácido (TAHERZADEH et al., 1997). Além deste fator, é necessário levar em consideração o preço das enzimas, usualmente mais caras que os ácidos empregados na hidrólise. Na tabela 2 são comparadas as principais características da hidrólise enzimática e ácida:

Tabela 2: Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática.

| Variável da hidrólise | Hidrólise ácida | Hidrólise enzimática |
|-------------------------|-----------------|----------------------|
| Condições brandas | Não | Sim |
| Altos rendimentos | Não | Sim |
| Auto-inibição | Não | Sim |
| Formação de inibidores | Sim | Não |
| Baixo custo de catálise | Sim | Não |
| Menor tempo | Sim | Não |

Fonte: Taherzadeh; Karimi (2007).

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática incluem o tipo de substrato, a atividade celulolítica e as condições de reação (temperatura, pH, entre outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise enzimática, as

pesquisas focam na otimização do processo hidrolítico e no aumento da atividade celulolítica (CANTWELL, 1988).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por diversos fatores, como a cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área superficial disponível e o conteúdo de lignina (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). Outros autores como Grous; Converse; Grethlein (1986) e Thompson; Chen; Grethlein (1992) concluíram que o tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é o principal fator limitante da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. A retirada da fração de hemicelulose aumenta o tamanho médio dos poros do substrato, aumentando a probabilidade de hidrólise da celulose (PALONEN et al., 2004). A lignina e a secagem do material lignocelulósico pré-tratado também limitam a taxa e extensão da sacarificação enzimática: a lignina por atuar como um escudo e prevenindo que partes susceptíveis do substrato possam ser hidrolisadas, e a secagem por provocar um colapso na estrutura dos poros (GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

A produção de celulasas para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos é feita por fungos e bactérias. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Embora muitas bactérias celulolíticas produzam grandes quantidades de enzimas altamente específicas, como é o caso dos anaeróbios *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*, elas não são usadas em pesquisas para produção comercial de celulasas, pois requerem condições de anaerobiose para o seu desenvolvimento e ainda apresentam uma baixa taxa de crescimento. Desta forma, os fungos filamentosos são os principais organismos pesquisados para a produção de enzimas hidrolíticas de material lignocelulósico (DUFF; MURRAY, 1996).

3.11 Vias de produção do etanol de segunda geração

Como visto, o material lignocelulósico pode ser convertido em açúcares fermentescíveis através de um pré-tratamento térmico, seguido de uma hidrólise química ou enzimática (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009). A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH, quando comparada com os processos químicos. Além disso, exibe elevada especificidade, diminuindo a ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, existem alguns pontos de economia no processo, tanto do ponto de

vista energético, como metalúrgico, pela possibilidade de utilizar materiais menos nobres (BADGER, 2002).

A hidrólise enzimática da celulose e conversão dos açúcares liberados em etanol pode ser conduzida de forma seqüencial, no processo denominado HSF (hidrólise separada da fermentação), ou simultânea, processo denominado SSF, (sacarificação simultânea à fermentação). O processo SSF contribui com menor custo de investimento à planta, visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo reator. Nesse sistema, a glicose liberada é concomitantemente fermentada, reduzindo a inibição das enzimas pelos produtos de hidrólise. A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto, além de reduzir riscos de contaminação no sistema (OLOFSSON; BERTILSSON; LÍDEN, 2008).

Já o processo HSF apresenta como uma das principais vantagens a possibilidade de ambas as etapas, de hidrólise e de fermentação, serem conduzidas em suas condições ótimas, uma vez que as celulasas comumente apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas acima de 50 °C, bem acima da temperatura ideal para a etapa fermentativa. Nesse caso, como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema. No entanto, essa estratégia apresenta como desvantagens: o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas; e redução na conversão final de glicose, devido à adsorção de parte do açúcar no sólido residual da hidrólise (OLOFSSON; BERTILSSON; LÍDEN, 2008).

Considerando-se globalmente a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol, a seção de conversão da planta pode ainda ser constituída por uma etapa para fermentação de pentoses, majoritariamente xilose, provenientes da fração hemicelulósica das matérias-primas. À realização da fermentação de pentoses e hexoses (glicose) em apenas um reator dá-se o nome de cofermentação (CF). A condução da cofermentação concomitantemente à hidrólise das frações celulósica e/ou hemicelulósica compreende o processo SSCF (sacarificação simultânea à cofermentação) (PEREIRA, .

O final da evolução da tecnologia parece ser o estabelecimento do Bioprocesso Consolidado (BPC), no qual as quatro transformações biológicas envolvidas na produção do bioetanol (produção de enzimas, sacarificação, fermentação de hexoses e fermentação de pentoses) ocorrem em um único equipamento. Nesse caso, microrganismos termofílicos produziram anaerobicamente complexos enzimáticos com melhor atividade celulolítica que as típicas enzimas de fungos e fermentariam todos os açúcares liberados no mesmo reator (Wyman, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido

4.1.1. Pré-inóculo

Foram testados diferentes fungos termofílicos, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Thermomyces lanuginosus*, e mesofílicos, *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414, para produção de celulases (CMCase, β -glicosidase, atividade papel de filtro (PFase) e avicelase), hemicelulases (xilanase, β -xilosidase e arabinofuranosidase), pectinases e lacases. Os microrganismos encontravam-se estocados na coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, em tubos de ensaio com agar Sabouraud inclinado, submerso em óleo mineral, em câmara fria a 5 °C, ou estocados em glicerol a -80 °C. Os termofílicos foram inoculados em erlenmeyers com 50 mL de agar Sabouraud inclinado a 50°C e 45°C, durante 48 e 168 horas para *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*, respectivamente. Já os mesofílicos foram inoculados em erlenmeyers com 50 mL de ABD (Agar Batata Dextrose) inclinado a 28 °C por 168 horas.

4.1.2. Solução nutriente

Foi utilizada como solução salina durante a fermentação a solução proposta por Toyama e Ogawa (1978): 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de CaCl_2 , a qual foi esterilizada em autoclave a 121°C e 1 atmosfera durante 30 minutos.

4.1.3. Fermentadores

Foram utilizados como fermentadores sacos de polipropileno de 15x30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e 1,5” de diâmetro, os quais foram então tampados com algodão envolto por gaze, para garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microorganismos. Os bocais foram acoplados aos sacos com fita adesiva, garantindo que não ocorresse troca de gases por outro local que não os tampões.

4.1.4. Substrato para crescimento e produção das enzimas

Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, cedidos por estabelecimentos do setor agroindustrial da região, foram lavados com água destilada e secos em estufa a 55°C durante 48 horas e posteriormente homogeneizados.

Foram utilizados 5 g de substrato por fermentador, dos quais 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar e 2,5 g de farelo de trigo, adicionados de 5 mL da solução nutriente, o que corresponde a um substrato com 50% de base úmida. Em seguida foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atmosfera durante 30 minutos. O bagaço de cana-de-açúcar foi previamente separado em peneira granulométrica, e utilizou-se a fração maior que 2 mm.

4.1.5. Inóculo

4.1.5.1. Termofílicos

Após o tempo ótimo de incubação do pré-inóculo foi adicionado 50 mL de solução salina seguido de cuidadosa raspagem com alça de platina esterilizada por chama até o rubro, para obtenção de suspensão micelial. A suspensão micelial foi triturada em blender autoclavado, a fim de se obter um inóculo mais homogêneo. Em seguida, transferiram-se estes 50 mL para um erlenmeyer autoclavado contendo 100 mL da mesma solução, totalizando 150 mL de inóculo. Finalmente, 15 mL da suspensão micelial foram transferidos para cada saco fermentador, totalizando 20 mL de solução salina e, dessa forma, 80% de umidade final do substrato. Todo o processo foi feito em duplicata para cada fungo termofílico.

4.1.5.2. Mesofílicos

Após o tempo ótimo de incubação do pré-inóculo (7 dias) adicionou-se 50 mL da solução salina em cada erlenmeyer com o fungo já esporulado e os esporos foram então cuidadosamente suspensos por raspagem com alça de platina esterilizada em chama até o rubro.

Para a padronização da quantidade de esporos em cada fermentador, 1 µL da suspensão foi colocado em uma câmara de Neubauer, seguida da contagem em microscópio ótico. Inoculou-se volumes de suspensão padronizados com $5,0 \times 10^7$ esporos e, em seguida, os meios foram completados com solução salina para um volume final de 20 mL, sendo suficiente para umedecer o meio de fermentação sem a

presença de água livre (80% de umidade). Esta etapa também foi feita em duplicata para cada fungo mesofílico.

4.1.6. Fermentação em estado sólido

Foram inoculados e incubados 20 sacos fermentadores para cada fungo testado durante um período de 10 dias, sendo que a cada 24 horas dois fermentadores de cada microrganismo foram retirados para a extração enzimática. O fungo *T. aurantiacus* foi incubado a 50 °C, o *T. lanuginosus* a 45 °C, e os dois mesofílicos, *P. viridicatum* e *T. reesei*, foram incubados a 28 °C.

4.2. Extração enzimática

Os extratos enzimáticos brutos foram extraídos através da adição de 100 mL de água destilada, maceração para a destruição das estruturas miceliares, seguida da transferência da suspensão para erlenmeyers de 250 mL e agitação em shaker a 100 rpm por 1 hora.

Após a agitação as amostras foram centrifugadas a 10000 g durante 20 minutos a 5 °C, para a remoção das células. Finalmente, o extrato enzimático foi filtrado a vácuo, e estocado a -20 °C até a sua utilização para as atividades enzimáticas.

4.3. Determinação das atividades enzimáticas

4.3.1. Avicelase

A atividade de avicelase foi determinada com 0,1 mL do extrato enzimático convenientemente diluído, 0,9 mL de avicel 1,0% (Sigma) em tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para os termofílicos e 45 °C para os mesofílicos. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de DNS (ácido 3,5- dinitrossalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 8,0 mL de água destilada, finalmente a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER,1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação, de acordo com a quantificação com a curva padrão do açúcar redutor correspondente.

4.3.2. CMCase

A atividade de CMCase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.1. avicelase, exceto o substrato que foi substituído pela carboximetilcelulose a 1% (Sigma).

4.3.3. Xilanase

A atividade de xilanase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.1. avicelase, exceto o substrato que foi substituído pela xilana a 1% (Xylan Birchwood, Sigma).

4.3.4. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi composta de 50 μ L do extrato enzimático bruto, convenientemente diluído, 250 μ L de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma) e 250 μ L de solução tampão ácido acético/NaOH 0,1 M e pH 5,0, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para os termofílicos e 45 °C para os mesofílicos . A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de Na₂CO₃ 2 M, e o nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

4.3.5. β -xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.5. β -glicosidase, exceto o substrato que foi substituído pelo 4-nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, Sigma).

4.3.6. Arabinofuranosidase

A atividade de arabinofuranosidase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.5. β -glicosidase, exceto o substrato que foi substituído pelo 4-nitrofenol- β -D-arabinofuranosídeo 4 mM (PNPA, Sigma).

4.3.7. Atividade de papel de filtro (PFase)

A atividade de papel de filtro foi determinada medindo a liberação de açúcares redutores na mistura de reação contendo papel de filtro Whatman n° 1 (1,0 cm x 6,0 cm = 50 mg) como substrato em 0,9 mL de tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0 e 0,1 mL de extrato enzimático devidamente diluído. A reação ocorreu a 60 °C para os termofílicos e 45 °C para os mesofílicos, durante 60 minutos em banho termostático com agitação (150 rpm). A reação foi paralisada em banho de gelo e pela adição de 1,0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 8,0 mL de água destilada, finalmente a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER,1959). Uma unidade (U) de atividade PFase corresponde a 1,0 μ mol de açúcar redutor liberado por minuto de reação sob as condições de ensaio, quantificado de acordo com a curva padrão de glicose.

4.3.8. Poligalacturonase (PGase)

A atividade de poligalacturonase foi determinada pela mistura de reação contendo 0,2 mL de extrato enzimático devidamente diluído, 0,8 mL de solução tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0, contendo 1,0% de pectina (Sigma) com 64-72% de esterificação. A mistura de reação foi mantida a 60°C para os termofílicos e 45 °C para os mesofílicos, durante 10 minutos, e o açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico) foi quantificado pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de PGase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μ mol de ácido D-galacturônico por minuto, sob as condições do ensaio.

4.3.9. Lacase

A atividade de lacase foi determinada a partir da oxidação do 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS), de acordo com Buswell; Cai; Chang (1995). A mistura de reação foi composta por 0,1 mL da solução enzimática, 0,1 mL de tampão acetato (0,1 M, pH 3,5) e 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v), mantidos a 50 °C (termofílicos) e 37 °C (mesofílicos), por 1 minuto. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0 μ mol de ABTS por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado de $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3.10. Manganês Peroxidase

Para a determinação da atividade de manganês peroxidase (Mn-P), a mistura de reação foi composta por 0,1 mL de solução enzimática, 0,8 mL de tampão lactato de sódio (0,05 M, pH 3,5) e 0,1 mL de solução de MnSO₄ (0,5 mM). A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (40 μmol) e mantida a 50 °C, por 10 minutos. A absorbância foi medida a 240 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn⁺³ por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $8,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (GLENN; AKILESWAREAN; GOLD, 1986; AITKEN; IRVINE, 1990).

4.3.11. Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade de lignina peroxidase foi determinada a 50 °C (termofílicos) e 37 °C (mesofílicos), utilizando-se mistura de reação composta por 0,1 mL da solução enzimática, 0,8 mL de solução tampão tartarato de sódio (0,05 M, pH 3,5) e 0,1 mL de solução de álcool veratrílico (40 mM). A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, foi medido a 310 nm, após 10 minutos de incubação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (TIEN; KIRK, 1998).

4.4. Determinação quantitativa de açúcares redutores solúveis

A determinação quantitativa de açúcar redutor foi realizada utilizando o método de Somogyi-Nelson (1944), utilizando glicose como padrão.

4.5. Determinação quantitativa de açúcares totais

A dosagem de açúcares totais foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956), utilizando glicose como padrão.

4.6. Determinação quantitativa de proteína

O teor total de proteína foi quantificado utilizando o método de Hartree-Lowry (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.

4.7. Concentração do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto foi concentrado por precipitação das proteínas com 75% de etanol. Em 100 mL de extrato bruto adicionou-se vagarosamente 300 mL de álcool etílico anidro e deixou-se descansar por 12 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 10.000 g, 0 °C por 20 minutos, e eliminou-se o sobrenadante. O precipitado (proteínas) foi ressuspensionado em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, obtendo-se uma concentração final de 10x. O extrato enzimático concentrado foi estocado a -20 °C até o momento da utilização.

4.8. Determinação da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar a ser pré-tratado

A partir do bagaço de cana-de-açúcar que foi utilizado no processo de fermentação, ou seja, previamente lavado e seco (estufa a 50 °C por 48 horas), separou-se o mesmo em peneira granulométrica em três frações: menor que 0,59 mm, entre 0,59 e 2,0 mm e maior que 2,0 mm. Pesou-se 5 g de cada fração do bagaço em erlenmeyers de 250 mL, acrescentando 45 mL de água destilada para a amostra controle e 45 mL de HCl 0,1 M para o pré-tratamento ácido. O bagaço foi submetido a um tratamento térmico em autoclave a 121 °C, 1 atmosfera por 30 minutos. Em seguida, separou-se o bagaço da fração líquida e este foi lavado, seco e estocado em câmara fria a 5 °C. A fração líquida foi centrifugada a 10000 g durante 20 minutos a 5 °C para eliminar pequenas partículas de bagaço remanescentes e o sobrenadante foi estocado a -20 °C para posterior análise de açúcares redutores e cromatografia de papel.

4.9. Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para hidrólise

O bagaço de cana-de-açúcar previamente lavado e seco foi separado em peneira granulométrica de 0,59 mm, aproveitando-se a porção que conseguiu atravessar a malha da peneira. Em seguida, 5 g de bagaço foram pesados em erlenmeyers de 250 mL, acrescentando 100 mL das seguintes soluções: água destilada (controle), HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, H₂O₂ e NaOH, todas na concentração 0,1 M.

O bagaço foi submetido a um tratamento térmico ácido em autoclave a 121 °C, 1 atmosfera por 30 minutos. Secou-se o bagaço em estufa a 50 °C por 24 horas, e o estocou em câmara fria a 5 °C até a sua utilização. A fração líquida do pré-tratamento foi centrifugada a 10000 g durante 20 minutos a 5 °C para eliminar as pequenas

partículas de bagaço remanescentes e o sobrenadante foi estocado a -20 °C para posterior análise de açúcares redutores.

4.10 Pré-tratamento com explosão a vapor

Um bagaço pré-tratado com explosão a vapor (EV), cedido pela Usina Estiva, localizada em Novo Horizonte, também foi selecionado para a hidrólise enzimática. A usina utiliza um reator vertical em formato de cone de aproximadamente 5 m³ com capacidade para 730 kg de bagaço. As condições do pré-tratamento foram: bagaço com 50% de umidade, 6 minutos de cozimento, pressão de 18 kgf/cm³ a uma temperatura de 280 °C. Este bagaço também foi estocado em câmara fria e, parte dele, foi previamente lavado e seco (estufa a 50 °C por 48 horas) antes da estocagem.

4.11. Determinação do teor de umidade

Para calcular a eficiência da sacarificação enzimática, somente as frações hidrolisáveis (celulose e hemicelulose) e que fornecem os açúcares de interesse (glicose e xilose) foram levadas em consideração. Neste caso, estimou-se que o bagaço contém 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000a), além do teor de umidade presente, que também deve ser eliminado para efeito de cálculo.

Sendo assim, avaliou-se os teores de umidade do bagaço comum esterilizado, e daqueles que sofreram o pré-tratamento de explosão a vapor, tanto o que foi lavado (bagaço EV lavado) antes da hidrólise, como aquele que foi diretamente estocado (bagaço EV original).

Com esses dois últimos bagaços, também foram determinados os teores de glicose, açúcar redutor e açúcar total. Para isso, pesou-se 0,1 g de cada bagaço em erlenmeyers de 50 mL, adicionou-se 5 mL de água destilada e os colocou em agitação a 150 rpm por duas horas. Em seguida, realizou-se uma filtração a vácuo, na qual se adicionaram outros 5 mL de água para remover todo o conteúdo do erlenmeyer. O papel de filtro, contendo o bagaço, foi colocado em estufa para a posterior determinação de perda de peso. A solução, com 10 mL, foi estocada a -20 °C até a quantificação dos açúcares anteriormente mencionados.

4.12. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi conduzida de três formas diferentes:

- A primeira delas foi realizada em erlenmeyers de 50 mL, contendo 0,2 g de bagaço de cana com granulometria menor que 0,59 mm proveniente do pré-tratamento controle (esterilização com água). Foram adicionados 1, 2, 4 ou 6 mL de extrato enzimático bruto em cada erlenmeyer e completou-se para 10 mL de volume final com tampão ácido acético/NaOH 0,2 M pH 5,0. Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 150 rpm.

- No segundo caso, a hidrólise enzimática foi conduzida em pequenos tubos com rolha, porém devido ao tamanho limitante destes, houve a necessidade de reduzir o conteúdo total da solução. Sendo assim, reduziram-se à metade os valores anteriores, pesando-se 0,1 g do bagaço e adicionando 1, 2 ou 3 mL de extrato enzimático bruto em cada tubo e completando para 5 mL de volume final com tampão ácido acético/NaOH 0,2 M pH 5,0. Os tubos foram acondicionados em banho termostático apropriado e equipado com agitador a 150 rpm. Nesta hidrólise utilizou-se o bagaço pré-tratado com explosão a vapor. Em ambos os casos as hidrólises foram conduzidas a 60 °C (termofílicos) e 40 °C (mesofílicos).

- A terceira hidrólise foi realizada com a mistura dos extratos enzimáticos brutos de *Thermoascus aurantiacus* e de *Trichoderma reesei*. O processo foi realizado em erlenmeyers de 125 mL, pesando-se 0,5 g de bagaço pré-tratado com explosão a vapor, adicionando 5, 10 ou 15 mL da mistura de extrato enzimático (1:1) e completando para 25 mL de volume final com tampão ácido acético/NaOH 0,2 M pH 5,0. Por se tratar de um fungo termofílico e um mesofílico, respectivamente, optou-se por conduzir a hidrólise intercalando-se os erlenmeyers a cada 30 minutos em dois banhos termostáticos equipados com agitador (150 rpm), sendo um deles ajustado a 60 °C e o outro a 40 °C.

Em todas as hidrólises, as amostras dos hidrolisados foram retiradas após 1, 2, 4 e 6 horas para a quantificação dos açúcares redutores por Somogy-Nelson (1944).

4.13. Determinação de fenóis totais

O índice de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004), no qual a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico em meio básico se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolframio e molibdeno. O reagente de Folin-Ciocalteu tem sua coloração alterada de amarela para azul na presença de

compostos fenólicos e a intensidade da coloração azul segue a Lei de Lambert-Beer (VINSON et al., 2001; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007).

A reação foi composta por 100 µL da amostra do extrato, 500 µL de Folin-Ciocalteu, 7,5 mL de água deionizada, após 10 minutos, em um lugar escuro à temperatura ambiente, acrescentou-se 1,5 mL de carbonato de sódio (20%) e após 20 minutos foi feita a leitura da absorbância medida em 755 nm (YU et al., 2002; KUSKOSKI et al., 2005; SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007). O resultado foi expresso em concentração de polifenóis correspondente a ácido vanílico e a análise foi realizada em triplicata.

4.14. Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC

O furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) estão entre os produtos de degradação do material lignocelulósico e, desta forma, foram quantificados por HPLC Dionex bomba P680, acoplado a um degaseificador Dionex DG-1210 e um detector UV/Vis UV-975. Os cromatogramas foram construídos utilizando-se o software StarChromatography 4.0 Varian. Os hidrolisados foram previamente filtrados em membrana Millipore 0,22 µm e submetidos a um método proposto por Dogaris et al (2009) modificado, usando uma coluna C8 fase reversa (Dionex 208 SPTM 4,6 x 250 mm 90Å 5 µ) e o detector ajustado a 280 nm. O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura da coluna ajustada a 40 °C. O fluxo foi de 0,8 mL/minuto e a fase móvel com o solvente A (água deionizada) e B (metanol Dinâmica 99,8%). A eluição foi por gradiente partindo de 100% de A até 60% de A e 40% de B em 25 minutos. A quantificação foi feita por padronização externa com os padrões de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

4.15. Determinação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática

As análises dos carboidratos foram feitas usando HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA), equipado com amostrador automático AS40, coluna de troca aniônica CarboPac PA-1. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes pulsos potenciais e durações: E₁= 0,10V (t₁=0,40s); E₂= -2,00V (t₂=0,02s); E₃= 0,60V (t₃=0,01s); E₄= 0,10V (t₄=0,06s). Os diluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ) e degaseificada com N₂. O fluxo foi de 1 mL/minuto com solvente A (200 mM de NaOH), solvente B (água ultra pura) e solvente C (500 mM de acetato de sódio com 150 mM de NaOH). Com eluição isocrática de 0 a

14 minutos com 5% de A, 95% de B e 0% de eluente C. Após 14 minutos a eluição foi por gradiente até 30 min chegando a 90% de A, 0% de B e 10% de C. Para as análises dos açúcares foram usados padrões de glicose, xilose, galactose, arabinose, xilobiose e celobiose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividades enzimáticas

4.1.1. Avicelase

Dentro da metodologia proposta para a análise das atividades enzimáticas, não foi possível detectar atividade de avicelase em nenhum dos extratos enzimáticos.

5.1.2. CMCase

Apesar de não se observar um pico bem definido, o fungo *T. aurantiacus* apresentou atividade de CMCase muito superior a todos os demais fungos, chegando a uma produção de 536 U/g (26,8 U/mL) em 120 horas de fermentação. Dentre os mesofílicos, o fungo *T. reesei* foi o melhor produtor, com 56 U/g (2,7 U/mL) em 168 horas, enquanto o fungo *P. viridicatum* apresentou uma produção ainda mais baixa durante os 10 dias de fermentação, atingindo o pico após 96 horas, com produção de 16,9 U/g (0,8 U/mL). Já o outro termofílico, *T. lanuginosus*, não apresentou quantidades apreciáveis para a detecção pelo método proposto (Figura 9).

Kalogeris et al., (2003) estudaram a produção de CMCase e β -glicosidase por *T. aurantiacus* em diversos resíduos agroindustriais (palha de trigo, palha de arroz, espiga de milho e farelo de aveia). A palha de trigo foi a fonte de carbono mais eficiente para produção dessas enzimas, obtendo 1235 U/g de CMCase e 105 U/g de β -glicosidase.

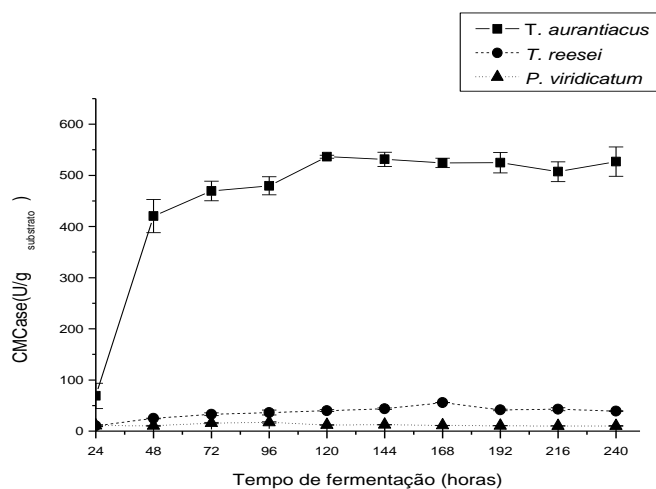


Figura 9: Produção de CMCase por *T. aurantiacus*, *T. reesei* e *P. viridicatum*.

5.1.3. Xilanase

Os quatro fungos avaliados produziram a enzima xilanase, com as maiores atividades encontradas nos extratos dos termofílicos. Dentre eles, o fungo *T. aurantiacus* novamente destacou-se como o melhor produtor, atingindo o pico de produção após 120 horas de fermentação com 3.419 U/g (171 U/mL). Já o fungo *T. lanuginosus* teve sua máxima produção em 168 horas com o valor de 755 U/g (38 U/mL).

Entre os mesofílicos o melhor produtor foi fungo *T. reesei*, com 538 U/g (27 U/mL) em 192 horas, enquanto o fungo *P. viridicatum* produziu 308 U/g (15,4 U/mL) em 96 horas (Figura 10).

Em trabalho realizado por Rezende *et al.* (2002), visando a produção de xilanase por *Trichoderma harzianum* Rifai, realizou-se a fermentação em estado solido em bagaço de cana-de-açúcar, e obtiveram uma produção de 15 U/mL.

Por apresentar vantagens como estabilidade térmica e pH ótimo próximo ao neutro, Puchart *et al.*, (1999) estudaram diversas cepas de *T. lanuginosus* para a produção de xilanase e outras enzimas hemicelulolíticas. Quando cultivados em meio sintético de xilana, esses autores obtiveram a produção de 1.613 U/mL, mostrando um alto potencial desse fungo.

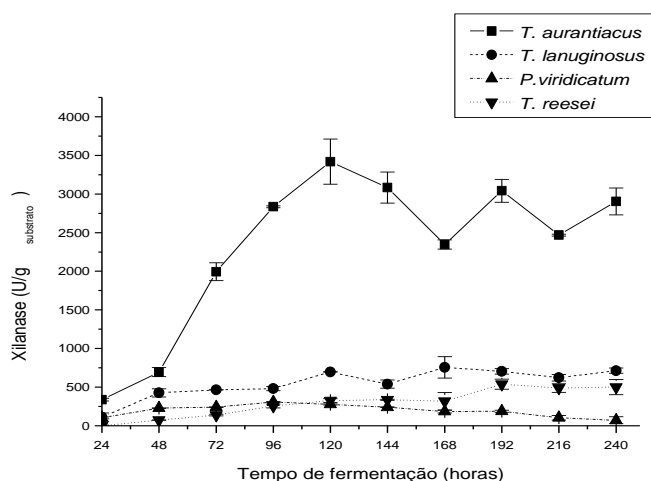


Figura 10: Produção de Xilanase por *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.1.4. β -glicosidase

Em três dos quatro fungos avaliados detectou-se quantidades apreciáveis da enzima β -glicosidase. Os termofílicos foram novamente os melhores produtores, com 83 U/g (4,2 U/mL) em 216 horas para o fungo *T. lanuginosus*, e 77 U/g (3,9 U/mL) em

120 horas para o fungo *T. aurantiacus*. Na figura 11 observa-se que o fungo *T. aurantiacus* produziu as maiores quantidades da enzima nos primeiros dias de fermentação, decaindo com o tempo, enquanto o fungo *T. lanuginosus* apresentou uma curva de produção inversa, onde as maiores atividades foram detectadas após o 5º dia de fermentação.

O terceiro melhor produtor foi o fungo *P. viridicatum*, com 65 U/g (3,2 U/mL) em 216 horas de fermentação, enquanto o fungo *T. reesei* apresentou uma baixa produção, com 4,44 U/g em 216 horas (Figura 12).

Martins *et al.*, (2008) estudaram a produção de celulasas pelo fungo *Penicillium echinulatum* através de fermentação submersa em meio contendo farelo de trigo por 8 dias, e para a enzima β -glicosidase obtiveram a produção de 0,31 U/mL.

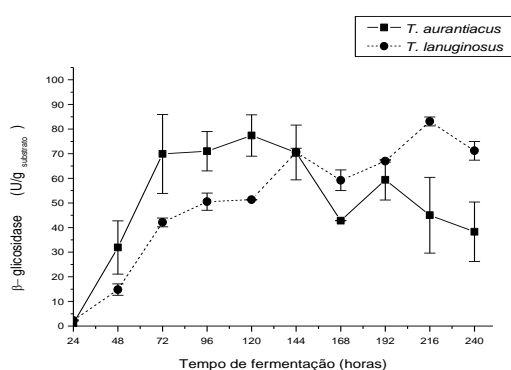


Figura 11: Produção de β -glicosidase por *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*.

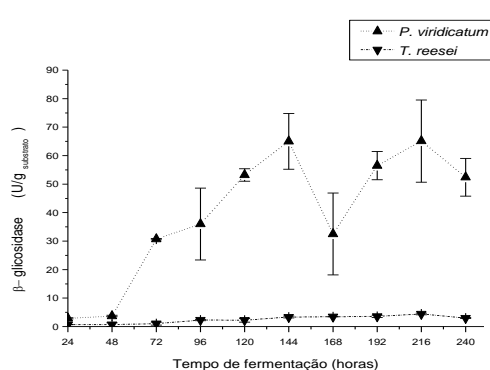


Figura 12: Produção de β -glicosidase por *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.1.5. β -xilosidase

Os fungos termofílicos foram os melhores produtores da enzima β -xilosidase, embora a produção de ambos tenha sido modesta, quando comparadas com a de outras enzimas. O fungo *T. aurantiacus* apresentou uma produção crescente da enzima, atingindo o pico somente no décimo dia de fermentação, com 21 U/g. Já o fungo *T. lanuginosus* atingiu seu pico logo no segundo dia de fermentação, com 9,8 U/g (Figura 13).

A produção de β -xilosidase pelos mesofílicos foi ainda mais baixa, na qual ambos atingiram sua produção máxima em 96 horas, com 4,6 U/g pelo fungo *P. viridicatum*, e apenas 0,91 U/g pelo fungo *T. reesei* (Figura 14).

Puchart *et al.*, (1999) avaliaram a produção de β -xilosidase por 17 cepas de *T. lanuginosus*, e obtiveram a produção de 1,26 U/mL e 1,50 U/mL da enzima em meio sintético com xilana e espiga de milho, respectivamente.

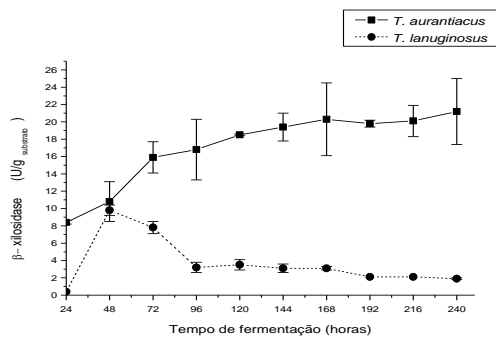


Figura 13: Produção de β -xilosidase por *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*.

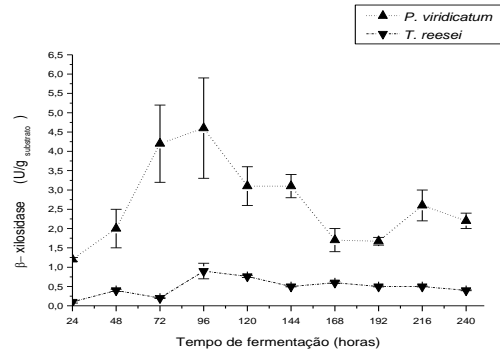


Figura 14: Produção de β -xilosidase por *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.1.6. Poligalacturonase (PGase)

A atividade de poligalacturonase foi detectada nos extratos enzimáticos do quarto fungos avaliados, sendo que as maiores produções sempre ocorreram até o terceiro dia de fermentação. O fungo *T. aurantiacus* merece destaque por ter alcançado uma alta produção quando comparado aos demais, produzindo 118 U/g (5,9 U/mL) em 72 horas de fermentação. O segundo melhor produtor foi o fungo *T. reesei*, com pico de produção de 36 U/g (1,8 U/mL) também em 72 horas. Os fungos *P. viridicatum* e *T. lanuginosus* apresentaram as curvas de produção mais próximas, com picos de 25 U/g (1,2 U/mL) e 22 U/g (1,1 U/mL), em 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 15).

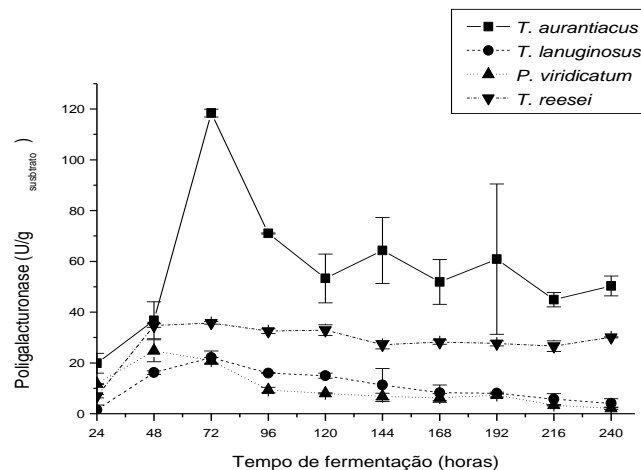


Figura 15: Produção de poligalacturonase por *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.1.7. Lacase / Manganês Peroxidase / Lignina Peroxidase

Dentro da metodologia proposta para a análise das atividades enzimáticas, não foi possível detectar atividade em nenhum dos extratos enzimáticos.

5.1.8. Resumo das produções enzimáticas obtida por cada fungo

Os tabelas 3 e 4 sintetizam os resultados obtidos na fermentação em estado sólido, elucidando os picos de produções enzimáticas obtidos por cada fungo avaliado.

Tabela 3: Resumo dos tempos de melhor produção e respectivas atividades de cada enzima dos fungos termofílicos.

| Enzima | <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756 | | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | |
|----------------------|---|-------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | Tempo (h) | Atividade | Tempo (h) | Atividade |
| CMCase | 120 | 536 U/g (27 U/mL) | - | - |
| β -glicosidase | 120 | 77 U/g (3,9 U/mL) | 216 | 83 U/g (4,2 U/mL) |
| Xilanase | 120 | 3.419 U/g (171 U/mL) | 168 | 755 U/g (37,7 U/mL) |
| β -xilosidase | 240 | 21 U/g (1,1 U/mL) | 48 | 9,8 U/g (0,5 U/mL) |
| Poligalacturonase | 72 | 118 U/g (5,9 U/mL) | 72 | 22 u/g (1,1 U/mL) |

Tabela 4: Resumo dos tempos de melhor produção e respectivas atividades de cada enzima dos fungos mesofílicos.

| Enzima | <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3 | | <i>Trichoderma reesei</i> QM9414 | |
|----------------------|--|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| | Tempo (h) | Atividade | Tempo (h) | Atividade |
| CMCase | 96 | 17 U/g (0,8 U/mL) | 168 | 56 U/g (2,7 U/mL) |
| β -glicosidase | 216 | 65 U/g (3,2 U/mL) | 216 | 4,4 U/g (0,2 U/mL) |
| Xilanase | 96 | 308 U/g (15,4 U/mL) | 96 | 538 U/g (26,9 U/mL) |
| β -xilosidase | 96 | 4,6 U/g (0,2 U/mL) | 192 | 0,9 U/g (0,05 U/mL) |
| Poligalacturonase | 48 | 25 U/g (1,2 U/mL) | 72 | 36 u/g (1,8 U/mL) |

5.2. Determinação quantitativa de açúcar redutor solúvel

Com exceção do fungo *T. lanuginosus* (Figura 16) que apresentou uma curva de quantificação dos açúcares redutores distinta dos demais, os outros três fungos apresentaram uma característica comum entre si, que foi a de haver uma maior concentração de açúcares no primeiro dia de fermentação, seguida de uma queda nos dias seguintes. Desta forma, nos extratos enzimáticos de *T. reesei*, *P. viridicatum* (Figura 17) e *T. aurantiacus*, após 24 horas de fermentação, quantificou-se: 0,84 mg/mL, 0,71 mg/mL e 0,66 mg/mL de açúcares redutores, respectivamente. Para o fungo *T. lanuginosus*, a maior quantificação de açúcares redutores ocorreu em 240 horas de fermentação, com 0,26 mg/mL.

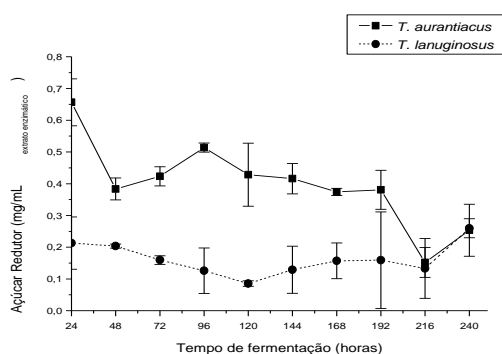


Figura 16: Quantificação de açúcar redutor solúvel nos extratos de *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*.

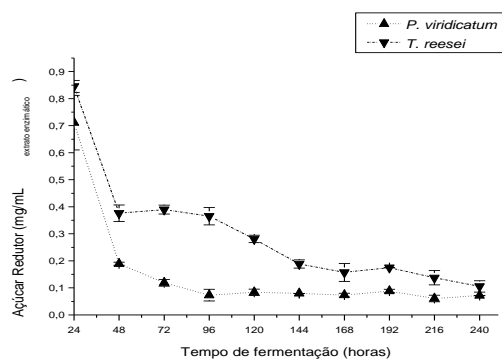


Figura 17: Quantificação de açúcar redutor solúvel nos extratos de *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.3. Determinação quantitativa de açúcares totais

As curvas de quantificação dos açúcares totais revelaram um comportamento semelhante ao observado com os açúcares redutores. Os extratos dos fungos *T. aurantiacus* (Figura 18), *P. viridicatum* e *T. reesei* (Figura 19) apresentaram um perfil semelhante, com maior quantificação dos açúcares em 24 horas, decaindo com o decorrer do tempo, enquanto o extrato de *T. lanuginosus* apresentou uma curva sem o mesmo padrão, na qual se observa uma maior variação da quantificação de açúcares ao longo da fermentação, além de um grande desvio padrão.

Sendo assim, a quantificação dos açúcares totais (mg/mL) dos extratos de *T. aurantiacus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*, em 24 horas de fermentação, foi de: 1,84; 1,53 e 1,71, respectivamente. O extrato enzimático do *T. lanuginosus* com maior quantificação de açúcares totais ocorreu em 72 horas, com 1,98 mg/mL.

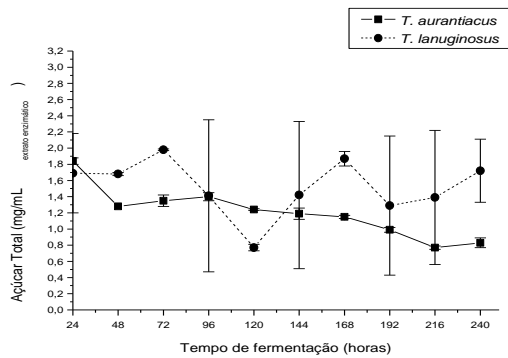


Figura 18: Quantificação de açúcares totais nos extratos de *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*.

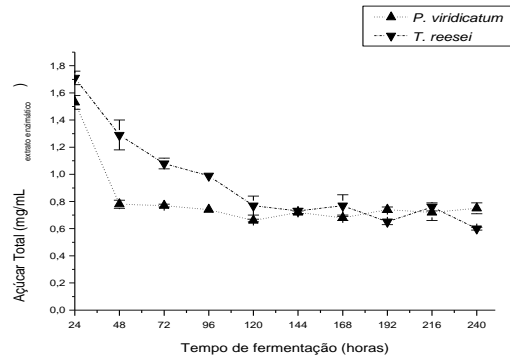


Figura 19: Quantificação de açúcares totais nos extratos de *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.4. Determinação quantitativa de proteína

A produção de proteínas durante o processo fermentativo também foi acompanhada, e as curvas de proteínas totais dos quatro fungos estão representadas abaixo. Os fungos *T. aurantiacus* (Figura 20) e *T. reesei* (Figura 21) produziram as maiores quantidades de proteína, que variou na faixa de 300 a 400 $\mu\text{g/mL}$ para ambos. Já os fungos *T. lanuginosus* e *P. viridicatum* também produziram quantidades similares, porém bem menores, variando aproximadamente de 100 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

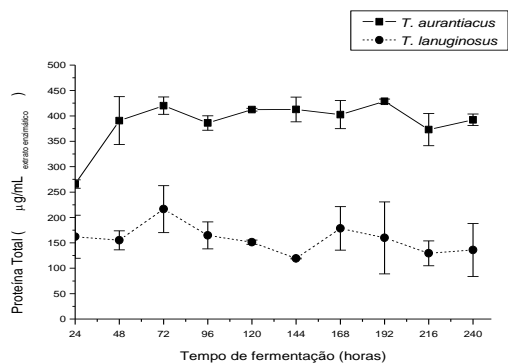


Figura 20: Quantificação de proteínas totais nos extratos de *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*.

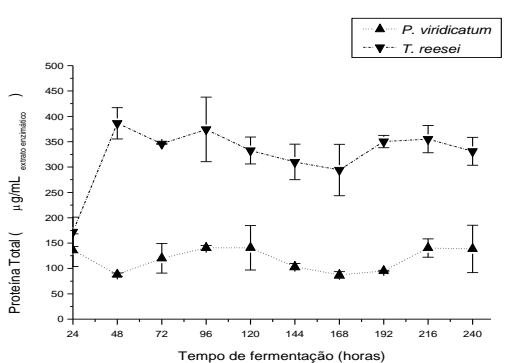


Figura 21: Quantificação de proteínas totais nos extratos de *P. viridicatum* e *T. reesei*.

5.5. Produção dos extratos enzimáticos para a hidrólise

Uma vez determinado o perfil de produção enzimática dos quatro fungos avaliados, realizou-se uma nova fermentação para a obtenção dos extratos enzimáticos a serem utilizados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. As mesmas

condições da fermentação anterior foram mantidas e a quantificação das enzimas, açúcares e proteínas nesses extratos também foram avaliadas.

Os extratos de *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus* foram extraídos no 5° e 7° dia de fermentação, respectivamente, enquanto que para ambos mesofílicos, *P. viridicatum* e *T. reesei*, utilizou-se o 9° dia.

O perfil de produção desses extratos encontra-se nos tabelas 5 e 6. A partir das tabelas é possível notar que ocorreram mudanças nas atividades de algumas enzimas em relação a fermentação anterior, aumentando ou diminuindo a quantificação das mesmas. Isso é possível devido à existência de variáveis do processo fermentativo, que vão desde a origem e número de repiques que o fungo passou, até a origem do substrato para a fermentação e contagem do número de esporos, por exemplo.

Tabela 5: Perfil enzimático dos extratos de *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*.

| Dia | Avicelase (U/g) | CMCase (U/g) | β-glicosidase (U/g) | Xilanase (U/g) | β- xilosidase (U/g) | Poligalacturonase (U/g) | Arabinofuranosidase (U/g) | FPase (U/g) | |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------|---|---------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-------|
| <i>T. aurantiacus</i> | 5 | 0 | 534,88 | 13,83 | 3880,95 | 3,34 | 33,47 | 32,36 | 10,01 |
| <i>T. lanuginosus</i> | 7 | 0 | 1,23 | 89,91 | 991,00 | 0,49 | 6,81 | 0,00 | 3,13 |
| <i>P. viridicatum</i> | 9 | 0 | 9,23 | 13,34 | 115,85 | 1,40 | 3,53 | 1,51 | 4,88 |
| <i>T. reesei</i> | 9 | 0 | 54,28 | 3,51 | 639,82 | 1,58 | 28,12 | 31,65 | 9,55 |

Tabela 6: Determinação de pH, proteínas e açúcares nos extratos de *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*.

| | Dia | pH | Proteína (μg/mL) | Açúcar Redutor (mg/mL) | Açúcar Total (mg/mL) |
|-----------------------|------------|-----------|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>T. aurantiacus</i> | 5 | 6,05 | 462,83 | 0,36 | 1,07 |
| <i>T. lanuginosus</i> | 7 | 7,30 | 259,45 | 0,30 | 1,57 |
| <i>P. viridicatum</i> | 9 | 7,54 | 82,90 | 0,04 | 0,66 |
| <i>T. reesei</i> | 9 | 6,21 | 348,34 | 0,15 | 0,59 |

5.6. Concentração do extrato enzimático bruto

Além do extrato bruto, também foi utilizado na hidrólise do bagaço o extrato concentrado desses fungos. Para isso, realizou-se a precipitação das proteínas com etanol. Para confirmar a eficiência da precipitação, avaliou-se novamente as atividades das principais enzimas envolvidas na hidrólise (Tabela 7).

Tabela 7: Atividades enzimáticas dos extratos concentrados de *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*.

| EXTRATO CONCENTRADO 10X | Dia | CMCase (U/g) | β -glicosidase (U/g) | Xilanase (U/g) | PFase (U/g) |
|-------------------------|-----|--------------|----------------------------|----------------|-------------|
| <i>T. aurantiacus</i> | 5 | 932(1,7x) | 85 (6,1x) | 30.114 (7,6x) | 57 (5,7x) |
| <i>T. lanuginosus</i> | 7 | 96 (78,4x) | 507 (5,6x) | 8.934 (9,0x) | 9,4 (3,0x) |
| <i>P. viridicatum</i> | 9 | 24 (2,6x) | 73 (5,5x) | 541 (4,7x) | 1,6 (-3,1x) |
| <i>T. reesei</i> | 9 | 251 (4,6x) | 29,0 (8,3x) | 4.118 (6,4x) | 66 (6,9x) |

Como se observa na tabela 7 o etanol foi eficiente para a precipitação da maioria das enzimas do extrato bruto, com rendimentos entre 50 e 90%. No entanto, a precipitação com etanol mostrou-se menos eficiente para a endoglucanase, com rendimentos abaixo de 50%. Houve apenas perda de atividade de PFase no extrato enzimático de *Penicillium viridicatum*.

5.7. Determinação da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar a ser pré-tratado

A análise da fração líquida do pré-tratamento realizado com água e HCl 0,1 M descrito anteriormente, revelou uma maior concentração de açúcares redutores nas frações de bagaço menor que 0,59 mm e maior que 2,00 mm (Tabela 8). O material lignocelulósico dessas frações possivelmente sofreu uma maior desestruturação, resultando em uma maior liberação de açúcares. Similarmente, a cromatografia em papel, realizada com padrões de glicose, xilose e celobiose, comprovou a presença desses açúcares solubilizados na fração líquida (Figura 22).

Tabela 8: Quantificação dos açúcares redutores na fração líquida proveniente do pré-tratamento de diferentes frações do bagaço de cana-de-açúcar.

| Granulometria (mm) | Controle (Açúcar Redutor µg/mL) | HCl 0,1 M (Açúcar Redutor µg/mL) |
|---------------------------|--|---|
| Bagaço<0,59 | 176 | 659 |
| 0,59<Bagaço<2,00 | 134 | 525 |
| Bagaço>2,00 | 167 | 673 |



Figura 22: Cromatografia de papel com a fração líquida do pré-tratamento térmico com ácido clorídrico 0,1 M. Legenda: A₁(bagaço<0,59 mm); A₂ (0,59<bagaço<2,00 mm); A₃ (bagaço>2,00 mm); C (celobiose); X (xilose); G (glicose).

A partir deste teste, selecionou-se a fração menor que 0,59 mm para a realização das hidrólises enzimáticas.

5.8 Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar

A análise da fração líquida do material lignocelulósico pré-tratado com água quente revelou que apenas uma pequena quantidade de açúcar redutor foi solubilizada, com exceção do pré-tratamento ácido com HCl, no qual foi possível encontrar aproximadamente 14,0 mg/mL de açúcares redutores (Tabela 9).

Tabela 9: Quantificação dos açúcares redutores na fração líquida proveniente do pré-tratamento com diferentes soluções.

| Bagaço pré-tratado | Açúcar Redutor ($\mu\text{g/mL}$) | Desvio Padrão |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| Controle (água) | 53 | 1,58 |
| HCl | $13,91 \times 10^3$ | 451 |
| H ₂ SO ₄ | 47 | 6,79 |
| H ₃ PO ₄ | 32 | 2,51 |
| H ₂ O ₂ | 57 | 0,14 |
| NaOH | 101 | 3,45 |

5.9. Determinação do teor de umidade

Para avaliar a eficiência da hidrólise enzimática, foi necessário determinar o teor de umidade dos bagaços pré-tratados. Além disso, determinaram-se os teores de glicose, açúcares redutores e açúcares totais do bagaço pré-tratado com explosão a vapor. Os resultados obtidos estão expostos nos tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Determinação dos teores de umidade do bagaço comum esterilizado e dos pré-tratados com explosão a vapor.

| Bagaço | Umidade (%) | Desvio Padrão |
|---------------------|-------------|---------------|
| Bagaço esterilizado | 8,4 | 0,47 |
| Bagaço EV lavado | 4,4 | 0,13 |
| Bagaço EV original | 56 | 1,01 |

Tabela 11: Quantificação de açúcares e determinação da perda de peso do bagaço pré-tratado com explosão a vapor.

| Bagaço | Glicose* (%) | Açúcar redutor* (%) | Açúcar total* (%) | Perda de peso (%) |
|--------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Bagaço EV lavado | 0,02 | 0,5 | 0,6 | 15,6 |
| Bagaço EV original | 0,06 | 4,1 | 6,7 | 67 |

*Expresso em termo de bagaço

Os resultados revelaram que o bagaço pré-tratado com explosão a vapor e que foi diretamente estocado (Bagaço EV original) apresentava um alto teor de umidade, além de uma elevada quantidade de açúcares livres. Além disso, a lavagem deste bagaço foi eficiente, ao se observar que o bagaço EV lavado apresentava teor residual de menos de 10% dos açúcares totais.

5.10. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática realizada em agitador orbital revelou a as diferentes capacidades de sacarificação de cada extrato enzimático avaliado. Em relação aos termofílicos, o extrato enzimático do fungo *T. aurantiacus* (Figura 23) foi aproximadamente 14 vezes mais eficiente que o extrato de *T. lanuginosus* (Figura 24). Quanto aos mesofílicos, o fungo *T. reesei* (Figura 25) apresentou uma capacidade hidrolítica cerca de 10 vezes superior ao fungo *P. viridicatum* (Figura 26).

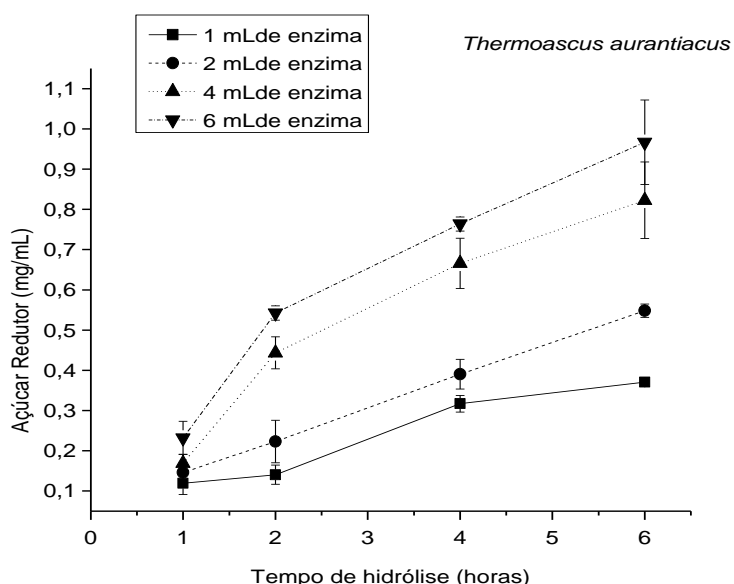


Figura 23: Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de *T. aurantiacus*. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

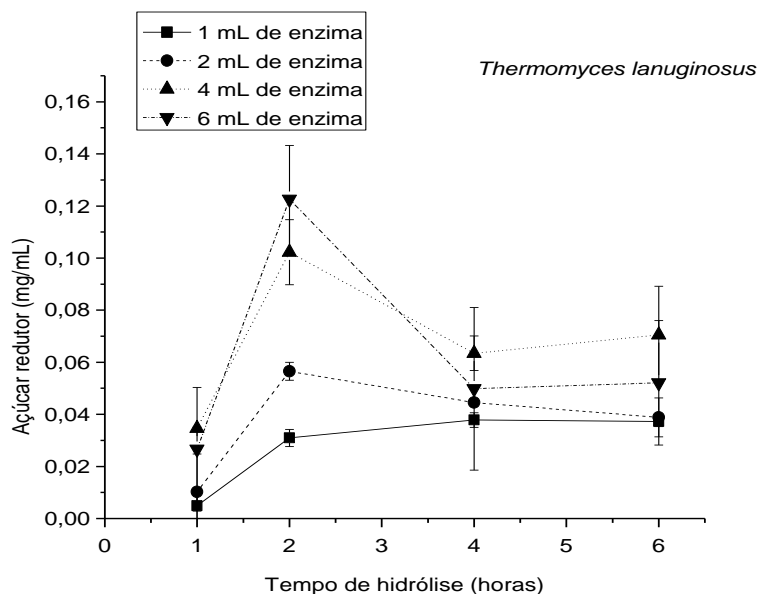


Figura 24: Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de *T. lanuginosus*. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

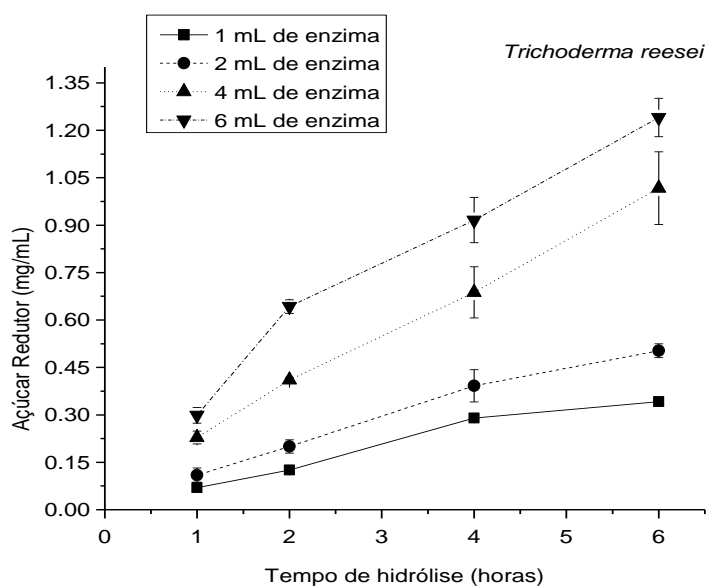


Figura 25: Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de *T. reesei*. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

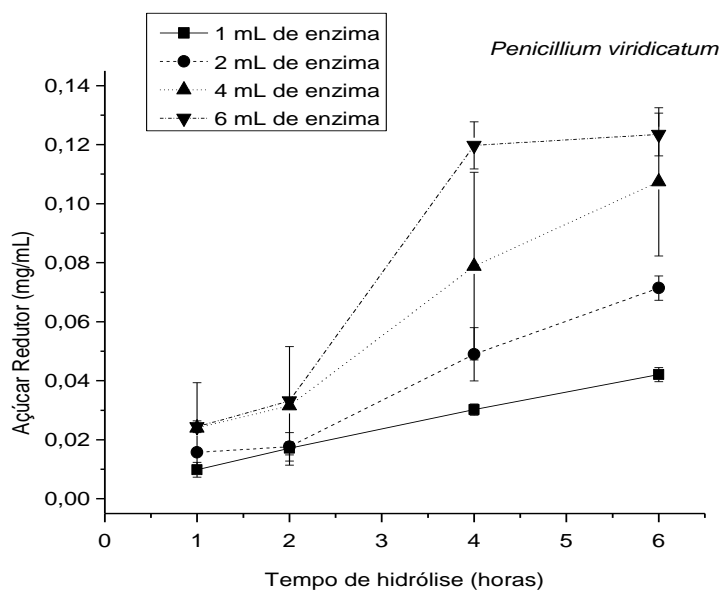


Figura 26: Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente com extrato enzimático de *P. viridicatum*. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

A partir da análise das figuras 22 a 26 é possível observar que o aumento da quantidade de extrato enzimático resultava em um aumento da liberação dos açúcares. Da mesma forma, com o aumento do tempo de hidrólise, maior foi a quantificação dos açúcares, sendo que em nenhum dos casos ocorreu a saturação das enzimas pelo substrato, uma vez que pela projeção das curvas ainda deveria ocorrer um aumento crescente na liberação dos mesmos.

Além disso, ficou evidente o maior poder de sacarificação dos extratos enzimáticos dos fungos *T. reesei* e *T. aurantiacus*, que conseguiram liberar 1,24 e 0,97 mg/mL de açúcares após 6 horas de hidrólise com 6 mL de enzima, respectivamente. Descontando-se o teor de umidade de 8,37% deste bagaço, bem como o teor aproximado de 25% de lignina (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000b), esses extratos conseguiram hidrolisar 9,0 e 7,0% do bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

5.11. Hidrólise com os extratos concentrados

Na tentativa de se obter uma relação enzima/substrato na qual fosse possível observar a saturação da enzima, realizou-se o teste de hidrólise com os extratos enzimáticos concentrados. Desta vez, a hidrólise ocorreu em banho termostático com agitação (150 rpm), em pequenos tubos com rolha, e nas mesmas condições do ensaio realizado no agitador orbital, porém com todos os reagentes reduzidos pela

metade, ou seja, 0,1 g de bagaço esterilizado, extrato enzimático e tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 totalizando um volume de 5 mL. Esta análise foi realizada com os extratos dos fungos *T. reesei* (Figura 27) e *T. aurantiacus* (Figura 28), pois obtiveram os melhores resultados no ensaio anterior.

Diferentes atividades enzimáticas estão presentes no extrato enzimático bruto, assim, para determinar o volume do extrato concentrado a ser utilizado, padronizou-se com base na atividade de xilanase (U totais) presente em cada mL de extrato bruto. Neste experimento foram utilizados dois volumes de enzima: um com 582 U de xilanase, e um outro volume contendo 6 vezes mais (3.492 U).

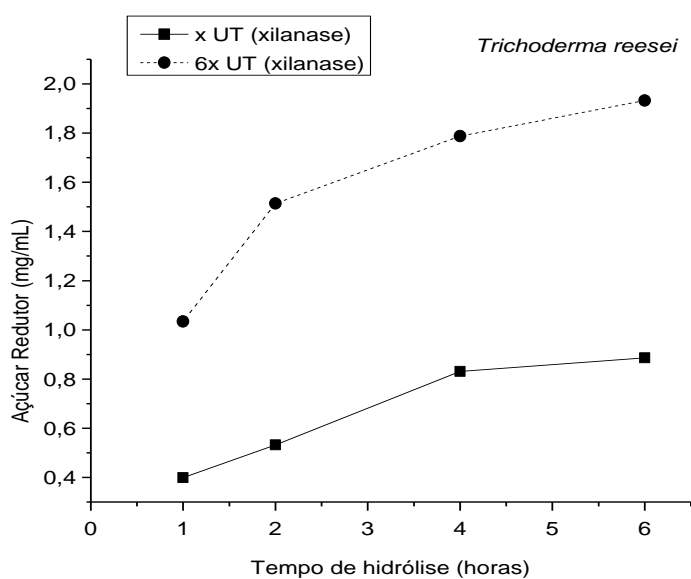


Figura 27: Sacarificação enzimática por *T. reesei* com extrato concentrado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 7.

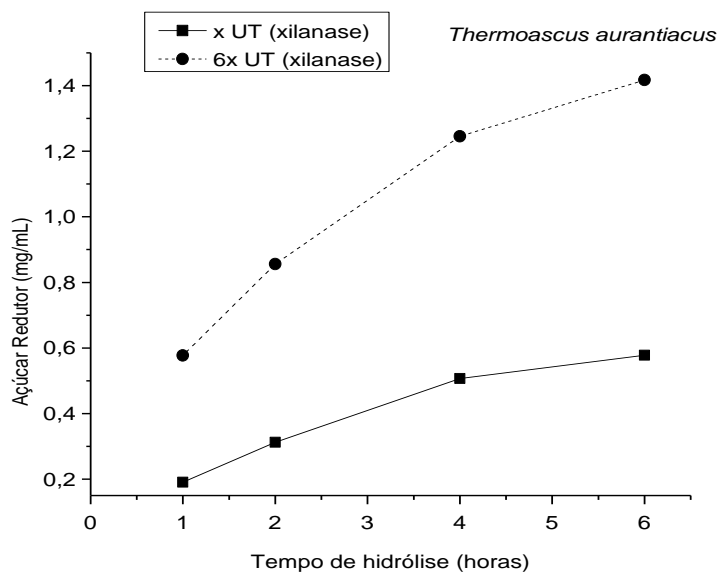


Figura 28: Sacarificação enzimática por *T. aurantiacus* com extrato concentrado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 7.

Com o menor volume de extrato concentrado houve a liberação máxima de 0,89 e 0,58 mg/mL de açúcares após 6 horas de hidrólise, para os fungos *T. reesei* e *T. aurantiacus*, respectivamente.

Ao utilizar o extrato concentrado com 6 vezes mais unidades de xilanase (3.492 U), observou-se um aumento da sacarificação, porém não proporcional ao aumento de unidades enzimáticas. Isto pode ter ocorrido devido à maior sensibilidade da enzima concentrada, que está mais susceptível à desnaturação pela temperatura e agitação e, desta forma, não ficou totalmente ativa durante o processo de hidrólise. Outra possível razão foram as mudanças das condições de ensaio, do agitador orbital para o banho termostático.

No entanto, nestas condições, foi possível obter 1,93 mg/mL com o extrato de *T. reesei* e 1,42 mg/mL com o de *T. aurantiacus* após 6 horas de hidrólise, ou seja, um aumento de 55 e 46% em relação ao teste anterior, respectivamente. Neste ensaio, a eficiência da hidrólise do bagaço foi de 14,0% para o mesofílico e 10,3% para o termofílico. Isto corresponde à geração de 9,65 g de açúcares redutores a cada 100 g de bagaço de cana para o fungo *T. reesei*, ou 7,1 g para o fungo *T. aurantiacus*.

5.12. Hidrólise do bagaço pré-tratado com explosão a vapor

A hidrólise do bagaço pré-tratado com explosão a vapor ocorreu nas mesmas condições do ensaio realizado com os extratos concentrados. Utilizou-se 1, 2 ou 3 mL

dos extratos brutos de *T. aurantiacus* (Figuras 29 e 30) e *T. reesei* (Figuras 31 e 32), completando-se para um volume final de 5 mL com tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0, conforme o segundo modelo da hidrólise enzimática. Foram usados os bagaços explodidos previamente lavado (Bagaço EV lavado) e não lavado (Bagaço EV original).

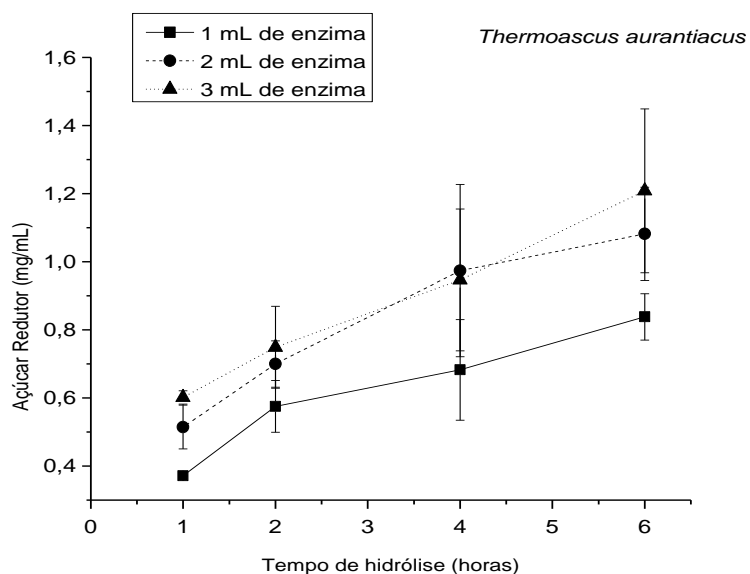


Figura 29: Sacarificação enzimática por *T. aurantiacus* de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

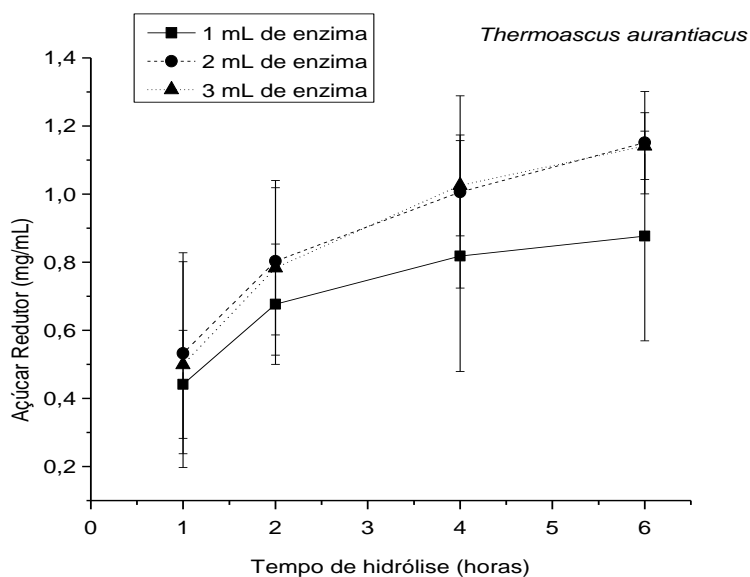


Figura 30: Sacarificação enzimática por *T. aurantiacus* de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e não lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

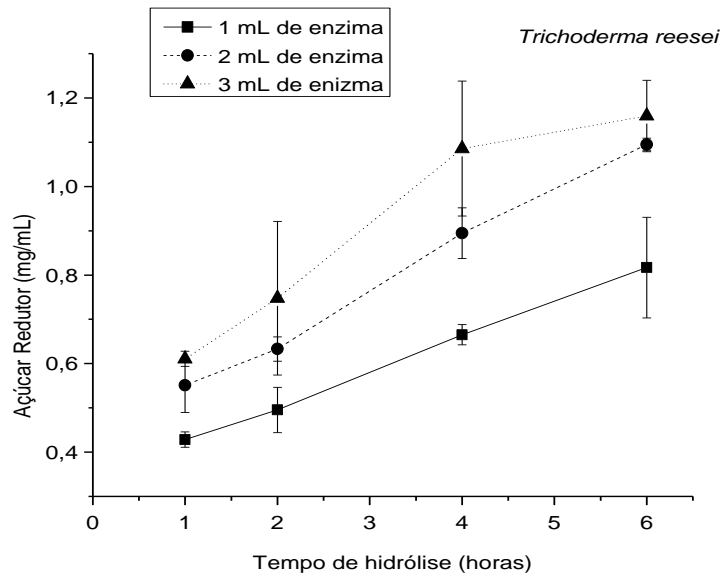


Figura 31: Sacarificação enzimática por *T. reesei* de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

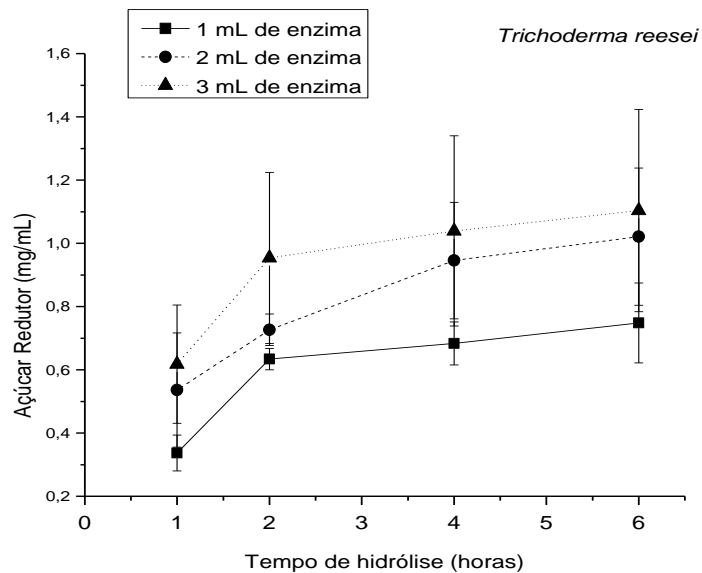


Figura 32: Sacarificação enzimática por *T. reesei* de bagaço pré-tratado com explosão a vapor e não lavado. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

Com os extratos enzimáticos dos dois fungos observou-se uma maior liberação de açúcares redutores utilizando o bagaço pré-tratado com explosão a vapor e lavado. Com esse bagaço, foi possível obter 1,21 mg/mL e 1,16 mg/mL de açúcares redutores com o extrato (3 mL) de *T. aurantiacus* e *T. reesei*, respectivamente, após 6 horas de hidrólise.

Utilizando o bagaço que não foi previamente lavado os resultados foram um pouco inferiores, na qual se obteve 1,14 mg/mL e 1,10 mg/mL de açúcares redutores após 6 horas de hidrólise com os extratos de *T. aurantiacus* e *T. reesei*, respectivamente. Observa-se também que a utilização de 2 ou 3 mL de extrato enzimático de *T. aurantiacus* praticamente não alterou a eficiência da hidrólise.

Para calcular o rendimento da hidrólise, no entanto, é necessário notar que o bagaço não lavado possuía uma alta umidade (56,84%) quando comparado com o lavado e seco (4,38%) e, desta forma, uma menor fração de celulose e hemicelulose disponível para o ataque enzimático.

Sendo assim, com o bagaço não lavado (bagaço EV original) foi possível obter 17,6 e 16,9% de rendimento na hidrólise, com os extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* e *T. reesei*, respectivamente. Comparativamente, com o bagaço EV lavado esses mesmos extratos hidrolisaram 8,4 e 8,1% do material lignocelulósico, respectivamente.

A projeção das curvas indica que provavelmente ainda deveria ocorrer um aumento na liberação dos açúcares com um maior tempo de hidrólise, porém de acordo com as figuras 29 e 30 o aumento de volume enzimático sugere uma possível saturação do substrato sem aumento no rendimento da sacarificação, uma vez que praticamente não houve diferença com o uso de 2 ou 3 mL de extrato enzimático.

Em ensaio realizado por Ruiz et al., (2008) com talos de girassol também pré-tratado com explosão a vapor, o rendimento máximo da hidrólise foi de 72% após 96 horas. Neste trabalho, no entanto, foram utilizadas enzimas comerciais de um complexo de celulasas (Celluclast 1.5L) suplementada com β -glicosidase (Novozym 188). Ainda neste estudo, também foi testado o bagaço comum, sem pré-tratamento, na qual se obteve apenas 18% de hidrólise também em 96 horas.

Em outro estudo, também utilizando uma mistura de enzimas da Celluclast 2L e Novozym 188, após 96 horas de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor resultou na geração de 47,4 g de açúcares por 100 g de bagaço seco, sendo 33,0 g de glicose (MARTÍN; GALBE; JONSSON, 2002).

5.13. Hidrólise do bagaço com a mistura dos extratos enzimáticos de *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei*.

É importante ressaltar que neste trabalho empregou-se um tempo de hidrólise relativamente curto, visando a redução dos custos do processo. Portanto esses resultados são bastante promissores e ainda podem ser aprimorados. O fungo *Thermoascus aurantiacus* é um bom produtor de endoglucanase e endoxilanase (atuam internamente nos substratos), porém produz pequena quantidade de exoglucanase. Desta forma, um aumento na eficiência da hidrólise poderia ser obtido buscando o sinergismo entre enzimas dextrinizantes e sacarificantes. O fungo *Trichoderma reesei* é reconhecido por sua notável capacidade sacarificante devido à produção de exoglucanase (atividade papel de filtro).

Assim, na tentativa de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, os extratos enzimáticos (1:1) de *T. aurantiacus* e *T. reesei* foram misturados para avaliar uma possível complementaridade de suas enzimas. O teste foi realizado de acordo com o terceiro modelo proposto na metodologia (Figura 33).

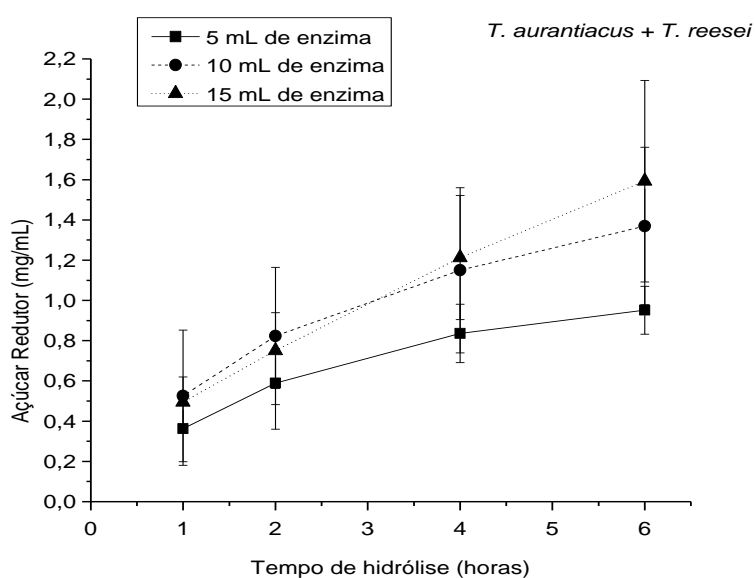


Figura 33: hidrólise enzimática do bagaço EV lavado com a mistura de extratos enzimáticos (1:1) de *T. aurantiacus* e *T. reesei*. Perfil de atividade enzimática conforme tabela 5.

Com a mistura dos dois extratos enzimáticos obteve-se a liberação de 1,59 mg/mL de açúcares redutores após 6 horas, o que corresponde a um aumento no rendimento da hidrólise de 31,4% em relação ao obtido no ensaio anterior com o

extrato do fungo *Thermoascus aurantiacus*. O maior desafio em melhorar esses resultados reside no fato de um fungo ser termofílico e o outro mesofílico, impossibilitando que suas respectivas enzimas atuem na temperatura ótima.

5.14. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes tipos de pré-tratamento

Realizou-se a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar que foi submetido ao tratamento térmico em combinação com diferentes soluções (água, HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, H₂O₂ e NaOH) com os extratos de *T. aurantiacus* e *T. reesei*, de acordo com o segundo modelo de hidrólise. No entanto, utilizou-se somente 3 mL de extrato bruto durante 6 horas para a quantificação dos açúcares redutores (Tabela 12).

Tabela 12: Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes tipos de pré-tratamento.

| Pré-tratamento | <i>T. aurantiacus</i> (mg/mL de açúcar redutor) | <i>T. reesei</i> (mg/mL de açúcar redutor) |
|--------------------------------|---|--|
| H ₂ O | 0,77 (± 0,13) | 0,93 (± 0,11) |
| HCl | 0,59 (± 0,03) | 0,83 (± 0,06) |
| H ₂ SO ₄ | 1,15 (± 0,16) | 0,98 (± 0,14) |
| H ₃ PO ₄ | 1,17 (± 0,10) | 1,44 (± 0,04) |
| H ₂ O ₂ | 0,69 (± 0,00) | 0,92 (± 0,11) |
| NaOH | 3,87 (± 1,70) | 3,65 (± 0,15) |

De acordo com o tabela 12 o tratamento com NaOH resultou no melhor rendimento da hidrólise, independentemente do extrato enzimático utilizado. A eficiência desse processo possivelmente se deve à melhor remoção da fração de lignina do material lignocelulósico, e maior exposição das frações de celulose e hemicelulose ao ataque enzimático.

5.15. Determinação de fenóis totais

Os compostos fenólicos são produzidos durante a etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico e são potenciais inibidores para o processo de fermentação alcoólica. Foram quantificados os fenóis presentes na solução após a etapa de hidrólise realizada com 3 mL de extrato enzimático (Tabela 13).

Tabela 13: Compostos fenólicos totais presentes nos diferentes tipos de hidrolisados.

| Pré-tratamento do bagaço | Fenóis totais* (mg/L) <i>T. aurantiacus</i> | Fenóis totais* (mg/L) <i>T. reesei</i> |
|---------------------------------|--|---|
| Controle (H ₂ O) | 157,59 (± 43,18) | 141,12 (± 2,66) |
| HCl | 187,08 (± 40,18) | 172,22 (± 18,01) |
| H ₂ SO ₄ | 265,87 (± 13,28) | 205,13 (± 25,52) |
| H ₃ PO ₄ | 223,42 (± 24,36) | 216,64 (± 28,40) |
| H ₂ O ₂ | 175,25 (± 23,21) | 174,84 (± 2,08) |
| NaOH | 143,16 (± 29,10) | 150,59 (±13,51) |
| Bagaço EV lavado | 288,74 (± 17,42) | 263,75 (± 4,97) |
| Bagaço EV original | 412,10 (± 33,56) | 408,02 (± 28,64) |
| Bagaço EV lavado (T.a. + T.r.) | 304,33 (± 30,02) | |

*Expresso em ácido vanílico

O bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor e não lavado foi o substrato com maior quantificação de fenóis totais dentre os hidrolisados avaliados. A formação desses compostos está diretamente relacionada com a severidade da etapa de pré-tratamento do substrato.

5.16. Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC

Esses compostos inibidores são gerados a partir da degradação dos monossacarídeos durante a etapa de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. Foram determinados os teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural nos hidrolisados contendo 3 mL de extrato enzimático de *T. aurantiacus* e *T. reesei* e com 6 horas de ensaio (Tabelas 14 e 15, respectivamente). As análises foram realizadas em HPLC e as amostras apresentaram um perfil de cromatograma semelhante aos ilustrados nas figuras 34 e 35.

Tabela 14: Determinação de furfural e 5-hidroxiacetilfurfural por HPLC nos hidrolisados com extrato enzimático do fungo *T. aurantiacus*.

| Pré-tratamento do bagaço | Furfural ($\mu\text{g/mL}$) | 5-hidroxiacetilfurfural ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|
| Controle (H_2O) | 0,03 ($\pm 0,01$) | 1,17 ($\pm 0,32$) |
| HCl | 0,47 ($\pm 0,27$) | 1,50 ($\pm 0,03$) |
| H_2SO_4 | 7,86 ($\pm 2,15$) | 6,44 ($\pm 0,78$) |
| H_3PO_4 | 0,01 ($\pm 0,01$) | 1,02 ($\pm 0,04$) |
| H_2O_2 | 0,28 ($\pm 0,04$) | 1,04 ($\pm 0,08$) |
| NaOH | 0,23 ($\pm 0,07$) | 1,13 ($\pm 0,21$) |
| Bagaço EV lavado | ND* | 1,08 ($\pm 0,01$) |
| Bagaço EV original | 0,55 ($\pm 0,29$) | 2,38 ($\pm 0,47$) |

*ND: não detectável

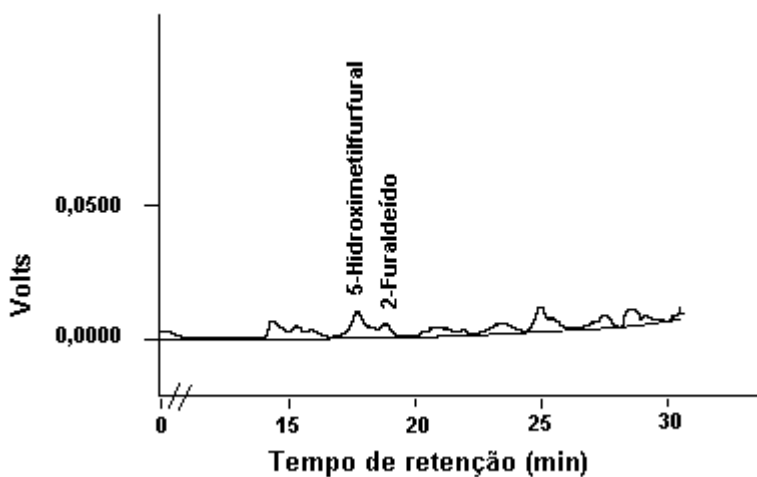


Figura 34: Cromatograma dos compostos inibidores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV original com extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

Tabela 15: Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural por HPLC nos hidrolisados com extrato enzimático do fungo *T. reesei*.

| Pré-tratamento do bagaço | Furfural ($\mu\text{g/mL}$) | 5-hidroximetilfurfural ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| Controle (H_2O) | 0,01 ($\pm 0,01$) | 1,10 ($\pm 0,03$) |
| HCl | 0,14 ($\pm 0,05$) | 0,98 ($\pm 0,07$) |
| H_2SO_4 | 8,64 ($\pm 0,06$) | 24,27 ($\pm 2,47$) |
| H_3PO_4 | ND* | 1,02 ($\pm 0,05$) |
| H_2O_2 | ND* | 0,93 ($\pm 0,10$) |
| NaOH | 0,11 ($\pm 0,06$) | 0,94 ($\pm 0,02$) |
| Bagaço EV lavado | ND* | 0,10 ($\pm 0,02$) |
| Bagaço EV original | 0,57 ($\pm 0,08$) | 1,84 ($\pm 0,18$) |

*ND: não detectável

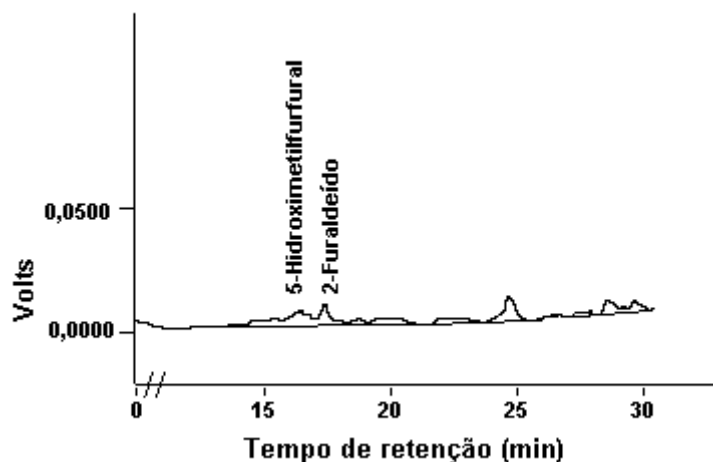


Figura 35: Cromatograma dos compostos inibidores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV original com extrato enzimático de *T. reesei*.

A determinação dos inibidores com a mistura de extrato enzimático de *T. aurantiacus* e *T. reesei* foi próxima das demais análises, com $0,27 (\pm 0,04) \mu\text{g/mL}$ de furfural e $1,06 (\pm 0,05) \mu\text{g/mL}$ de 5-hidroximetilfurfural.

A análise dos hidrolisados revelou que esses compostos inibidores estão presentes apenas em uma baixa concentração quando comparado com alguns dados da literatura. GÁMEZ et al. (2006) encontraram $1,2 \text{ mg/mL}$ de furfural no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado termicamente em combinação com H_3PO_4 . DOGARIS et al. (2009) estudaram o pré-tratamento térmico do bagaço de sorgo e obtiveram a formação de $0,21$ e $0,51 \text{ mg/mL}$ de 5-hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente.

A baixa produção de compostos inibidores no processo pode ser decorrente da temperatura relativamente baixa empregada na etapa de pré-tratamento (autoclave a 121 °C) neste trabalho. No entanto, para a viabilidade do processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica deve-se evitar ao máximo a formação desses compostos, levando-se em consideração os altos custos de uma etapa de desintoxicação do hidrolisado previamente à fermentação.

5.17. Determinação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática por HPLC

Para uma melhor visualização da extensão da hidrólise enzimática, os principais açúcares liberados nesta etapa foram determinados por HPLC. Utilizou-se os hidrolisados contendo 3 mL de extrato enzimático de *T. aurantiacus* e *T. reesei* e com 6 horas de hidrólise (Tabelas 16 e 17). Os seis açúcares avaliados foram encontrados em todos os hidrolisados, sendo a glicose e a xilose os principais produtos formados. Esse dado é importante, pois esses são os monossacarídeos passíveis de fermentação pelas leveduras, sendo o principal objetivo da hidrólise enzimática. Todas as amostras avaliadas apresentaram um perfil de cromatograma semelhante aos ilustrados nas figuras 36 e 37.

Tabela 16: Determinação de açúcares redutores nos hidrolisados com extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

| Pré-tratamento | Arabinose (µg/mL) | Galactose (µg/mL) | Glicose (µg/mL) | Xilose (µg/mL) | Xilobiase (µg/mL) | Celobiase (µg/mL) |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Controle (H ₂ O) | 44,33 (± 10,4) | 4,80 (± 1,2) | 942,74 (± 194,1) | 207,44 (± 44,2) | 4,42 (± 0,4) | 0,78 (± 0,2) |
| HCl | 17,93 (± 3,5) | 3,38 (± 0,6) | 788,14 (± 70,6) | 231,83 (± 40,7) | 3,73 (± 0,2) | 1,27 (± 0,3) |
| H ₂ SO ₄ | 61,41 (± 2,1) | 4,71 (± 0,2) | 978,81 (± 36,0) | 517,59 (± 7,1) | 5,15 (± 0,0) | 0,87 (± 0,0) |
| H ₃ PO ₄ | 39,64 (± 7,5) | 5,32 (± 1,1) | 1139,51 (± 170,8) | 423,47 (± 83,0) | 8,28 (± 0,1) | 1,72 (± 0,3) |
| H ₂ O ₂ | 43,55 (± 2,2) | 5,03 (± 0,7) | 913,42 (± 96,3) | 210,10 (± 18,3) | 4,26 (± 0,3) | 0,90 (± 0,2) |
| NaOH | 199,06 (± 146,5) | 8,35 (± 4,5) | 3210,82 (± 1619,2) | 1092,65 (± 883,4) | 277,05 (± 376,1) | 22,54 (± 28,8) |
| Bagaço EV lavado | 9,42 (± 2,8) | 3,26 (± 0,8) | 1140,54 (± 237,1) | 358,01 (± 84,8) | 13,97 (± 3,2) | 2,52 (± 0,5) |
| Bagaço EV original | 9,44 (± 0,0) | 3,41 (± 0,2) | 1014,02 (± 142,6) | 152,79 (± 37,3) | 8,72 (± 0,0) | 0,90 (± 0,2) |
| Mistura dos extratos | 18,38 (± 1,0) | 3,25 (± 0,44) | 2106,64 (± 349,0) | 454,72 (± 44,6) | 8,65 (± 1,6) | 5,40 (± 0,3) |

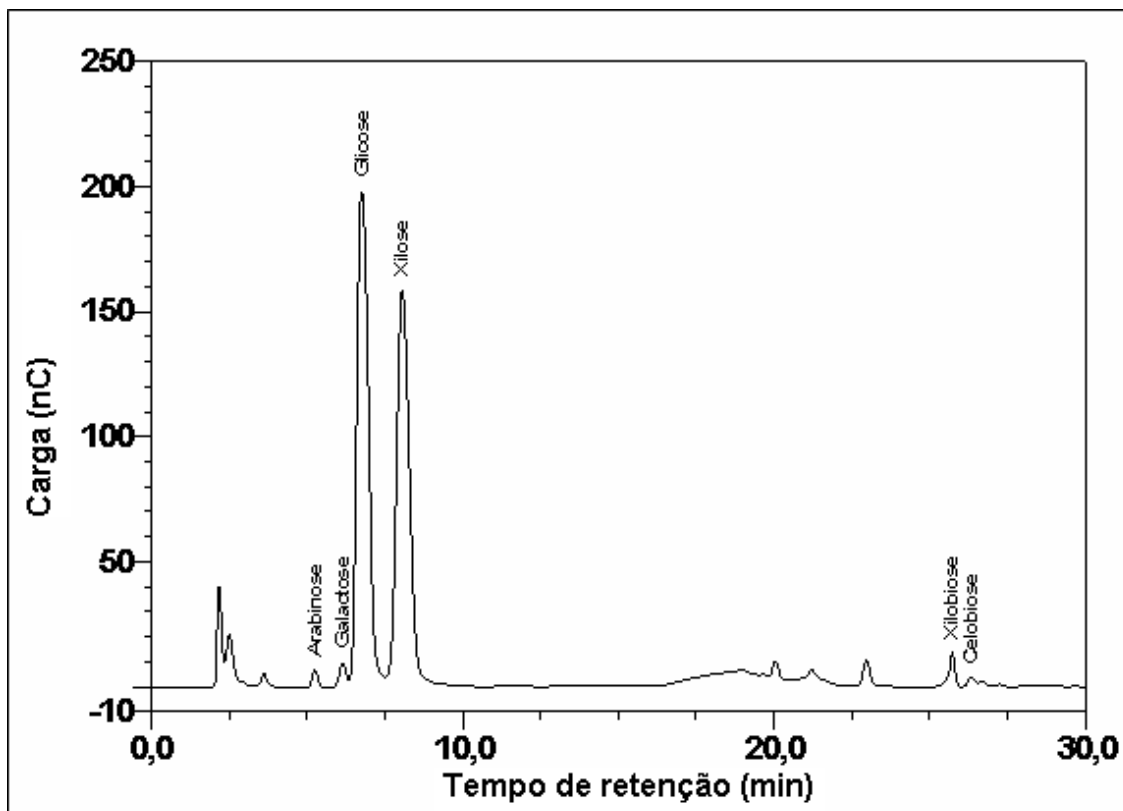


Figura 36: Cromatograma dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV lavado com extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

Tabela 17: Determinação de açúcares redutores nos hidrolisados com extrato enzimático de *T. reesei*.

| Pré-tratamento | Arabinose (µg/mL) | Galactose (µg/mL) | Glicose (µg/mL) | Xilose (µg/mL) | Xilobiose (µg/mL) | Celobiose (µg/mL) |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| Controle (H ₂ O) | 67,95 (± 11,8) | 1,75 (± 0,6) | 1077,81 (± 456,9) | 243,42 (± 141,1) | 3,11 (± 0,6) | 24,59 (± 18,0) |
| HCl | 14,97 (± 0,7) | 1,16 (± 0,1) | 1046,81 (± 447,2) | 238,41 (± 48,2) | 1,91 (± 0,1) | 41,90 (± 10,0) |
| H ₂ SO ₄ | 44,73 (± 0,2) | 1,55 (± 0,3) | 831,64 (± 314,5) | 376,48 (± 107,0) | 2,90 (± 0,2) | 48,84 (± 20,3) |
| H ₃ PO ₄ | 47,25 (± 7,8) | 2,75 (± 0,4) | 1487,88 (± 538,8) | 431,08 (± 129,9) | 3,89 (± 0,8) | 59,09 (± 24,2) |
| H ₂ O ₂ | 62,39 (± 12,2) | 1,80 (± 0,3) | 1013,15 (± 415,4) | 278,23 (± 102,8) | 2,59 (± 0,9) | 24,23 (± 9,4) |
| NaOH | 249,05 (± 0,9) | 1,34 (± 0,4) | 2676,15 (± 708,6) | 1043,69 (± 383,3) | 318,09 (± 12,8) | 425,67 (± 22,7) |
| Bagaço EV lavado | 12,99 (± 0,3) | 2,19 (± 0,0) | 1493,02 (± 159,6) | 379,40 (± 21,7) | 3,15 (± 0,0) | 18,05 (± 7,1) |
| Bagaço EV original | 71,83 (± 17,8) | 7,53 (± 1,7) | 1211,43 (± 276,3) | 617,19 (± 168,3) | 4,67 (± 1,1) | 22,20 (± 3,2) |

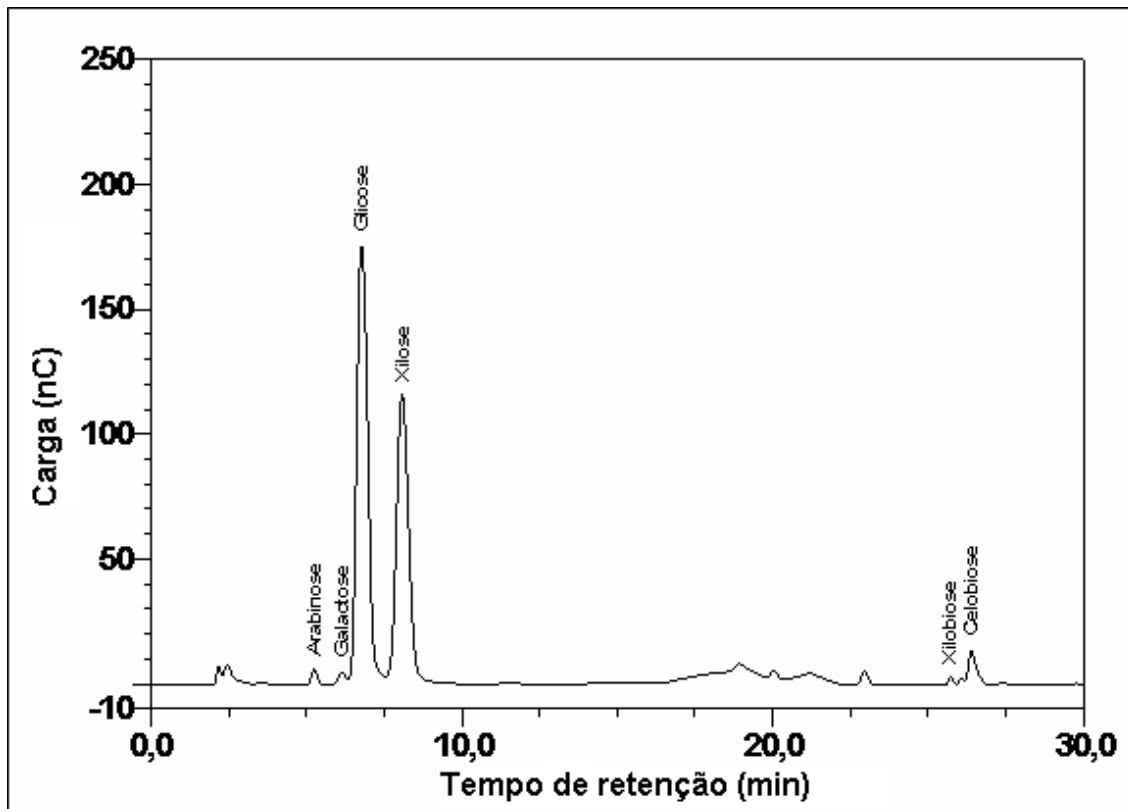


Figura 37: Cromatograma dos açúcares redutores produzidos na hidrólise enzimática utilizando o bagaço EV lavado com extrato enzimático de *T. reesei*.

Em trabalho realizado por Gámez et al (2006), utilizando a hidrólise térmica em combinação com H_3PO_4 (122 °C, 4% de H_3PO_4 e 300 minutos) do bagaço de cana-de-açúcar, detectaram a presença de (em mg/mL) 17,6 de xilose, 2,6 de arabinose e 3,0 de glicose. Porém foi produzido uma quantidade muito maior de compostos inibidores, com 1,2 mg/mL de furfural e 4,0 mg/mL de ácido acético.

6. CONCLUSÕES

Os fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 foram capazes de se desenvolver nos fermentadores testados em meio com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e produziram enzimas importantes do ponto de vista industrial.

No que diz respeito à quantidade de enzima produzida, o fungo *T. aurantiacus* merece destaque, por ter sido um excelente produtor de xilanase e CMCase. Os fungos *T. lanuginosus* e o *P. viridicatum* apresentaram bons resultados para a enzima β -glicosidase, e o *T. reesei* produziu quantidades intermediárias para a maioria das enzimas.

O meio fermentativo contendo apenas bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo não foi um bom indutor para produção das enzimas ligninases, uma vez que não possível detectar atividades dessas enzimas em nenhum extrato analisado.

Dentre os pré-tratamentos do bagaço, o realizado em combinação com ácido clorídrico liberou a maior quantidade de açúcares redutores, que devem reaproveitados no processo de produção do bioetanol.

Os extratos enzimáticos dos fungos *T. aurantiacus* e *T. reesei* apresentaram os melhores resultados na hidrólise do bagaço de cana. O aumento da quantidade de enzima sempre resultou em um aumento da sacarificação, indicando que as enzimas ainda não haviam chegado ao estado de saturação.

Os pré-tratamentos do bagaço em combinação com NaOH e explosão a vapor foram os que resultaram no melhor rendimento na etapa de hidrólise.

A concentração do extrato bruto por precipitação com etanol foi realizada com sucesso, observando-se um considerável aumento nas atividades de todas as enzimas. A aplicação do extrato concentrado na hidrólise do bagaço também resultou numa melhor eficiência do processo, aumentando a liberação dos açúcares, embora não tenha sido proporcional ao fator de concentração do extrato enzimático.

A mistura entre os extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* e *T. reesei* também resultou em um melhor rendimento do processo de hidrólise.

A extrapolação das curvas de sacarificação indica que possivelmente a hidrólise continuaria com o decorrer do tempo, podendo melhorar os rendimentos deste processo.

Os inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural foram encontrados apenas em pequena concentração em todos os hidrolisados, indicando que o pré-tratamento não foi muito severo e evitou a degradação dos açúcares na formação desses compostos.

Os açúcares avaliados arabinose, galactose, glicose, xilose, xilobiose e celobiose foram encontrados em todos os hidrolisados, sendo a glicose e xilose os principais produtos formados. Isto demonstra que a extensão da hidrólise atingiu seu principal objetivo, que é a formação dos monossacarídeos passíveis de fermentação.

Estes resultados estimulam a continuação de novos estudos, visando a compreensão dos parâmetros envolvidos na sacarificação enzimática para a obtenção das melhores condições de ensaio, como temperatura, tempo, pH e relação enzima/substrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M. D; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 276, p. 405-414, 1990.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

BADGER, P. C. Em **Trends in New Crops and New Uses**; Janick, J.; Whipkey, A., eds.; ASHS Press: Alexandria, 2002.

BALAT, M. Mechanisms of thermochemical biomass conversion processes. Part 1: reactions of pyrolysis. **Energy Sources**, v. 30, p. 620-635, 2008a.

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

BALAT, M.; BALAT, M.; KIRTAY, E.; BALAT, H. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 3147–3157, 2009.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Carboidratos. In: **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª ed., Varela, cap. 1, p. 69, 2003.

BRIDGEWATER, A. V. Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 51, p. 3-22, 1999.

BUCKERIDGE, M.; SANTOS, W. D.; DE SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L.A.B. (Coord.), Edgard Blucher (Eds.), **Etanol: Pesquisa e Desenvolvimento**, in press, 2009.

BURGERT, I. Exploring the micromechanical design of plant cell walls. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 1391–1401, 2006.

BAURHOO, B.; RUIZ-FERIA, C. A.; ZHAO, X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p.175–184, 2008.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus)* edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-87, 1995.

CANTWELL, B. A.; SHARP, P. M.; GORMLEY, E.; MCCONNELL, D. J. Molecular cloning of bacillus b-glucanases. In: Aubert, J. P., Beguin, P., Millet, J. (Eds.), **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**. Academic Press, San Diego, CA, p. 181–201, 1988.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, NEI. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 5-37, 2000.

CHANLIAUD, E.; BURROWS, K. M.; JERONIMIDIS, G.; GIDLEY, M. J. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. **Planta**, v. 215, p. 989–996, 2002.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total abthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal Food Chemistry and Toxicology**. v. 69, p. 67-72, 2004.

CONAB - Companhia Nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – Cana-de-açúcar, dezembro de 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/bc48c2601447e03580b9e6bf62877e2a..pdf>. >Acesso em: 25 de julho de 2010 às 15:35 horas.<

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola sp.* 179-5 e aplicação destas enzimas**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

DA SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO, C. M. L. Pectinases, hemicelulases e celulases: substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. Boletim da **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 249-250, 1997.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation Products on ethanol fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 19, p. 220-225, 1996.

DEMIRBAS, A. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, p. 171-192, 2005a.

DEMIRBAS, A. Influence of gas and detrimental metal emissions from biomass firing and co-firing on environmental impact. **Energy Source**, v.27, p. 1419-1428, 2005b.

DEMIRBAS A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. **Energy Source**, v. 3, p. 177-185, 2008.

DOGARIS, I.; KARAPATI, S.; MAMMA, D.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6543-6549, 2009.

DOMINGUEZ, J. M. D. **Efecto de los productos de degradación originados en la explosion por vapor de Biomassa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus**. Tese de Doutorado. Universidad Complutense. Madrid, 2003.

DUBOIS, B.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis**, Springer-Verlag, New York, p. 5-120, 1987.

FELDMAN, D.; BANU, D.; NATANSOHN, A.; WANG, J. Structure-properties relations of thermally cured epoxy-lignin polyblends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42, p. 1537-1550, 1991.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

GLENN, J. K.; AKILESWAREAN, L.; GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251, p. 688-696, 1986.

GRABBER, J. H. *et al.* Genetic and molecular basis of grass cell wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 455-465, 2004.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v. 122, p. 1-22, 2008.

GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 274-280, 1986.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 549-556, 2006.

HARTREE-LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARRA, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 267-275, 1951.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMIREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A. and TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HOLTZAPPLE, M. T.; JUN, J-H.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S. L.; DALE, B. E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, p. 59-74, 1991.

HORWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, EL.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 602-619, 2003.

JORGENSEN, H.; KUTTER, J. P.; OLSSON, L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 317, p. 85-93, 2003.

KALOGERIS, E.; CRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU V.; CHRISTAKOPOULOU P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 501-506, 2006.

KOLICHESKI, M. B.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; MEDEIROS, E.; RAIMBAULT, M. Citric acid production on three cellulosic supports in solid state fermentation, *Advances in Solid State Fermentation Secondary Metabolites, Aroma Pigments and Bio-pesticides*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 449-461, 1997.

KURABI, A.; BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; ROBINSON, J.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; GUSAKOV, A.; OKUNEV, O.; SINITSYN, A.; GREGG, D.; XIE, D.; SADDLER, D. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Firby novel and commercial fungal cellulases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 121-124, 219-230, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726-732, 2005.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 1081-1099, 2005.

LEITE, S.R.L. **Produção, propriedades e purificação de β -glicosidase dos microorganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: comparação das características térmicas das duas enzimas brutas**. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 136, p. 281-288, 2007.

LI, J.; LENNHOLM, H.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production II. In: **Fundamentals and strategic design of steam explosion**. Proceedings of the first world conference on biomass for energy and industry, v. 1, p. 767-70, 2001.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignins; A sustainable alternative to non-renewable materials. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 10, p. 39-48, 2002.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and bioenergy**, v. 32, p. 682-595, 2008.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; JONSSON, L. J. Comparison of the fermentability hydrolysates of sugar cane bagasse pre-treated by steam explosion using different impregnation agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98/100, p. 699-716, 2002.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426-432, 2006a.

MARTIN, C.; GONZALEZ, Y.; FERNANDEZ, T.; THOMSEN, A. B. Investigation of cellulose convertibility where science meets business and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1669-1677, 2006b.

MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MEDEIROS, A.; PANDEY, A.; CHRISTEN, P.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S.; SOCCOL, C. R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 767-771, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-434, 1959.

MNISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Boletim mensal de combustíveis renováveis. Disponível em: >http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_029_-_maio_de_2010.pdf< Acesso em: 05 de agosto de 2010 às 14:00 horas.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy Fuels**, v. 20, p. 848-889, 2006.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. Springer-Verlag, 629 p., 1995.

MONIRUZZAMAN, M. Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 283-97, 1996.

MOSIER, N.; WYMAN, C. E.; DALE, B. D.; ELANDER, R. T.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, C. M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005a.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. R.. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1986-1993, 2005b.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnonology advances**, in press, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. Carbohydrates and Glycobiology. **In: Lehninger Principles of Biochemistry**, 4^a ed., Palgrave Macmillan, cap. 7, p. 249, 2004.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil and Gas Science and Technology / Revue de l'Institut Francais du Petrole**, v. 54, p. 67-94, 1999.

OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GÓNZALEZ, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 141-154, 2003.

OLOFSSON K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G: A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 7, 2008.

OZBAY, N.; PUTUN, A. E.; UZUN, B. B.; PUTUN E. Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake. **Renew Energy**, v. 24, p. 615-625, 2001.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* Miehe. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

PALONEN, H.; THOMSEN, A. B.; TENKANEN, M.; SCHMIDT, A. S.; VIKARI, L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 117, p. 1-17, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse, **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000b.

PARRY, N. N. S. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 404, p. 243–253, 2002.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATI A.C.S.; MONTI R.; TERENCEZ H.F.; JORGE J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

POUTEAU, C.; DOLE, P.; CATHALA, B.; AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, p. 9-18, 2003.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMICKY, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 355–361, 1999.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xylanase production by trichoderma harzianum rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 67-72, 2002.

ROSSELL, C. E. V. **Fermentação do hidrolisado**. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. 2006.

RUDNEV A. V.; FONAKOVA, M. V.; ELKABBANI, E. A. An effect of ionizing-radiation on the conversion of biomass in organic residua: change in the elemental composition of cellulose, wood, and lignin induced by ionizing-radiation and temperature. **Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya**, v. 234, p. 153-156, 1993.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 160-166, 2008.

RYDHOLM, S. A. **Pulping processes**. New York: Wiley; 1965.

SACON, V.; WEISSHEIMER, C. A. Metodologia de lignina simplificada. **Nota Técnica: Riocell**, n. 1481, p. 6, 1996.

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

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 167-178, 2009.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

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

SOMOGYI-NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 135, p. 136-175, 1944.

STERTZ, S. C.; SOCCOL, C. R.; RAIMBAULT, M.; PANDEY, A.; LEON, J. R. Surface reponse design and kinetics of solid sate fermentation of raw cassava by *Rhizopus formosa* MUCL 28422. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 580-586, 1999.

SUHAS; CARROTT, P. J. M.; RIBEIRO CARROTT, M.M.L. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2301-2312, 2007.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana Lam.* trees. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1106-1114, 2007.

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

TAHERZADEH, M. J.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 4659-4665, 1997.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, p. 707-738, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. In: **Fisiologia Vegetal**, 5ª ed., Artmed, 720 p., 2003.

TEERI, T. T.; BRUMER, H.; DANIEL, G.; GATENHOLM, P. Biomimetic engineering of cellulose-based materials. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 299-306, 2007.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol fuel. **Renew Energy**, v. 16, p. 1070-1073, 1999.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnonology Progress**, v. 17, p. 110-117, 2001.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H. C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 155-163, 1992.

TIEN, M.; KIRK, K. T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K., Kellogg, S. T. **Methods in Enzymology**, v. 161, part B, p. 238-249, 1988.

TOYAMA, N.; OGAWA, K. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods. In: **Ghose, T.K. (Ed.), Bioconversions of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial protein**. Symp. Proc. 1977, Indian Institute of Technology, New Delhi, p. 305-327, 1978.

TSUJINO, J., KAWAMOTO, H., SAKA, S. Reactivity of lignin in supercritical methanol studied with various lignin model compounds. **Wood Science and Technology**, v. 37, p. 299-307, 2003.

UNB – Universidade de Brasília. Notícias, fevereiro de 2010. Disponível em: <http://www.unb.br/noticias/unbagencia/artigo.php?id=234> > Acesso em: 20 de outubro de 2010 às 16:00 horas <

VARGAS, L. H. M.; PIÃO, A. C. S.; DOMINGOS, R. N.; CARMONA, E. C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 137-142, 2004.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v. 49, p. 5315-5321. 2001.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 153-157, 2007.

YAMAN S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Convers Manage**, v. 45, p. 651-671, 2004.

YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 277–280, 2001.

YU, L., HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1619-1624, 2002.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 869-873, 2006.