



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus São José do Rio Preto

Priscila Atique de Moraes

Produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido por espécimes do gênero *Trichoderma* para sacarificação do bagaço de cana de açúcar tratado com micro-ondas

São José do Rio Preto
2014

Priscila Atique de Moraes

Produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido por espécimes do gênero *Trichoderma* para sacarificação do bagaço de cana de açúcar tratado com micro-ondas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, 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^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2014

Priscila Atique de Moraes

Produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido por espécimes do gênero *Trichoderma* para sacarificação do bagaço de cana de açúcar tratado com micro-ondas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profª. Dra. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. João Claudio Thomeo
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Mauricio Boscolo
UNESP – São José do Rio Preto

Profª. Dra. Sandra Helena da Cruz
ESALQ/USP – Piracicaba

Dra. Sarita Cândida Rabelo
CTBE – Campinas

São José do Rio Preto
2014

Dedico este trabalho a Deus e a minha família

AGARDECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar tudo o que foi necessário para a realização de mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Martha e Fernando, pelo carinho e apoio durante a realização deste trabalho e em todos os momentos. Ao meu irmão, Samuel, por sempre me incentivar. A toda a minha família, pelo carinho dedicado.

Ao meu esposo e amigo, Murilo, pelo companheirismo e paciência nessa trajetória.

A minha orientadora, Eleni Gomes, pela orientação e aprendizado.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da UNESP de São José do Rio Preto. Agradeço a Fernanda Geraldês, pela amizade, Rosemeire, Diego Monteiro e todos os amigos pelo carinho e risadas que tornaram nossos dias mais alegres e descontraídos.

Aos amigos, Ibere e Lucimara, pela acolhida sempre que necessário.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1. Biomassa lignocelulósica.....	12
1.1 Estrutura da parede celular.....	17
2. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa.....	18
2.1 Celulases.....	18
2.2 Hemicelulases.....	20
2.3 Ligninases.....	20
3. Fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas microbianas.....	22
4. Desestruturação do material: pré-tratamentos.....	23
4.1 Pré-tratamentos físicos.....	25
4.1.1 <i>Explosão a vapor</i>	25
4.1.2 <i>Micro-ondas</i>	25
4.2 Pré-tratamentos químicos.....	26
4.2.1 <i>Pré-tratamento ácido</i>	26
4.2.2 <i>Pré-tratamento alcalino</i>	26
4.2.3 <i>AFEX</i>	27
4.2.4 <i>Ozonólise</i>	27
4.2.5 <i>Organosolve</i>	28
4.3 Pré-tratamento biológico.....	28
5. Formação de inibidores.....	29
6. Hidrólise enzimática dos polímeros de açúcares.....	29
7. OBJETIVOS.....	32
7.1 Objetivo geral.....	32
7.2 Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO II.....	33
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	33
1. Introdução.....	33
2. Material e Métodos.....	34
2.1 Cepas utilizadas.....	34
2.2 Produção de enzimas e parâmetros avaliados.....	35
2.3 Condições de fermentação e obtenção das soluções enzimáticas.....	35
2.4 Determinação das atividades enzimáticas.....	35
2.4.1 <i>Endoglucanases – CMCase</i>	35

2.4.2 <i>β-glicosidase</i>	36
2.4.3 <i>Xilanase</i>	37
2.4.4 <i>Lacase</i>	37
2.5 Identificação das espécies de <i>Trichoderma</i>	38
2.6 Avaliação dos parâmetros fermentativos sobre a produção das enzimas.....	41
2.7 Caracterização das enzimas.....	42
3. Resultados e Discussão.....	42
3.1 Avaliação da produção das enzimas e seleção das melhores cepas produtoras.....	42
3.1.1 Perfis de produção das enzimas por fermentação em estado sólido sob diferentes condições nutricionais.....	42
3.2 Identificação das espécies de <i>Trichoderma</i>	52
3.3 Produção das enzimas por fermentação em estado sólido sob diferentes condições físico-químicas.....	53
3.3.1 Avaliação da quantidade de eluente durante a extração das enzimas.....	53
3.3.2 Avaliação da temperatura de incubação.....	55
3.3.3 Efeito do pH sobre a produção das enzimas.....	57
3.3.4 Efeito da fonte de nitrogênio (Uréia %) na produção enzimática.....	59
3.3.5 Produção das enzimas pelas espécie de <i>Trichoderma</i> ao longo do processo de fermentação em estado sólido.....	61
3.3.6 Avaliação do tipo de substrato na produção das enzimas.....	62
4. Conclusões.....	66
CAPÍTULO III.....	67
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO E POSTERIOR SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	67
1. Introdução.....	67
2. Material e Métodos.....	68
2.1 Composição química do bagaço de cana.....	68
2.2 Pré-tratamento do bagaço com aplicação de micro-ondas.....	68
2.3 Avaliação dos potenciais inibidores da fermentação alcoólica gerados durante o tratamento do bagaço.....	69
2.4 Análises de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	70
2.5 Preparo do material para microscopia eletrônica de varredura (MEV) – caracterização morfológica do bagaço tratado e não tratado.....	70
2.6 Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado.....	71
3. Resultados e Discussão.....	71
3.1 Composição das fibras do bagaço não tratado e após o tratamento com micro-ondas e perda de peso.....	71

3.2 Caracterização do eluente após tratamento: análises de açúcares redutores totais (ART), compostos fenólicos totais (CFT) e inibidores do material não tratado e pré-tratado.....	73
3.3 Hidrólise enzimática.....	76
3.4 Análises Termogravimétricas.....	79
3.5 Caracterização morfológica do bagaço de cana tratado.....	81
4. Conclusões.....	87
5. Conclusões Geral.....	87
6. Referências Bibliográficas.....	88
Apêndice 1.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da celulose (a) (Fengel & Wegener, 1989) e das regiões amorfa e cristalina (b) (Krause <i>et al.</i> , 2003).....	15
Figura 2. (a) Monômeros da hemicelulose (Hansen & Plackett, 2008), (b) estrutura da hemicelulose.....	16
Figura 3. Precursores primários na formação da lignina, derivados do álcool cimânico (a) (1): álcool p-cumárico (2), álcool trans-coniferílico (3) e álcool trans-sinapílico (4) (Fengel & Wegener, 1989) e a estrutura da lignina de eucalipto (b).....	17
Figura 4. Ilustração da estrutura da parede celular de uma célula vegetal (modificado de Achyuthan <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figura 5. Esquema simplificado da hidrólise enzimática da celulose sob ação das celulases de <i>Trichoderma reesei</i> . (C) região cristalina (R) grupos terminais redutores –círculos preenchidos (NR) grupos terminais não redutores – círculos não preenchidos (Terri, 1997).....	20
Figura 6. Efeito do pré-tratamento sobre as fibras do material lignocelulósico (adaptado por Hsu <i>et al.</i> , 1980).....	25
Figura 7. Produção de xilanase pelas cepas de <i>Trichoderma</i> em FES, tendo como fontes de nitrogênio: Uréia (U); (NH ₄) ₂ SO ₄ (S); NH ₄ NO ₃ (N) ou NH ₄ Cl (Cl). As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) a 28°C. O experimento foi realizado em triplicado (± desvio padrão).....	44
Figura 8. Produção de CMCase das cepas de <i>Trichoderma</i> em FES, em substratos tendo como fontes de nitrogênio ureia (U); (NH ₄) ₂ SO ₄ (S); NH ₄ NO ₃ (N) ou NH ₄ Cl (Cl). As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) a 28°C. O experimento foi realizado em triplicado (± desvio padrão).....	48
Figura 9. Teste qualitativo de atividade de lacase nos meios de cultivo de <i>T. asperelloides</i> (F22), <i>T. harzianum</i> (F03), <i>Trichoderma virens</i> (F28) e <i>Trichoderma sp.</i> (G03) com as placas foram incubadas a 28°C durante 72 horas.....	52
Figura 10. Extração das enzimas lignocelulósicas por diferentes volumes de eluente (água destilada) das espécies de <i>Trichoderma</i> (a) <i>Trichoderma asperelloides</i> , (b) <i>T.virens</i> , (c) <i>T. harzianum</i> e (d) <i>T. sp.</i> As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e ureia a 28°C.....	54
Figura 11. Perfil de produção enzimática em FES, em diferentes temperaturas de incubação.....	56
Figura 12. Perfil de produção enzimática em FES, em diferentes valores de pH.....	58
Figura 13. Produção enzimática em FES, em diferentes concentrações de ureia como fonte de nitrogênio.....	60

Figura 14. Produção das enzimas pelas espécies de <i>Trichoderma</i> em FES, por 48h, 120h e 192h.....	62
Figura 15. Produção das enzimas pelas espécies de <i>Trichoderma</i> em FES, utilizando diferentes misturas de resíduos lignocelulósicos (5g de mistura de bagaço de cana com farelo de trigo na proporção de 1:1), a 28°C, e pelo tempo de incubação de melhor produção das enzimas.....	64
Figura 16. Forno micro-ondas adaptado (Silva <i>et al.</i> , 2006).....	69
Figura 17. Liberação de açúcares redutores totais (a) e de compostos fenólicos totais (b) após 2min de tratamento com ação de micro-ondas em presença de diferentes compostos químicos.....	75
Figura 18. Quantidade de açúcar redutor total (ART) liberado por hidrólise enzimática utilizando preparado enzimático das espécies de <i>Trichoderma</i> e por enzima comercial Celluclast 1.5 L (Sigma).....	78
Figura 19. Termograma (DSC) do bagaço de cana não tratado e após tratamento com micro-ondas em solução alcalina.....	79
Figura 20. Termograma (TGA e DTG) do bagaço de cana não tratado após tratado com microondas em solução alcalina.....	81
Figura 21. Eletromicrografia (microscopia eletrônica de varredura – MEV) de bagaço de cana-de-açúcar controle (ausência de micro-ondas) – <i>in natura</i>	82
Figura 22. Eletromicrografia (MEV) de bagaço de cana de açúcar emergido por 24 h em solução de água associado a NaOH (0,01M) sob a ação de 2 min de micro-ondas.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Trichoderma</i> selecionadas para os ensaios de fermentação em estado sólido.....	35
Tabela 2. Resultados da identificação molecular e filogenética.....	53
Tabela 3. Atividade enzimática das quatro dez linhagens de <i>Trichoderma</i> (Egea <i>et al.</i> , 2014).....	65
Tabela 4. Resumo das melhores condições obtidas no presente trabalho na produção de CMCase, B-glicosidade e Xilanase, sob diferentes condições físico-químicas.....	65
Tabela 5. Composição química do bagaço de cana não tratado e submetido ao tratamento com micro-ondas em meios ácidos, alcalino e em presença de glicerol.....	73
Tabela 6. Diferença de peso do bagaço de cana <i>in natura</i> e após os tratamentos com NaOH, H ₃ PO ₄ , glicerol e água.....	76

RESUMO

O presente estudo foi dividido em duas etapas, a primeira propôs a produção de enzimas lignocelulósicas por linhagens do gênero *Trichoderma* por fermentação em estado sólido sob diferentes condições físico-químicas. Após seleção inicial, quatro dentre dez linhagens analisadas, apresentaram resultados satisfatórios quanto à atividade enzimática. Dentre as quatro, foram identificadas as espécies *T. virens*, *T. harzianum* e *T. asperelloides*. A maior atividade de CMCase (23 U/g), foi obtida do cultivo de *T. asperelloides* e a maior atividade de β -glicosidase (4 U/g) e xilanase (1640 U/g) do cultivo de *T. virens*. Na segunda etapa deste estudo, foi avaliada a eficiência do pré-tratamento com e sem o uso de micro-ondas associado a soluções de ácido fosfórico (0,05 M), hidróxido de sódio (0,01 M), glicerol (10%) e água no tratamento do bagaço de cana. Dos tratamentos ao qual o bagaço foi submetido, o que resultou em maior liberação de compostos fenólicos totais (4,24 mg/g) e açúcares redutores ($0,06 \pm 0$ mg/g), foram os tratamentos por micro-ondas associados ao NaOH e glicerol, respectivamente. Os resultados de perda de massa após o tratamento foram significativos no tratamento com micro-ondas e NaOH (14%). O bagaço de cana pré-tratado foi incubado com o preparo enzimático de *Trichoderma virens*, *T. asperelloides*, *T. harzianum* ou a enzima comercial Celluclast. Após 24 horas de incubação foram liberados 535 mg/g de açúcar redutor na hidrólise da espécie *T. virens*. As análises termogravimétricas e morfológicas do bagaço de cana tratado com micro-ondas e NaOH, apontaram mudanças na estrutura do material evidenciando a eficiência do tratamento na desestruturação da biomassa.

Palavras-chave: fermentação sólida, bagaço de cana, pré-tratamento, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

This study was divided in two steps, the first investigated the production of lignocelulosic enzymes for specimens of *Trichoderma* cultivated by state solid fermentation under different conditions physical-chemical. For ten specimens available, four showed satisfactory results of enzymatic production, being identified three species. *T. virens*, *T. harzianum* e *T. asperelloides*). The greatest production of CMCase (23 U/g), was obtained by *T. asperelloides* and the greatest production of β -glucosidase (4U/g) and xylanase (1640U/g) were obtained by *T. virens*. In the second investigation, was tested the efficiency of pre-treatment of bagasse sugar cane with microwave radiation in presence of acid phosphoric (0.05M), sodium hydroxide (0.01M), glycerol (10%) all diluted in water in fiber structure. About the treatments of the bagasse, the most efficient in the liberation of phenolic compounds (4.24 mg/g) and reducing sugars (0.06 $\pm$ 0 mg/g) was the solution in microwave with NaOH and glycerol, respectively. The dry weight results after the treatment were significant, with a maximum of 14% loss of the initial in treatment with NaOH. The thermogravimetry and morphological analysis of treated bagasse with a microwave and NaOH, showed changes in the structure of the material showing the effectiveness of treatment in biomass breakdown.

Keywords: state solid fermentation, sugar cane bagasse, pre-treatment, enzymatic hydrolysis.

INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos para o cultivo de microrganismos, além de viabilizar a produção de produtos como, etanol e enzimas lignocelulósicas, pode ajudar a solucionar problemas ambientais causados pelo seu descarte (Reddy *et al.*, 2003). A conversão microbiana de materiais vegetais em produtos de interesse comercial como o etanol, entretanto, requer algumas etapas sequenciais, como pré-tratamento, sacarificação enzimática e fermentação.

A fermentação em estado sólido apresenta grande potencial como processo de produção de enzimas a baixo custo. Os resíduos agroindustriais utilizados por FES são geralmente considerados os melhores substratos indutores de enzimas como celulasas, hemicelulasas e ligninases. (Pandey *et al.*, 2000). Além disso, na natureza, diversos microrganismos, são capazes de crescer nesses materiais, principalmente os fungos filamentosos, uma vez que as condições da FES estão muito próximas às de seus ambientes naturais (Fischer *et al.*, 2008).

O maior obstáculo encontrado ao longo do processo de produção de etanol é a conversão das fibras que compõem a parede celular vegetal em açúcares simples, devido à recalcitrância desses materiais que impede a ação eficiente das enzimas. Contudo, esse entrave pode ser minimizado pelo pré-tratamento do material, que facilita o acesso da enzima às fibras, reduz os custos de produção das mesmas e potencializa os rendimentos de açúcar na hidrólise (Wei *et al.*, 2009). A ação do pré-tratamento resulta em mudanças físico-químicas na biomassa como, alteração na superfície, volume de poros, a cristalinidade da biomassa, mudança da lignina e o grau de polimerização da celulose. Esses processos são essenciais, pois tornam a celulose mais acessível à hidrólise enzimática.

A hidrólise, etapa posterior ao pré-tratamento, pode ser realizada por diferentes rotas, sendo as mais conhecidas a ácida e a enzimática. Dentre as vantagens da sacarificação

enzimática em relação à ácida, estão a não formação de produtos indesejáveis e o maior rendimento.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo a produção de enzimas celulasas, xilanase e lacase por diferentes espécies do gênero *Trichoderma*, utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato para a FES e aplicação destas enzimas na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com micro-ondas em meios ácidos, alcalinos e em presença de glicerol.

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1. Biomassa lignocelulósica

A industrialização e o crescimento populacional estão entre os principais fatores de aumento da demanda global de energia. Segundo Goldemberg (2008), cerca de 80% da energia consumida mundialmente se origina de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás) que são fontes não renováveis e sujeitas à escassez. A fim de atender à crescente demanda energética e diminuir a dependência dos combustíveis não renováveis, pesquisas têm sido direcionadas para as fontes alternativas e renováveis (Amores *et al.*, 2013). O próprio crescimento das atividades de produção e do padrão de consumo humano, resulta em um acúmulo de rejeitos ou subprodutos que constituem fontes energéticas renováveis como o papel, palha de milho, palha de arroz, bagaço e palha de cana-de-açúcar, resíduos da madeira, entre outros (Sanchez, 2009; Maeda *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2011, Ran *et al.*, 2012).

Avanços na biotecnologia industrial, principalmente na área de tecnologia enzimática e de fermentação, oferecem oportunidades potenciais para o aproveitamento econômico destes resíduos que podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado como biocombustíveis, aditivos de alimentos, compostos farmacêuticos ou outros para química fina (Pandey *et al.*, 2000).

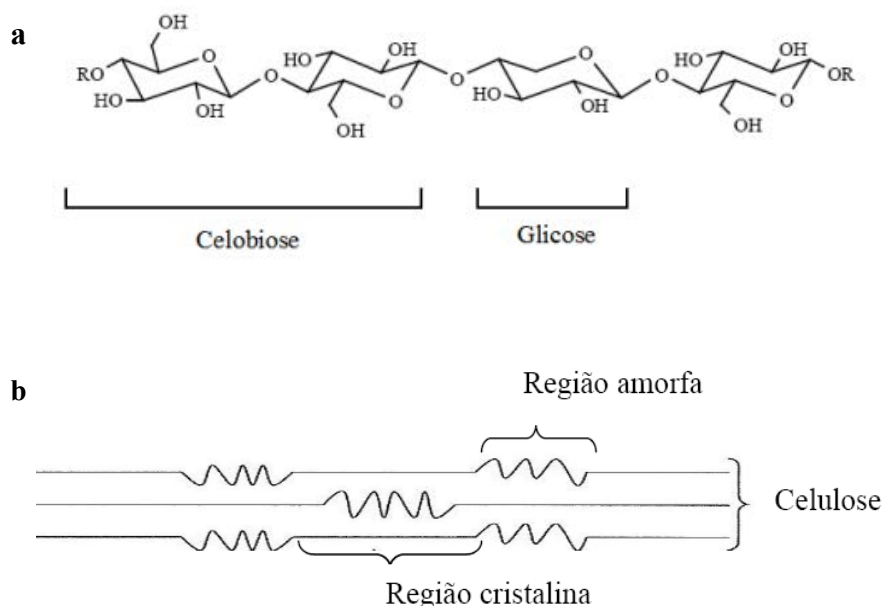
O principal biocombustível proveniente da biomassa na atualidade é o etanol, resultante da fermentação da glicose e frutose proveniente da sacarose da cana-de-açúcar ou glicose de beterraba e do amido de milho. Esse etanol, denominado de primeira geração, requer uma produção agrícola direcionada especificamente para esse fim, embutindo nesta, custos financeiros, ambientais e sociais. Por outro lado, o etanol dito de segunda geração é definido como um álcool obtido a partir de biomassa residual e que complementaria a produção do etanol de primeira geração sem ampliação de áreas cultivadas (Goyal *et al.*, 1991; Wyk, 2001).

As biomassas residuais de interesse para o etanol de segunda geração compreendem, principalmente, as amiláceas e as lignocelulósicas, cuja riqueza em açúcares extraíveis depende da composição das mesmas, que, por sua vez, depende do tipo de vegetal, das condições de cultivo, da idade da planta, entre outros (Wiseloge *et al.*, 1996).

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar, principais resíduos agroindustriais brasileiros, tem sido a principal biomassa estudada no Brasil para produção do etanol de segunda geração em função da abundância de matéria em função da abundância de matéria nas indústrias sucroalcooleira (Karp *et al.*, 2013). Este material é composto de 50% de umidade, 2% de Brix (sólidos solúveis em água), 32- 50% de celulose, 19–25% de hemiceluloses e 23-32% de lignina além de 2% de cinzas (Silva, 2010).

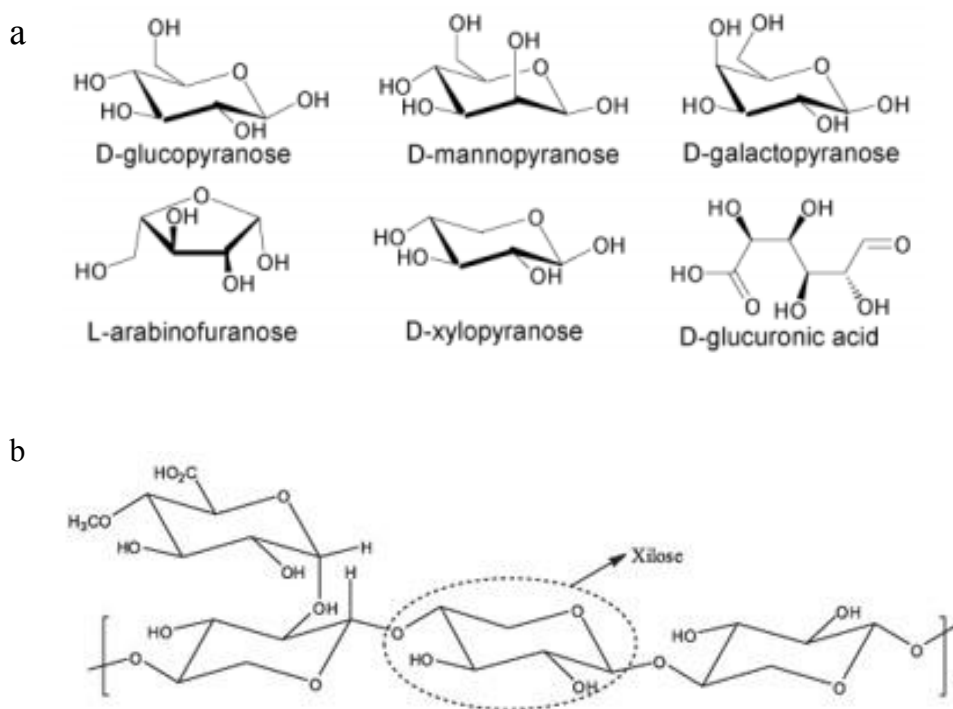
A celulose (figura 1) apresenta em sua estrutura unidades de celobiose (dímeros de glicose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, cujo tamanho da molécula é referido como grau de polimerização (DP). As cadeias de glicose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas. A região cristalina, primeiramente descrita por Mark & Meyer, em 1928, possui configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e por força de van der Waals. A organização cristalina influencia a sua reatividade ao impedir/controlar o acesso de substâncias químicas ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nessas regiões. A região amorfa é menos ordenada e mais susceptível à hidrólise enzimática (Sandgren *et al.*, 2005; Ferreira & Rocha, 2009).

Figura 16. Estrutura da celulose (a) (Fengel & Wegener, 1989) e das regiões amorfa e cristalina (b) (Krause *et al.*, 2003).



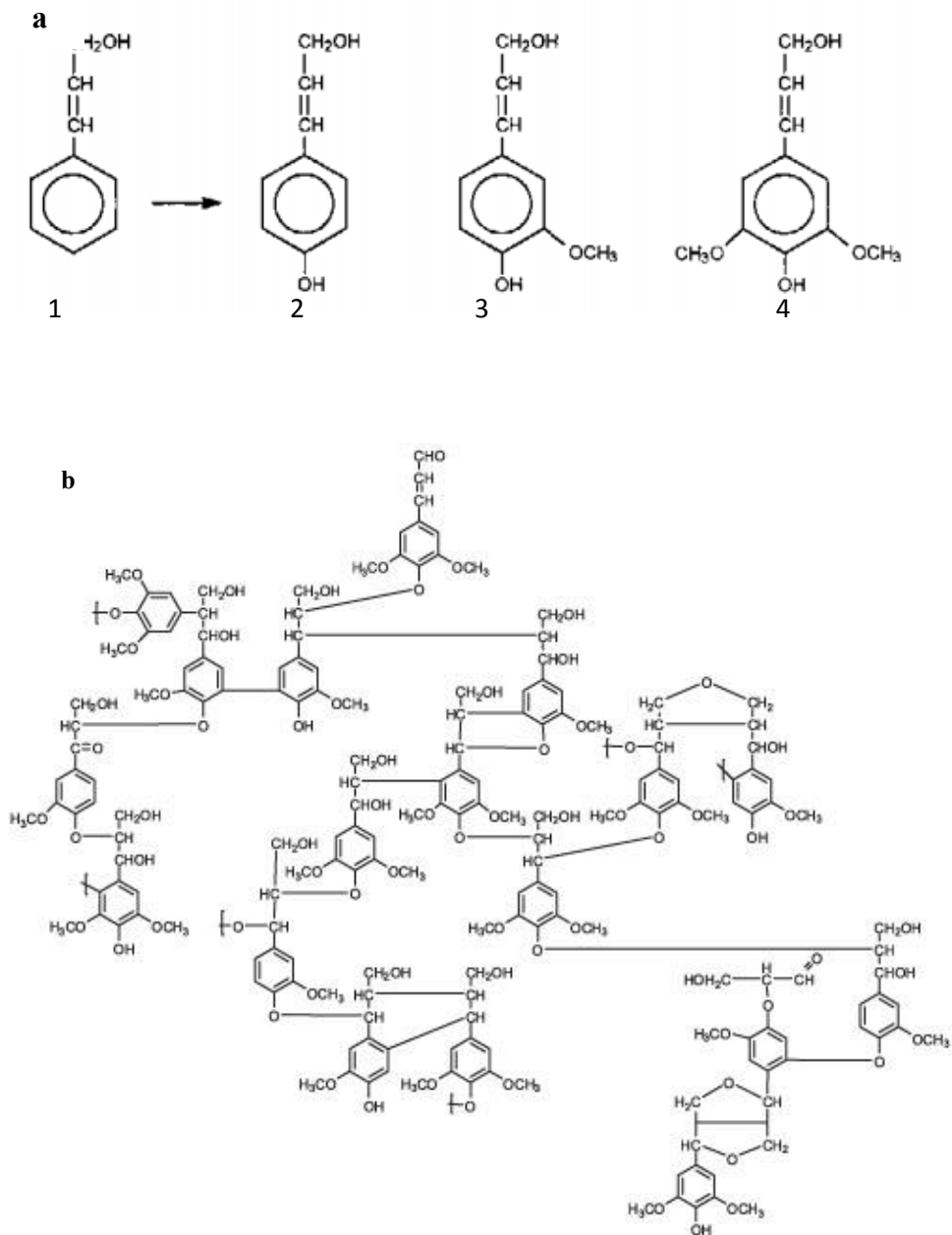
As hemiceluloses (figura 2), segundo composto mais abundante na biomassa lignocelulósica, são polímeros heterogêneos formados por D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-manose e L-arabinose (Chandel *et al.*, 2007b). A xilana é seu componente principal, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,4 que constituem a cadeia central do heteropolímero (Sunna & Antranikian, 1997). A hemicelulose representa uma íntima conexão entre a lignina e as fibras de celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. As pectinas são polissacarídeos coloidais ácidos complexos, com resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4. As cadeias consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (Kashyap *et al.*, 2001).

Figura 17. (a) Monômeros da hemicelulose (Hansen & Plackett, 2008), (b) estrutura da hemicelulose.



A lignina (figura 3) constitui o componente não-carboidrato do material lignocelulósico, depositado na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento. Esta é ligada covalentemente a hemicelulose, principalmente com ligações do tipo éster de xilanas, formando uma matriz complexa que envolve as microfibrilas de celulose (Sandgren *et al*, 2005). A lignina é constituída de unidades de fenilpropano (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) e tem como funções proporcionar resistência às plantas contra o ataque de microrganismos, aumentar a rigidez do tecido e impermeabilizar vasos condutores (Hendriks & Zeeman, 2009; Doherty *et al.*, 2011).

Figura 18. Precursores primários na formação da lignina, derivados do álcool cimânico (a) (1): álcool p-cumárico (2), álcool trans-coniferílico (3) e álcool trans-sinapílico (4) (Fengel & Wegener, 1989) e a estrutura da lignina de eucalipto (b).

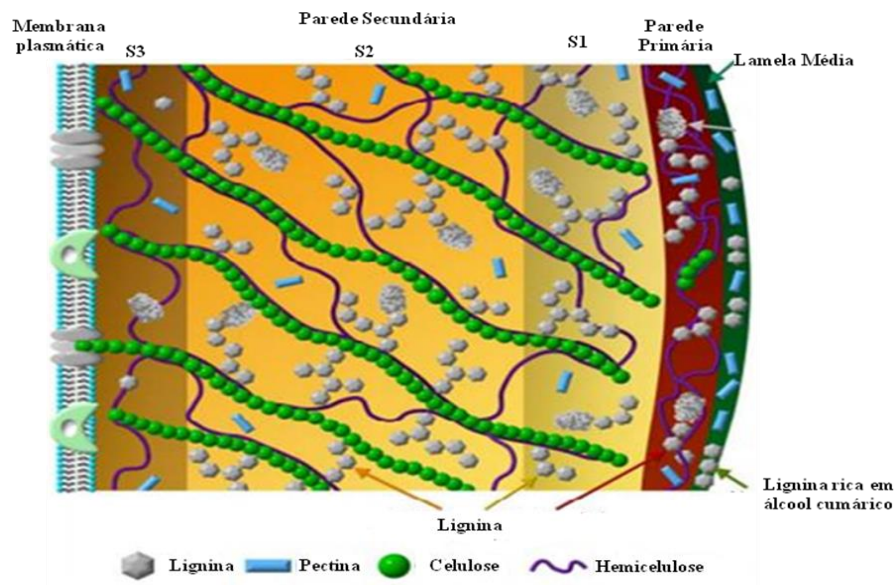


1.1 Estrutura da parede celular

Na maioria dos tipos de biomassa vegetal os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva, cerca de 90% da massa seca total. A estrutura da parede celular vegetal é semelhante entre as espécies, sendo constituída por três camadas: lamela média (LM), parede primária (P) e parede secundária (S1, S2, S3) (figura 4). A lamela média é uma camada presente entre as células, composta por substâncias pécicas, situada entre as paredes primárias de células vizinhas, permitindo a união e a comunicação química entre estas células. A parede primária é mais externa produzida durante o desenvolvimento da planta, variando em sua espessura e podendo apresentar camadas distintas, como em células epidérmicas. A parede primária apresenta fibrilas de celulose e sua matriz é composta principalmente por substâncias pécicas e hemicelulose, podendo também ser lignificada. Suas regiões mais delgadas recebem o nome de campos primários de pontoação os quais podem ser atravessados por filamentos citoplasmáticos (plasmodesmos) que estabelecem comunicação entre o protoplasma de células adjacentes (Srivastava, 2002).

Após o término da expansão celular da parede primária, é depositada na superfície interna da mesma, a parede secundária, que ao se depositar não cobre os campos primários de pontoação, resultando na membrana de pontoação. A parede secundária é constituída principalmente de celulose e hemiceluloses, além de quantidades variáveis de lignina, sendo esta mais rígida que a parede primária. Além disso, ela pode apresentar três camadas, uma secundária fina, uma relativamente espessa e novamente outra mais fina. As variações na espessura total da parede secundária são devidas principalmente às oscilações na espessura da camada central. Várias camadas de paredes secundárias são a característica de algumas células fibrosas, por exemplo, aquelas encontradas em tecidos de caule e de muitas monocotiledôneas (Srivastava, 2002).

Figura 19. Ilustração da estrutura da parede celular de uma célula vegetal (modificado de Achyuthan *et al.*, 2010).



2. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa

2.1. Celulases

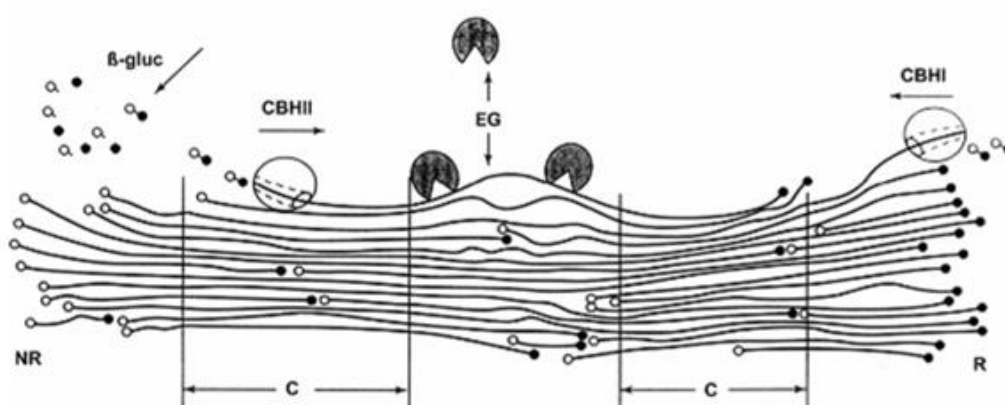
As celulases são um grupo de enzimas que atuam em sinergismo, levando a degradação da celulose em glicose por meio da clivagem das ligações *O*-glicosídicas. São classificadas de acordo com o local que atuam no substrato celulósico. As endoglucanases (EnG) (EC 3.2.1.4) são responsáveis por iniciar a hidrólise da cadeia de glicose criando novas extremidades. Essas enzimas atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4). Sua atividade catalítica pode ser medida através da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose (Lynd & Wyman, 1999; Castro & Pereira Jr., 2010) e pela dosagem de açúcares redutores. As exoglucanases (ExG) (EC 3.2.1.9.1), ou celobiohidrolases (CBH), atuam na região externa da celulose, sendo divididas em CBHI, que hidrolisam terminais

redutores e CBHII, que hidrolisam terminais não redutores e também GH (glucano hidrolases), capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulolítica.

As β -glicosidases (BG) (EC 3.2.1.21) hidrolisam os oligossacarídeos solúveis e dextrinas curtas e celobiose a glicose (Li *et al.*, 2003; Castro & Pereira Jr., 2010). Assim como a CBH, a β -glicosidases sofrem inibição por seu produto da hidrólise.

A ação sinérgica entre essas enzimas (figura 5) podem ocorrer de três formas, (Heydorne *et al.*, 2006): sinergia endoglucanase-exoglucanase: a endoglucanase disponibiliza terminais redutores e não redutores para a atuação de CBHI e CBHII, respectivamente; sinergia exoglucanase-exoglucanase: as CBHI e CBHII atuam em conjunto nos terminais redutores e não redutores liberados pela hidrólise realizada pelas endoglucanases; sinergias exoglucanase- β -glicosidase e endoglucanase- β -glicosidase: as celobiohidrolases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos utilizados pela β -glicosidase.

Figura 20. Esquema simplificado da hidrólise enzimática da celulose sob ação das celulases de *Trichoderma reesei*. (C) região cristalina (R) grupos terminais redutores –círculos preenchidos (NR) grupos terminais não redutores – círculos não preenchidos (Terri, 1997).



2.2. Hemicelulases

A completa degradação das hemiceluloses requerem ação sinérgica de uma variedade de enzimas hidrolíticas, entre as quais se destacam as do complexo xilanolítico: as *endo-1,4-β-D-xylanases* (EC 3.2.1.8) que catalisam a quebra de ligações β-1,4 da molécula de xilana internamente a estrutura polissacarídica, resultando em um decréscimo no grau de polimerização da cadeia; as *β-xilosidases* (EC 3.2.1.37) que hidrolisam xilooligossacarídeos curtos liberando xilose; as *α-L-arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55) que hidrolisam os grupos α-L-arabinofuranosil terminais; as *α-glucoronidases* (EC 3.2.1.1) são requeridas para a hidrólise das ligações α-1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glicurônico ou sua ligação 4-*O*-metil-éster; as *acetil xilana esterases* (EC 3.1.1.72) hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético e ácido ferrúlico; as *ferruloil esterases* (EC 3.1.1.73) (ácido ferrulico esterases, cinnamoil esterases, ácido cinnamico hidrolases, *p*-coumaroil esterases, hidroxycinnamoil esterases), apresentam um papel chave proporcionando um aumento na acessibilidade das enzimas hidrolíticas aos polímeros da hemiceluloses, devido à quebra de ligações cruzadas das cadeias laterais com o ácido ferrulico que liga a hemiceluloses à lignina e (Papinutti & Forchiassi, 2007; Wong *et al.*, 1988; Wong, 2006). A ferruloil esterase quebra as ligações éster entre os ácidos hidroxycinnamicos estereificados em arabinoxilana e certas pectinas presentes na parede celular da planta. Todas as enzimas (exceto a *p*-coumaril esterase de *A. awamori*) são ativas sobre ferrulato metil, um substrato sintético comumente utilizado nos ensaios de ferruloil esterase (Vries *et al.*, 1997).

2.3. Ligninases

A lacase (E.C. 1.10.3.2) é uma proteína multicobre pertencente à família das enzimas oxidases azuis. Essa enzima geralmente contém quatro íons cobre, agrupados em três grupos: T1, formado por um íon e é encarregado da oxidação do substrato e pela transferência de

elétrons; T2, também formado por um íon e, juntamente com o grupo T3, que contém dois íons, constitui o centro trinuclear de cobre, envolvido na redução do oxigênio e liberação de água (Torres *et al.*, 2003). A catálise está fundamentada na redução do oxigênio molecular formando água, por meio de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato. O ciclo catalítico das lacases inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado à T1 remove elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que reduz o O₂ a H₂O, ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos Cα e desmetilações (Baldrian, 2006). A lacase é classificada como fenol oxidase e catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos (particularmente fenóis) com concomitante redução de oxigênio a água. Entre os substratos oxidados por essa enzima encontram-se: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, alguns difenilmetanos e benzopirenos (Durán & Esposito, 2000).

A lignina peroxidase (LiP) (E. C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína que possui grupo prostético constituído de ferro protoporfirina IX, com atividade catalítica dependente de H₂O₂ (Rodríguez & Durán, 1988). O H₂O₂ necessário à atividade da LiP origina-se de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo (Conessa *et al.*, 2002). LiP é uma enzima capaz de oxidar vários compostos aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico, clivar cadeias laterais desses compostos, catalisar reações de abertura de anéis aromáticos, desmetoxilação e desclorinação oxidativa (Conessa *et al.*, 2002). Inicialmente, no ciclo catalítico das LiP, a enzima e o Fe³⁺ contido no sítio ativo são oxidados pelo H₂O₂, gerando água e um intermediário com dois elétrons oxidados, denominado Composto I. Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, gerando um substrato-radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como Fe⁴⁺. O Composto II oxida um segundo substrato (que pode ser outra molécula

de álcool veratrílico), originando outro substrato-radical livre, e a enzima volta à sua conformação original (Hammel & Cullen, 2008).

A manganês peroxidase (MnP, E. C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular glicosilada que possui grupo prostético heme (Steffen *et al.*, 2002). O ciclo catalítico da MnP inicia-se pela transferência de dois elétrons do sítio ativo da enzima para o H_2O_2 , gerando o Composto I oxidado denominado Complexo Fe^{4+} -oxoporfirina, com liberação de água. A seguir, o Mn^{2+} reduz o Composto I a composto II, e é liberado na forma de Mn^{3+} . Uma segunda redução do composto II por outro íon de Mn^{2+} restitui a enzima à sua configuração nativa. As transferências de elétrons envolvendo o manganês ocorrem na presença de radicais dicarboxílicos, como oxalato, malato, fumarato e malonato (Leonowicz *et al.*, 1999).

3. Fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas microbianas

O elevado custo na produção das enzimas lignocelulolíticas tem sido um dos principais entraves para aplicação dessas enzimas em processos industriais. A fim de minimizar esse problema, tem sido sugerido o uso de substratos disponíveis e de baixo custo na fermentação (Gao *et al.*, 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é descrita na literatura como o processo em que o substrato sólido é utilizado pelo microrganismo como fonte de energia e carbono ou é usado apenas como suporte inerte, sendo a fonte de carbono de outra origem (Pandey *et al.*, 2000). É um processo onde há ausência ou quase ausência de água livre (Pandey, 2003; Raghavarao *et al.*, 2003). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em um bioprocessos, a água possui diversas funções, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, a remoção de metabólitos e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e

carboidratos, da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática (Raimbault., 1998; Gervais *et al.*, 2003).

Dentre as vantagens observadas no processo de FES estão, menor possibilidade de contaminação pela ausência de água livre no sistema, menor volume de resíduos líquidos gerados, maior produtividade e maior concentração do produto final em relação a outros tipos de fermentação como por exemplo a fermentação submersa, pelo fato do extrato ser menos diluído (Castro & Pereira Jr., 2010).

Em diversos trabalhos tem sido aplicado o processo de FES para obtenção de celulasas e xilanase (Moretti *et al.*, 2012), β -glicosidase (Pereira *et al.*, 2014).

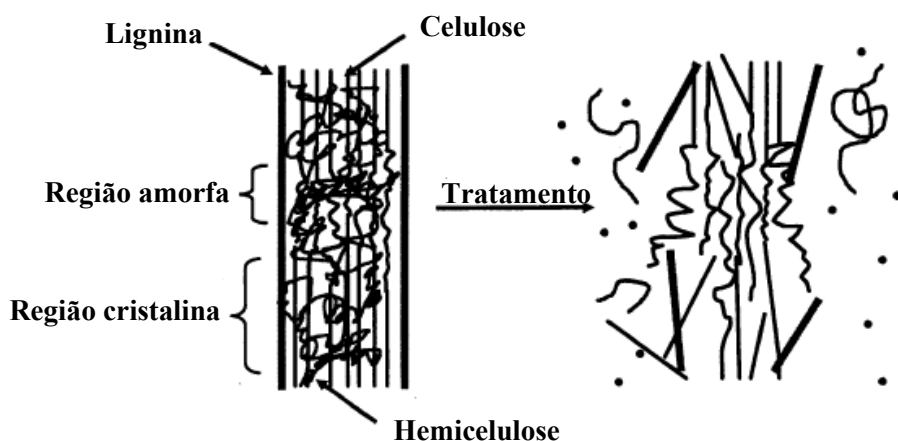
4. Desestruturação do material: pré-tratamentos

As características químicas e morfo-estruturais da biomassa lignocelulósica, conforme mencionado anteriormente, são barreiras ao ataque de microrganismos e/ou enzimas (Fengel & Wegener, 1989) dificultando a recuperação dos açúcares constituintes da mesma (Sun & Cheng, 2002).

Entre as diversas estratégias para a conversão desses materiais em açúcares fermentescíveis, os pré-tratamentos são procedimentos que visam alterar/remover as hemiceluloses e/ou a lignina, aumentar a área superficial para o acesso das enzimas e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, expondo o material a ação das enzimas ou compostos químicos aumentando a hidrólise da celulose e promovendo maiores os rendimentos em açúcares fermentescíveis (Li *et al.*, 2010). A eficácia do pré-tratamento obedece a critérios como: (a) evitar a degradação dos carboidratos a fim de manter o máximo possível dos polissacarídeos para um maior rendimento de açúcares; (b) alterar a localização da lignina no substrato. Em tratamentos com elevada temperatura, como os hidrotermais, a lignina é realocada do seu lugar original, e pouco removida do substrato. Essa relocação da lignina para

superfície superior do material expõe a superfície interna da celulose, facilitando o acesso das enzimas (Kristensen *et al.*, 2008). Assim, a completa deslignificação da lignina nem sempre é necessária para que o tratamento seja eficaz, enquanto que sua localização no material interfere na hidrólise enzimática (Várnai *et al.*, 2010); (c) evitar a formação de inibidores da *Saccharomyces cerevisiae* como furfural, HMF, ácido fórmico, compostos fenólicos ou outros, os quais podem ficar retidos no hidrolisado a ser usado na fermentação subsequente (Tomás-Pejó *et al.*, 2010); (d) aumentar a área superficial da celulose pela remoção das hemiceluloses e lignina, aumentando a acessibilidade das celulasas na hidrólise. A figura 6 representa alterações estruturais no material lignocelulósico após pré-tratamento.

Figura 21. Efeito do pré-tratamento sobre as fibras do material lignocelulósico (adaptado por Hsu *et al.*, 1980).



Vários métodos de pré-tratamento têm sido empregados, sendo possível dividi-los em: pré-tratamentos físicos (hidrotérmicos, micro-ondas, radiação de alta energia), químicos (ácido, alcalino, líquido iônico, organosolve, ozonólise), e a combinação deles (explosão a vapor, AFEX, oxidação úmida, explosão com CO₂) e os biológicos com uso do crescimento microbiano sobre as fibras ou usando preparados enzimáticos.

4.1. Pré-tratamentos Físicos

Dentre os tratamentos físicos, estão hidrotérmico, radiação de alta energia, micro-ondas, sendo os mais utilizados, explosão a vapor e hidrotérmico.

4.1.1 Explosão a vapor

A explosão a vapor, tem sido reportada por diversos autores (Kallionem *et al.*, 2013, Harrison *et al.*, 2013, Soares & Gouveia, 2013, Li & Chen, 2014, Ramos, *et al.*, 2015). Consiste em um tratamento no qual a biomassa é submetida a vapor pressurizado por um período de tempo e, em seguida, ocorre uma despressurização súbita, com rompimento das fibras, transformação da lignina e hidrólise da hemicelulose. Como principal desvantagem está a degradação parcial das hemiceluloses e a geração de compostos derivados da hidrólise da lignina ou da oxidação de açúcares, como furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos que podem inibir as etapas de hidrólise enzimática e fermentação (Zheng *et al.*, 2009; Alvira *et al.*, 2010).

4.1.2. Micro-ondas

A ação das micro-ondas sobre moléculas de água provoca um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento. Os choques provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo lignocelulósico (Sanseverino, 2002) degradando ou removendo parcialmente a lignina e as hemiceluloses, aumentando a susceptibilidade dos polissacarídeos à ação enzimática (Ma *et al.*, 2009). Suas vantagens estão em ser um processo rápido, que proporciona uniformidade do aquecimento (Cheng *et al.*, 2011) com menor gasto de energia do que o aquecimento convencional (Cheng *et al.*, 2011). Esse método tem sido empregado em associação a soluções alcalinas (Zhu *et al.*, 2006), ácidas (Gabhane *et al.*, 2011) e ácidas com glicerol (Moretti *et al.*, 2014).

4.2. Pré-tratamentos químicos

4.2.1. Pré-tratamento ácido

É o pré-tratamento mais utilizado com rendimento elevado na liberação de açúcares (Lee *et al.*, 2013). Diversos ácidos têm sido empregados como ácido sulfúrico (Benjamim *et al.*, 2013, Harrison *et al.*, 2013, Imman *et al.*, 2014, Cesário *et al.*, 2014), ácido fosfórico (Goshadrou *et al.*, 2011, Moretti *et al.*, 2014, Ramos *et al.*, 2015), ácido clorídrico (Yu *et al.*, 2013, Zu *et al.*, 2014). O tratamento com ácido sulfúrico é o mais utilizado, causando quebra das ligações entre a lignina, hemicelulose e celulose, alteração estrutural na lignina e redução no tamanho das partículas do material. A lignina solubilizada nesse tratamento é condensada durante o abaixamento da temperatura precipitando em ambientes ácidos (Hendriks & Zeeman, 2009; Zheng *et al.*, 2006). Entre as desvantagens do tratamento está a formação de compostos inibidores a partir da degradação dos açúcares, como furfural e 5-hidroximetilfurfural, que podem afetar o metabolismo dos microrganismos no processo de fermentação (Behera *et al.*, 2014). O pré-tratamento ácido hidrolisa as hemiceluloses, principalmente a xilana e solubiliza parcialmente a celulose, tornando a fração celulolítica remanescente mais acessível a ação das enzimas (Pedersen & Meyer, 2011).

4.2.2. Pré-tratamento alcalino

Em comparação as outras tecnologias, a principal característica do pré-tratamento alcalino é a remoção de forma eficaz da maior parte da lignina, solubilização parcial da hemicelulose, aumentando a digestibilidade enzimática da celulose em condições menos severas, com menor temperatura (Qi & He, 2010b; Kim & Han, 2012; Singh & Bishnoi, 2013). Em comparação ao tratamento ácido, o pré-tratamento alcalino resulta em menor degradação dos açúcares (Kumar & Wyman, 2009b), entretanto, existem algumas desvantagens como a

conversão dos álcalis em sais não recuperáveis ou sua incorporação na biomassa durante as reações de pré-tratamento (Hendriks & Zeeman, 2009).

Diversas bases e agentes oxidantes tem sido empregados no tratamento alcalino, como hidróxido de sódio (Zhang *et al.*, 2013, Maryana *et al.*, 2014, Cabrera *et al.*, 2014, Gao *et al.*, 2014, Abdel-Halim, 2014), hidróxido de cálcio (Rabelo *et al.*, 2013), peróxido de hidrogênio alcalino (Rabelo *et al.*, 2014), hidróxido de cálcio (Rabelo *et al.*, 2011), hidróxido de sódio associado ao peróxido de hidrogênio (Camassola & Dillon, 2014), cloreto de sódio (Gupta *et al.*, 2011), dentre outros.

4.2.3 AFEX (ammonia fiber explosion)

AFEX é um tratamento físico-químico no qual a biomassa é exposta a um líquido amônia a elevada temperatura, sob alta pressão, por um certo período e depois a pressão é subitamente reduzida. Quando isso ocorre, a estrutura da biomassa lignocelulósica é aberta aumentando sua digestibilidade pela ação das enzimas (Isc *et al.*, 2008; Murnen *et al.*, 2007). Uma vantagem desse tratamento é que os resíduos de amônia que permanecem que permanecem ligados à matriz lignocelulósica servem como fonte de nitrogênio para a levedura na fermentação subsequente, dispensando procedimentos de lavagem e neutralização (Krishnan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

4.2.4. Ozonólise

Tem sido amplamente utilizado em diversos materiais, como o bagaço de cana (Travaini *et al.*, 2014). Apresenta alta afinidade de reação com lignina, mas pouca com a hemiceluloses e celulose e portanto gera poucos compostos inibitórios (Travaini *et al.*, 2013), sendo um processo realizado em temperatura e pressão ambiente. Além disso, sua utilização resulta em elevado rendimento na hidrólise enzimática, podendo reduzir a lignina em até 42% (Kaur *et al.*,

2012). No entanto, a ozonólise requer uma grande quantidade de ozônio, o que torna o processo caro. O ozônio é altamente reativo com compostos que possuem ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons (Cubero *et al.*, 2009). Portanto a lignina é o material mais provável de ser oxidado pela ação do ozônio devido principalmente a estrutura aromática de seus precursores e a grande quantidade de ligações duplas entre carbonos. (Kaur *et al.*, 2012, Travaini, *et al.*, 2013).

4.2.5. Organosolve

Consiste em misturas aquosas com solventes orgânicos, tais como metanol, etanol, acetona, etileno glicol e álcool tetra-hidrofurfurílico, em uma faixa de temperatura entre 150-200°C (Alvira *et al.*, 2011). Devido ao elevado custo dos solventes, etanol e metanol são preferidos em relação ao álcool tetra-hidrofurfurílico (Arato, *et al.*, 2005). Nesse processo há remoção da lignina e solubilização da hemicelulose (Zhao *et al.*, 2009). Uma das desvantagens consiste na produção significativa de furfural, HMF e fenóis da decomposição da lignina no pré-hidrolisado obtido do pré-tratamento (Gírio *et al.*, 2010, Zhu & Pan, 2010).

4.3. Pré-tratamento biológico

O tratamento biológico tem sido associado a ação de fungos e bactérias, capazes de produzir enzimas que degradam lignina e hemiceluloses da biomassa. O tratamento não requer muita energia e não gera compostos tóxicos (Ria-Milat *et al.*, 2011 *apud* Behera *et al.*, 2014). Entretanto, é um processo lento e requer controle das condições de cultivo (Chandra *et al.*, 2007).

Fungos de podridão branca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerate*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* tem sido reportados como microrganismos eficientes na deslignificação de diferentes biomassas (Nallapeta *et al.*, 2012; Vijaya & Reddy, 2012).

5. Formação de inibidores

Os compostos inibidores são formados a partir da degradação do material lignocelulósico. Entre eles são citados o furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos carboxílicos (ácido fórmico) e fenol e seus derivados. A concentração desses compostos depende do tipo de material (resíduos agrícolas ou florestais) e das condições de pré-tratamento empregadas como temperatura, pH e tempo (Cardona *et al.*, 2010; Redding *et al.*, 2011).

Por serem indesejáveis na fermentação, é recomendado que o material seja lavado após o pré-tratamento, separando o líquido do sólido a ser hidrolisado (Kim *et al.*, 2011; Mood *et al.*, 2013). Li *et al.* (2004) reportaram a sensibilidade de *S. cerevisiae* na presença de furfural e HMF, os quais diminuem o crescimento do microrganismo (Liu *et al.*, 2004).

A presença desses compostos também pode influenciar negativamente na ação das enzimas. Ximenes *et al.* (2010), ao avaliar a produção de diferentes inibidores da fermentação, observou que a formação de compostos fenólicos, são os inibidores que mais afetam a atividade de β -glicosidade de *T. reesei* em comparação a de *Aspergillus niger*.

6. Hidrólise enzimática dos polímeros de açúcares

As rotas mais conhecidas de sacarificação são as que utilizam ácidos ou enzimas. Embora os processos com ácidos sejam eficientes e relativamente baratos, estes geram vários subprodutos inibidores da fermentação, devido à degradação parcial da glicose, xilose e lignina e seus derivados. Além disso, esse processo exige o uso de equipamentos construídos com materiais que resistam a corrosão e a elevadas temperaturas. Em contrapartida, quando comparado a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é realizada a temperaturas moderadas, sem a formação de subprodutos indesejados (Morone & Pandey, 2014).

Diversos fatores podem interferir na hidrólise enzimática, seja em relação ao substrato (cristalinidade, grau de polimerização, tamanho da partícula, porosidade, e outros) ou às enzimas (concentração, sinergismo, inibição por composto do meio ou pelo produto final):

1). *Área superficial e cristalinidade*: a recalcitrância da biomassa está associada à cristalinidade do material, ao grau de polimerização e a quantidade de lignina. O índice de cristalinidade refere-se à quantidade de celulose cristalina no sólido total. Com a remoção das hemiceluloses e da lignina após o pré-tratamento, há um aumento da área superficial e no tamanho dos poros do substrato, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando o acesso das enzimas (Maclellan, 2010; Yang *et al.*, 2011).

2). *Lignina e hemicelulose*: o teor de lignina é um dos principais fatores responsáveis pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica, dificultando a degradação do material por limitar o acesso das enzimas (Jeo *et al.*, 2007). As hemiceluloses serve como uma ponte entre a lignina e as fibras de celulose, conferindo mais rigidez ao material (Mussatto *et al.*, 2010).

Assim, visando aperfeiçoar este processo e aumentar a taxa de rendimento no processo de sacarificação, busca-se enzimas celulolíticas com maior tolerância as condições de aplicação na indústria, além de maior afinidade pelos substratos e tolerância aos inibidores. Neste contexto, tem sido sugerido para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, a utilização de uma mistura contendo celulasas de diferentes microrganismos, ou uma mistura de celulasas com diferentes enzimas como xilanases, ligninases e pectinases, na hidrólise dos materiais lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002).

O maior conhecimento sobre a hidrólise da celulose advém dos sistemas de enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei*, sendo considerado um “padrão industrial” (Merino & Cherry, 2007) tanto em relação a degradação da celulose quanto a processos de inibição por produtos. As principais enzimas secretadas por *T. reesei* incluem as endoglucanases EG I-V ou Celm7B; Cel 5A; Cel 12A; Cel 61A; Cel 45A, as celobiohidroases CBHI (Cel 7A) e CBH II (Cel 6A) (Reese *et al.*, 1950; Rosgaard *et al.*, 2007b; Shoemaker *et al.*, 1983). Apesar do sistema enzimático produzido por *T. reesei* ser eficiente na produção de endoglucanases e exoglucanases, a produção de β -glicosidase é pouco significativa. Baixa atividade de β -

glicosidase no meio de hidrólise resulta em acúmulo de celobiose no hidrolisado enzimático. Pelo fato da celobiose apresentar um efeito inibidor maior que a glicose, é necessária a adição das enzimas β -glicosidases, a fim de diminuir a concentração de celobiose no meio e o processo de inibição, aumentando os rendimentos de glicose a partir da sacarificação da celulose (Kumar *et al.*, 2008; Kolasa *et al.*, 2014).

Diante do exposto, buscou-se com esse trabalho conhecer os perfis de produção de enzimas lignocelulolíticas de espécies de *Trichoderma* isoladas de solo de canavial, além da avaliação comparativa do potencial de hidrólise da celulose e hemicelulose pelos preparados enzimáticos de bagaços da cana *in natura* e submetido a pré-tratamentos.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo geral produzir enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico usando espécies do fungo mesofílico *Trichoderma* previamente isoladas de solo de cultura de cana-de-açúcar (Egea *et al.*, 2014) e utilizá-las para sacarificar o bagaço de cana de açúcar antes e após tratamento com micro-ondas.

7.2. Objetivos específicos

1. Cultivar linhagens de *Trichoderma* por fermentação em estado sólido em diferentes condições físico químicas (fonte de nitrogênio, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação, eluente) visando selecionar as melhores cepas produtoras de CMCase, β -glicosidase, xilanase e lacase;
2. Identificar as espécies melhores produtoras das enzimas em questão;
3. Aplicar pré-tratamentos com micro-ondas associado a soluções de H_3PO_4 (0,05M), NaOH (0,01 M), glicerol (10%) e água (100%) visando a desestruturação das fibras;
4. Caracterizar quimicamente e morfologicamente (por meio de técnicas de microscopia eletrônica) o bagaço de cana tratado e não tratado para avaliar o efeito do tratamento sobre as fibras;
5. Hidrolisar enzimáticamente o bagaço utilizando as enzimas das espécies de *Trichoderma* obtidas por FES.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

1. INTRODUÇÃO

O elevado custo na produção das enzimas lignocelulolíticas é um dos principais obstáculos para a aplicação das mesmas em processos industriais. Vários dados da literatura indicam que as fontes de carbono usadas nas fermentações são fatores que afetam os custos e o rendimento na produção de enzimas. Para reduzir os custos de produção das celulases, hemicelulases e ligninases, tem sido sugerido o uso de substratos disponíveis e de baixo custo na fermentação (Gao *et al.*, 2008). Uma das maneiras de se conseguir isso é utilizando resíduos agrícolas e agro-industriais como substratos em fermentação em estado sólido (FES) (Dhillon *et al.*, 2011; Bansal *et al.*, 2012; Nara *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014). Esse processo é definido como fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas do substrato e na qual se emprega substratos sólidos (Pandey *et al.*, 2000 e 2002; Rodriguez Couto & Sanromán, 2005; Holker & Lenz, 2005). Os resíduos agrícolas, além de servirem como um substrato alternativo e de baixo custo, também podem ser uma solução para os problemas ambientais causados pela disposição aleatória desses materiais no ambiente (Rodriguez Couto & Sanromán, 2005). Dentre os resíduos agroindustriais a palha de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de mandioca, tem sido empregados com sucesso na produção de enzimas por FES (Ferrarezi *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Egea *et al.*, 2014).

O objetivo dessa etapa foi produzir enzimas lignocelulolíticas com espécies de *Trichoderma*, por FES, utilizando bagaço de cana e farelo de trigo como substratos. Buscou-se também, avaliar os efeitos de alguns fatores físico-químicos que poderiam interferir na produção e secreção dessas enzimas pelos fungos ao longo do processo fermentativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas utilizadas

A primeira etapa experimental foi realizada com as dez linhagens de *Trichoderma* sp., isoladas (Tabela 1), em trabalho prévio, a partir de amostras de solo de cana de açúcar antes e após a queima. O local de coleta das amostras está situado em José Bonifácio, São Paulo, Brasil (GPS: 21 ° 03'S; 49 ° 42'W). As cepas foram mantidas na coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Ibilce, UNESP, Campus de São José do Rio Preto. Os estoques foram armazenados em agar Saboroud, sob água e óleo mineral a temperatura ambiente e em 20% de glicerol a -80 °C.

Tabela 7. Linhagens de *Trichoderma* selecionadas para os ensaios de fermentação em estado sólido.

Linhagens	
<i>Trichoderma</i> sp.	F22
<i>Trichoderma</i> sp.	F28
<i>Trichoderma</i> sp.	F03
<i>Trichoderma</i> sp.	G03
<i>Trichoderma</i> sp.	G04
<i>Trichoderma</i> sp.	G15
<i>Trichoderma</i> sp.	G19
<i>Trichoderma</i> sp.	P14
<i>Trichoderma</i> sp.	P19
<i>Trichoderma</i> sp.	P20

2.2. Produção das enzimas e parâmetros avaliados

As dez espécies foram primeiramente avaliadas quanto ao potencial de produção de carboximetil celulase ou Endo- β -1,4-glucanase (CMCase), β -glicosidase, xilanase e lacase em substratos contendo diferentes fontes de nitrogênio com concentração de 1% (p/p): Ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 ou NH_4Cl . Os nutrientes KH_2PO_4 (3 g/g) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/g) também foram empregados.

2.3. Condições de fermentação e obtenção das soluções enzimáticas

Os fungos foram cultivados em 5g de substrato sólido composto por bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), com pH inicial igual a 5, acondicionado em embalagens de polipropileno (12x18), com aberturas de PVC, nas quais foram colocados tampões de algodão para as trocas gasosas. O material foi inoculado com suspensão de esporos obtidas de cultura de 4 dias em meio de cultura Sabouraud a 30°C, numa proporção equivalente a 10^7 esporos por grama de material sólido. O material inoculado foi incubado em BOD a 30°C, durante 10 dias. A cada 48h foi retirada uma embalagem com o material fermentado e a extração das enzimas foi realizada acrescentando-se 100 mL de água destilada ao mesmo, o qual foi homogeneizado e agitado por 30 min., em shaker, a 100 rpm e em seguida filtrado e centrifugado a 10000 x g, por 15 min, a 6°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4. Determinação das atividades enzimáticas

2.4.1. Endoglucanase – CMCase

A atividade de CMCase foi determinada quantificando-se o açúcar redutor liberado após a hidrólise do substrato, aplicando-se o método DNS (Miller, 1959). As misturas da reação continham 900 μL de tampão acetato (0,1 M, pH 5,0 - contendo carboximetilcelulose CMC -

4%) e 100 µL da solução enzimática bruta. A reação foi mantida a 40°C, por 10 min., quando então foi interrompida com 1,0 mL DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 min e em seguida foi acrescido 8 ml de água destilada e realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O teor de açúcar redutor foi calculado com base em curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto de reação nas condições do ensaio. Para representação gráfica, os valores foram expressos em U/g de substrato. O cálculo da atividade enzimática em U/ml foi obtido a partir da equação abaixo:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{absorbância} - \text{valor do coeficiente linear}}{\text{valor do coeficiente angular}} \div \text{tempo (min)} \div \text{volume enzima (ml)} \times \text{diluição}$$

O Cálculo da atividade em U/g foi obtido a partir da equação:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{absorbância} \times \text{volume de eluente (ml)}}{\text{quantidade (g) de substrato}}$$

2.4.2. *β*-glicosidase

A atividade de β-glucosidase foi determinada em mistura de reação constituída por 0,05 mL de 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (PNPG-4mM) ou 4-nitrofenol-β-D-xilopiranosídeo (PNPX-4mM) em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, respectivamente, como substratos incubado a 40°C por 10min. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de Na₂CO₃ 2 M e a leitura realizada em espectrofotômetro a 410 nm (Lacke, 1988; Leite *et al.*, 2008). Uma unidade da atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto de reação nas condições dos ensaios. Para representação gráfica, os valores foram expressos em U/g de substrato.

As cepas que apresentaram as maiores produções das enzimas foram selecionadas para a identificação em nível de espécie e utilizadas para os ensaios subsequentes. O cálculo da atividade enzimática em U/ml foi obtido a partir da equação abaixo:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{absorbância} - \text{valor do coeficiente linear}}{\text{valor do coeficiente angular}} \div \text{tempo (min)} \div \text{volume enzima (ml)} \times \text{diluição}$$

O Cálculo da atividade em U/g foi obtido a partir da equação:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{absorbância} \times \text{volume de eluente (ml)}}{\text{quantidade (g) de substrato}}$$

2.4.3. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pelo método de Miller (1959) sendo o procedimento idêntico ao da endoglucanase (2.4.1), exceto o substrato que foi substituído por xilana a 1% (Xylan Birchwood, Sigma) e utilizou-se curva padrão de xilose.

2.4.4. Lacase

A capacidade dos fungos de produção de enzimas ligninolíticas foi avaliada utilizando o protocolo para ensaios qualitativo descrito por D'Souza *et al.* (2006). Para tanto, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio B&K (10g/L de glicose, 2 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de Agar) suplementado com 4mM de guaiacol (3-metoxi-4-hidroxifenil) que foi o substrato para as enzimas. O guaiacol é oxidado na presença de H₂O₂ ao composto tetraguaiacoquinona de coloração marrom escura. A produção de coloração marrom intensa sob ou ao redor da colônia do fungo em meio contendo guaiacol indica a atividade de lacase.

Os ensaios para avaliação quantitativa da atividade de lacase foram realizados em mistura reacional composta por 2,2-azino-bis-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) como substrato, 0,1mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5); 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v); e, 0,1 mL de solução enzimática bruta (Buswell *et al*, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm, a 40°C, com um tempo de reação de 1min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (Bournonnais & Paice., 1988).

O Cálculo da atividade de lacase foi obtido a partir da equação:

$$\mu\text{mol.mim}^{-1}.\text{L}^{-1} = (\Delta\text{absorbância} / \epsilon) \div R \times T$$

ode: $\epsilon = 65.000 \text{ L}^{-1}\text{M}.\text{cm}^{-1}$; R = volume de enzima (ml); T= tempo de reação (min)

2.5. Identificação das espécies de *Trichoderma*

A identificação morfológica e molecular das cepas de *Trichoderma* foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada de Rio Preto e no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro - Instituto de Biociências, sob a supervisão do Dr. André Rodrigues.

As espécies foram avaliadas morfológicamente com o auxílio de uma chave taxonômica geral (Barron, 1968; Domsch *et al.*, 1980; Samson *et al.*, 2000) e com uma taxonomia específica para alguns grupos de fungos (Klich, 2002; Liu *et al.*, 2001; Nelson, 1983).

Para a identificação por técnicas moleculares as cepas foram repicadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL meio de aveia (2%) e mantidos por 10 dias a 30°C. Para a separação do micélio do meio de cultura, foram utilizadas peneiras de pequena trama que permitem filtragem, retendo o micélio e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri, em

temperatura ambiente por cerca de 12 horas. Posteriormente, o micélio seco foi macerado em nitrogênio líquido até a formação de um pó, do qual 0,1g foi transferido para tubos Eppendorf de 2 mL.

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo de Kuramae-Izioka (1997), com modificações, que permitiu a obtenção de DNA em maior quantidade e qualidade. Ao tubo de Eppendorf foram adicionados 800 μL de tampão de extração [Tris-HCl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0, EDTA 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 e SDS 0,5% (p/v)]. Após agitados, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 min., sendo agitados, vagarosamente a cada 10 min. Posteriormente, foram acrescentados 400 μL de acetato de potássio a 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, misturando-se a solução por inversão, a qual foi mantida em gelo por 30 min., invertendo-se os tubos a cada 10 min. Após as amostras terem sido centrifugadas a 15294 x g por 10 min., a 15°C, o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf, sendo acrescentados 700 μL de mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi homogeneizada por inversão durante dois minutos e centrifugada a 15294 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf, e novamente, tratado com mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sob as mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf, e acrescentou-se 15 μL de *RNAse* (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sendo mantidos em banho-maria a 37°C por 60 min. Posteriormente, foram acrescentados 1000 μL de etanol absoluto gelado e a solução, após ser misturada foi levada ao freezer -20°C *overnight*.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20min. A fase líquida foi descartada e o pellet foi lavado com 1000 μL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco a temperatura ambiente. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 100 μL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0; EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0) por 24 horas à 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada pela medida das

absorbâncias a 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience). As amostras com relação da absorbância 260/280 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para completar a verificação da qualidade do DNA. O gel foi observado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad). As amostras de DNA com qualidade adequada foram submetidas a PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) empregando-se os *primers* ITS4 (5'CCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') que amplificam zonas variáveis e intergênicas (ITS1 e ITS2) do gene 5.8S do DNAr (DNA ribossômico) (WHITE *et al.*, 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com volume final de 50 μL contendo 1U de *DNA Taq polimerase* (Fermentas), 0,1 μM de cada *primer*, 0,1mM de cada DNTP, 1x tampão de reação, 2mM MgCl_2 e 10-50ng de DNA genômico como “*template*”. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *GeneAmp 2400 PCR System*, sob ciclagem 94°C/3min; 35 ciclos (94°C/1min; 52°C/1min; 72°C/2min) e mantidos a 4°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

Os amplificados obtidos através da técnica de PCR foram seqüenciados para a região ITS-5,8S. Purificou-se os amplicons usando kit *GenElute PCR* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após purificação, os produtos de PCR passaram por sequenciamento com *primer* “*forward*” ITS5 e/ou o *primer* reverso ITS4 usando kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* em um seqüenciador ABI PRISM 377. As seqüências ITS1-5,8S-ITS2 obtidas foram alinhadas com programa *Biedit* (*Biological Sequence Alignment Editor*) e comparadas com as seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e também com CBS *Yeast Database* (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSSequences.aspx>). Seqüências com 98% de

similaridade nucleotídica ou superior com a região ITS-5,8S DNAr foram consideradas a mesma espécie, sempre contando com a confirmação através de análises morfológicas.

2.6. Avaliação dos parâmetros fermentativos sobre a produção das enzimas.

Após a identificação das cepas, foram realizados experimentos delineados em blocos, cujos fatores testados foram: volume de eluente usado para extração das enzimas do material fermentado, sendo adicionado para cada 1g de material fermentado 20, 40 ou 60ml de água destilada (1:4 1:8 e 1:12 p/v), temperatura de incubação (28°C, 30°C, 37°C ou 40°C), pH (5, 6, 7), concentração da fonte de nitrogênio (Uréia a 0,3%, 0,5% ou 0,7%), tempo de incubação (48h, 120h e 192h) e tipo de substrato (bagaço de cana e farelo de trigo ou palha de cana e farelo de trigo) na proporção 1:1.

A análise estatística dos dados foi aplicada para avaliar as diferenças na produção das enzimas de *Trichoderma*, levando em consideração os parâmetros apresentados anteriormente e também o efeito dos pré-tratamentos na composição do bagaço e na quantidade de açúcares redutores e compostos fenólicos liberados após o tratamento.

Inicialmente foi testada a normalidade dos dados por meio do teste de Lilliefors (Conover, 1971). Os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram log-transformados e novamente verificados quanto à normalidade de sua distribuição. Em seguida foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para testar a homogeneidade das variâncias segundo o teste de Bartlett (Sokal & Rohlf, 1969). Quando a distribuição foi homogênea, aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA – um fator), seguida pelo teste *post-hoc* de Fisher LSD para verificar as possíveis diferenças entre as médias dos casos analisados. Nas situações em que as variâncias foram heterogêneas utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) para comparar diferenças entre as produções enzimáticas de cada espécie de *Trichoderma* e entre os pré-tratamentos (Zar, 1999) Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA, versão 7.0 (StatSoft, 2001).

2.7. Caracterização das enzimas

Após os ensaios dos efeitos das condições de cultivo, as enzimas obtidas em maiores proporções, foram caracterizadas pela verificação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas. O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em tampão acetato de sódio (pH 4,5 a 6,0), sendo dosada a atividade a 40°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 60°C em pH5, e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo.

Para a determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH quando em ausência de substrato a solução bruta da enzima foi mantida por 24 horas, em temperaturas de 40 a 60°C. Após esse período, foram tomadas alíquotas para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos. A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando a enzima em tampão acetato de sódio 0,1M (1:1) com pH variando de 4,5 a 6,0, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade da enzima. (Apêndice 1).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da produção das enzimas e seleção das melhores cepas produtoras

3.1.1. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido sob diferentes condições nutricionais

A Figura 7 representa os perfis de produção das enzimas das 10 linhagens de *Trichoderma* sp. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as fontes de

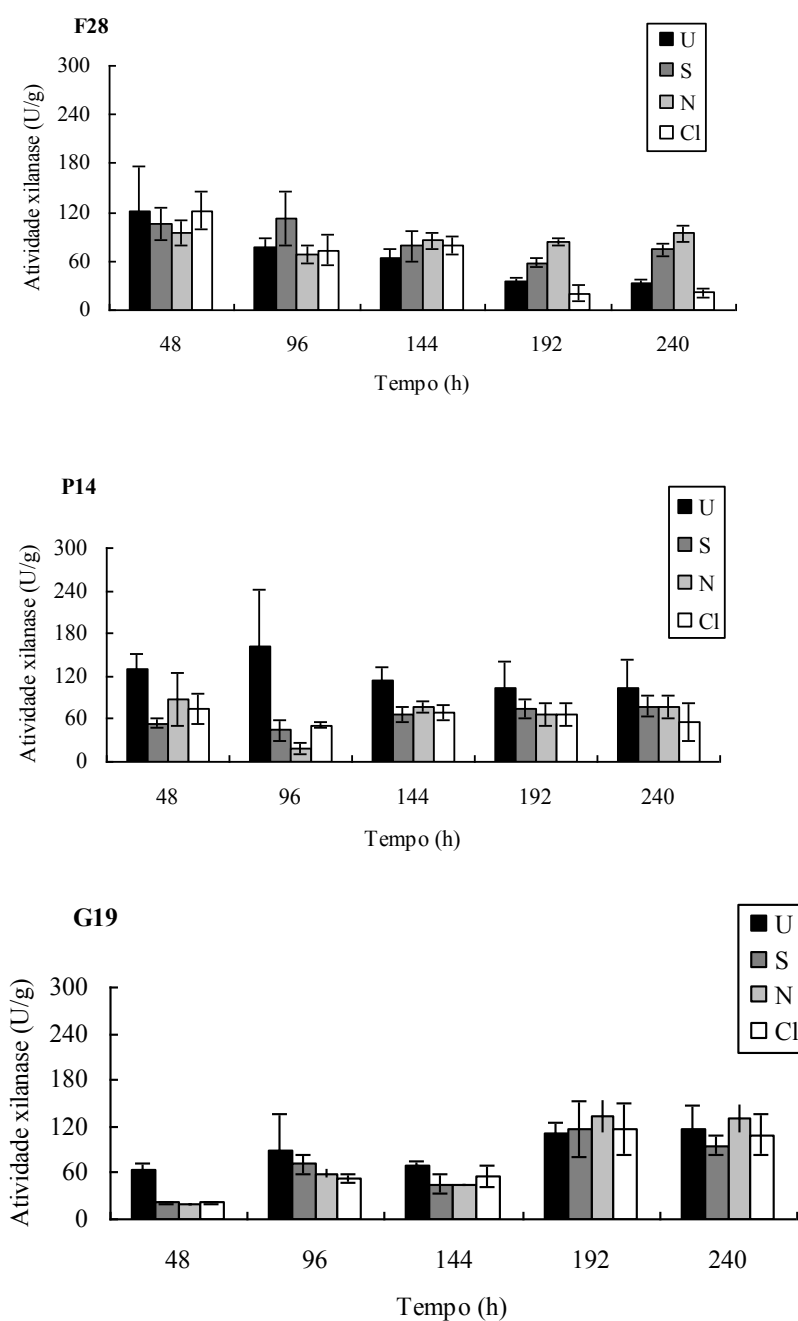
nitrogênio utilizadas e os períodos de fermentação referentes aos picos de produção das enzimas (tempo de fermentação).

A Ureia foi a melhor fonte de nitrogênio para produção de xilanase pelas cepas de *Trichoderma* F22, F28, P14, P20 e G03 com atividades médias máximas de 149 ± 10 U/g (144h), 122 ± 54 U/g (48h), 161 ± 81 U/g (96h), 87 ± 10 U/g (48h) e 178 ± 2 U/g (144h), respectivamente, os quais diferiram significativamente dos valores mínimos registrados com o cloreto de amônia para F22 (34 ± 1 U/g) em 96h ($H=55$; $p<0,05$) e F28 (21 ± 9 U/g) em 192h (Anova, $F=22$; $p<0,05$); com o nitrato de amônia para P14 (19 ± 7 U/g) em 96h ($F=6$, $p<0,05$) e P20 (26 ± 14 U/g) em 240h (Anova, $F=5$, $p<0,05$) e com o sulfato de amônia para G03 (37 ± 2 U/g) em 144h ($H=50$, $p<0,05$).

Para as cepas G04, G15 e P19, os valores médios máximos (116 ± 9 U/g; 243 ± 100 U/g e 130 ± 14 U/g) foram registrados com o cloreto de amônia em 48h (Anova, $F=19$, $p<0,05$), 240h ($F=6$, $p<0,05$) e 192 h ($H=46$, $p<0,05$), respectivamente. O valor mínimo de produção foi de 6 ± 2 U/g (240 h) para G04 e 14 ± 5 U/g (192 h) para G15 com a ureia e 8 ± 1 U/g (48 h) para P19 com o sulfato de amônia.

Os picos de produção de G19 (133 ± 22 U/g) e F03 (108 ± 9 U/g) foram obtidos no cultivo contendo nitrato de amônia em 192h de fermentação sólida para ambos os casos. Valores significativamente inferiores foram registrados com o nitrato de amônia como fonte nutricional para G19 (19 ± 4 U/g) em 48h (Anova, $F=13$, $p<0,05$) e com a ureia para F03 (12 ± 3 U/g) em 240h ($H=51$, $p<0,05$).

Figura 22. Produção de xilanase pelas cepas de *Trichoderma* em FES, tendo como fontes de nitrogênio: Uréia (U); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S); NH_4NO_3 (N) ou NH_4Cl (Cl). As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) a 28°C. O experimento foi realizado em triplicado ($\pm$ desvio padrão).



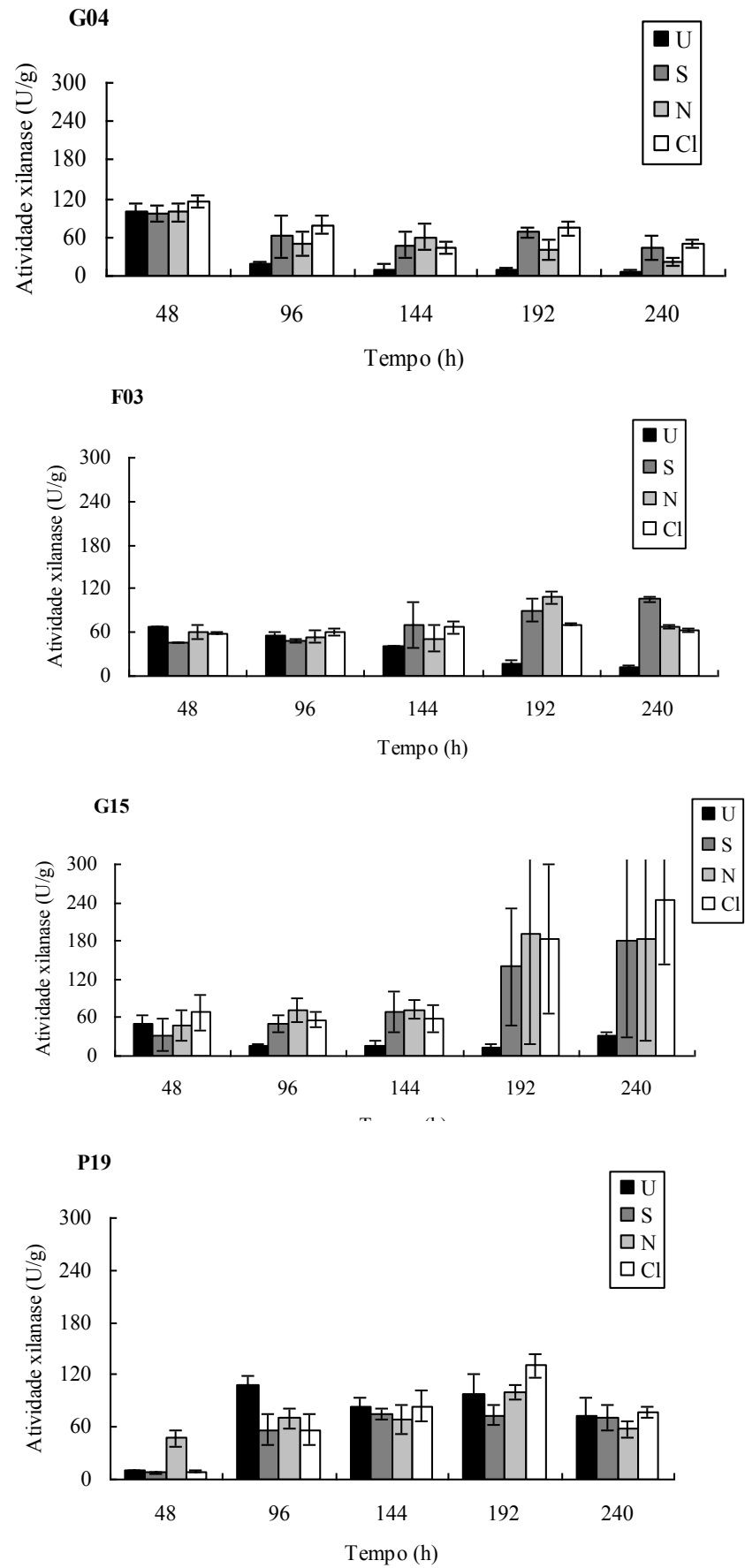
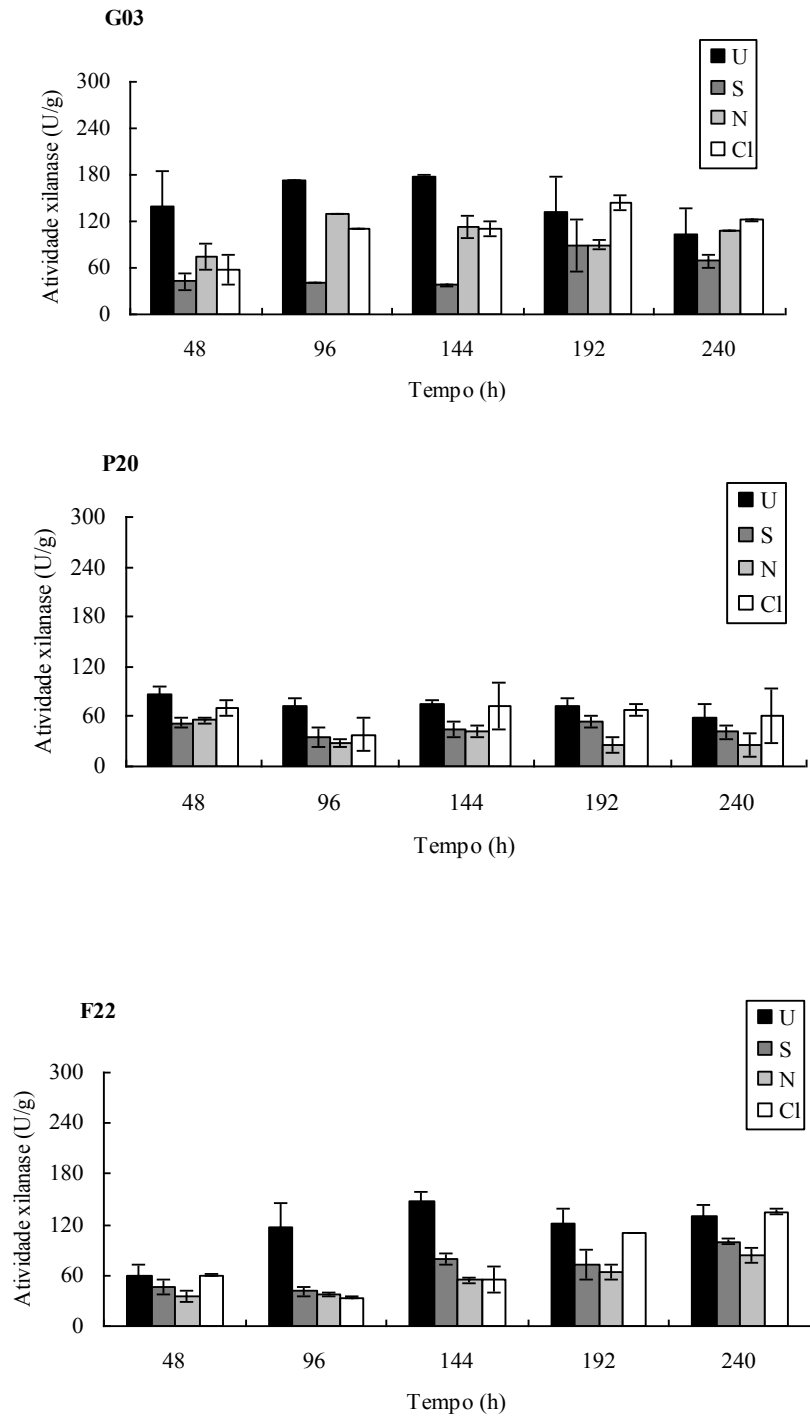


Figura 7:
continuação



Na produção de endoglucanase (figura 8), o fungo *Trichoderma* F03, apresentou produção da enzima significativamente maior em meio adicionado de nitrato de amônia em 144h (49 ± 6 U/g) de fermentação comparado com aquela com ureia (9 ± 1 U/g) no mesmo período de cultivo (ANOVA, $F=18$; $p<0,05$). Para G03 (32 ± 7 U/g), P19 (65 ± 9 U/g), P20 (37 ± 9 U/g) e G15 (42 ± 9 U/g), a melhor fonte de nitrogênio foi o cloreto de amônia, em 240h ($H=43$, $p<0,05$), 192h ($F=9$; $p<0,05$), 144h ($F=4$; $p<0,05$) e 192h ($F=5$; $p<0,05$), respectivamente, enquanto que a ureia foi significativamente menos eficiente como fonte de nitrogênio para produção da celulase em 96h (11 ± 5 U/g), 144h (11 ± 2 U/g), 240h (9 ± 3 U/g) e 192h (10 ± 2 U/g), respectivamente. Atividades médias máximas também foram obtidas com o sulfato de amônio no cultivo das cepas G04 (49 ± 13 U/g), G19 (49 ± 9 U/g) e P14 (43 ± 24 U/g) com um tempo de incubação de 48h ($F=5$; $p<0,05$), 144h ($F=5$; $p<0,05$) e 192h ($F=5$; $p<0,05$), respectivamente. Os valores mínimos de atividade foram observados com o nitrato de amônia para G04 (11 ± 5 U/g) em 240h e com a ureia para G15 em 144h (8 ± 2 U/g), G19 em 240h (7 ± 4 U/g), P14 em 96h (15 ± 2 U/g) e F22 (54 ± 1 U/g) em 240h ($F=18$; $p<0,05$).

Apenas para a cepa F28, a ureia foi a melhor fonte de nitrogênio com valor médio máximo de 42 ± 6 U/g (240h) e mínimo de 12 ± 2 U/g (48h) com o nitrato de amônia ($H=43$; $p<0,05$).

Figura 23. Produção de CMCase das cepas de *Trichoderma* em FES, em substratos tendo como fontes de nitrogênio ureia (U); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S); NH_4NO_3 (N) ou NH_4Cl (Cl). As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) a 28°C. O experimento foi realizado em triplicado ($\pm$ desvio padrão).

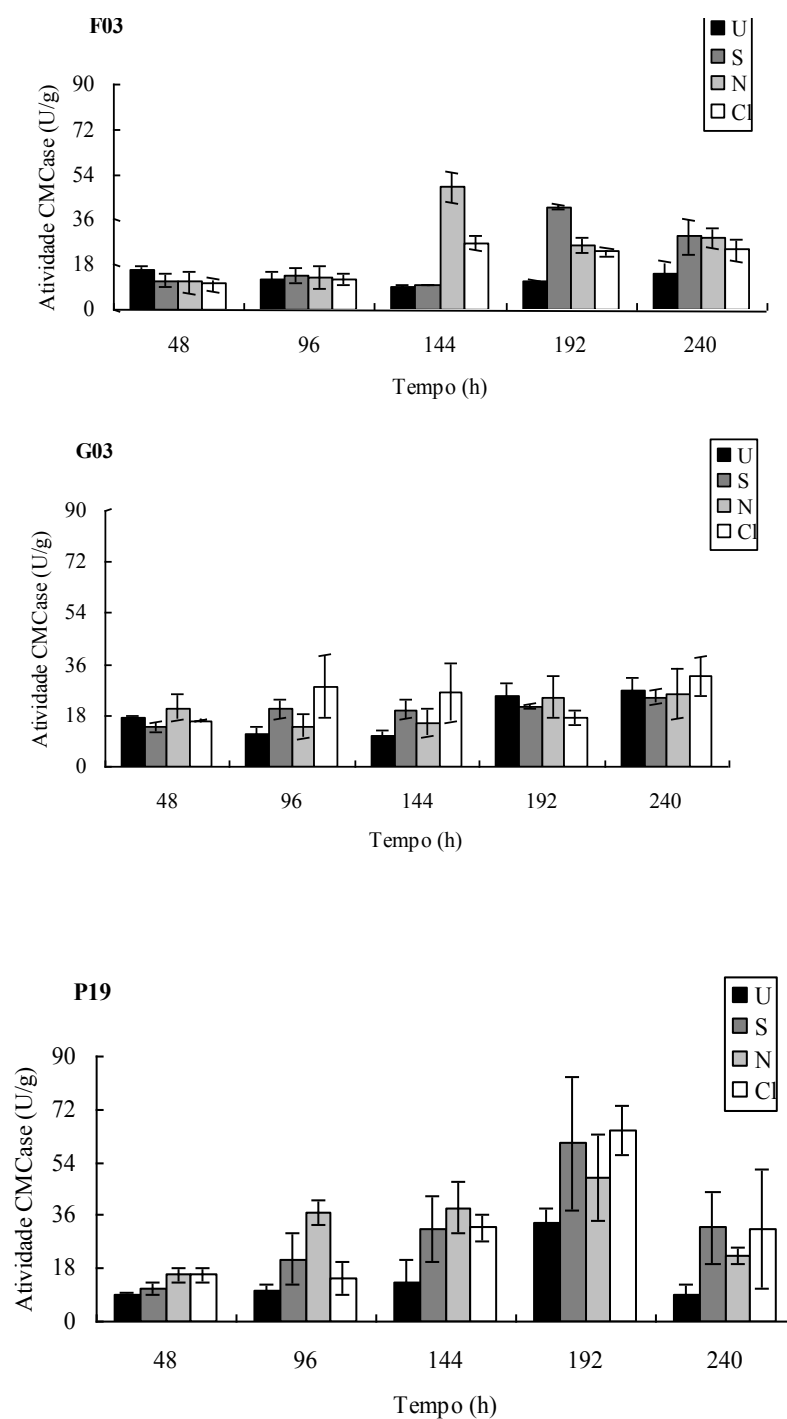


Figura 8: continuação

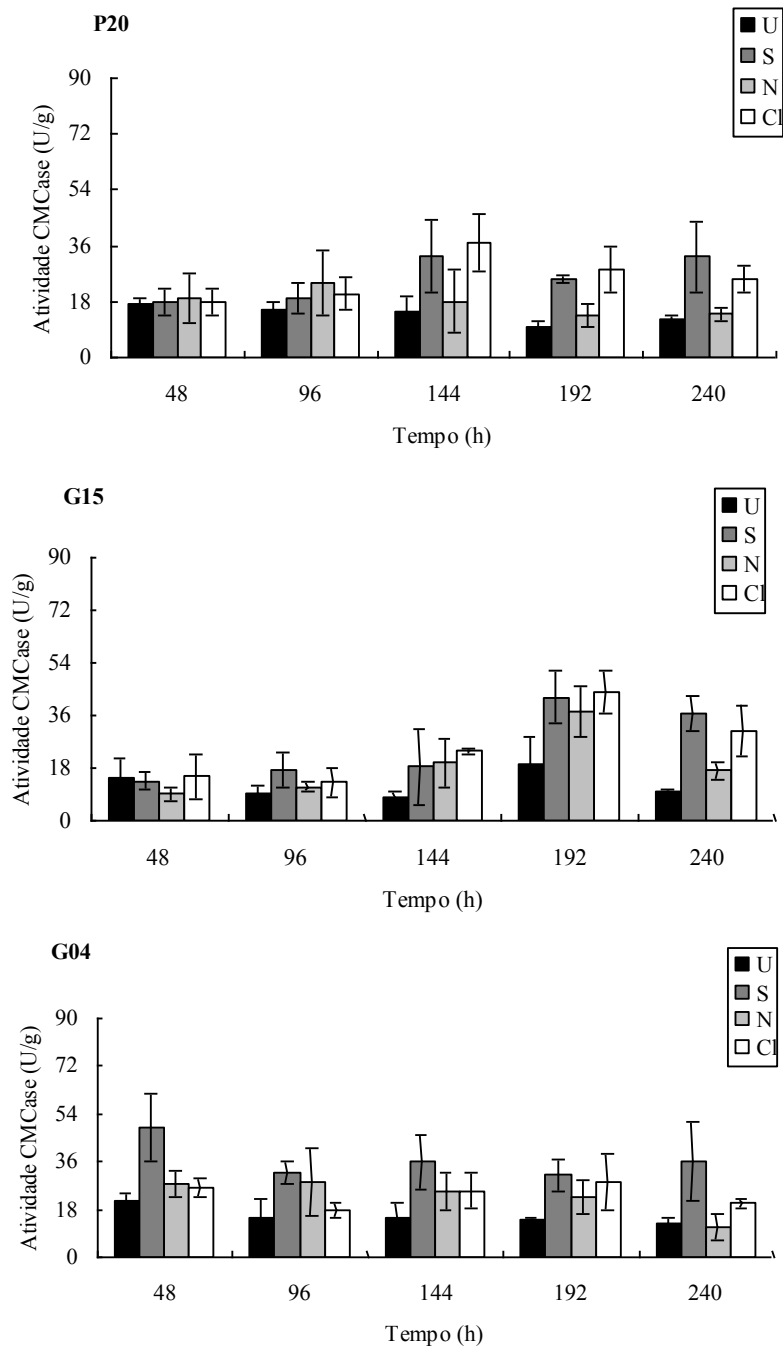
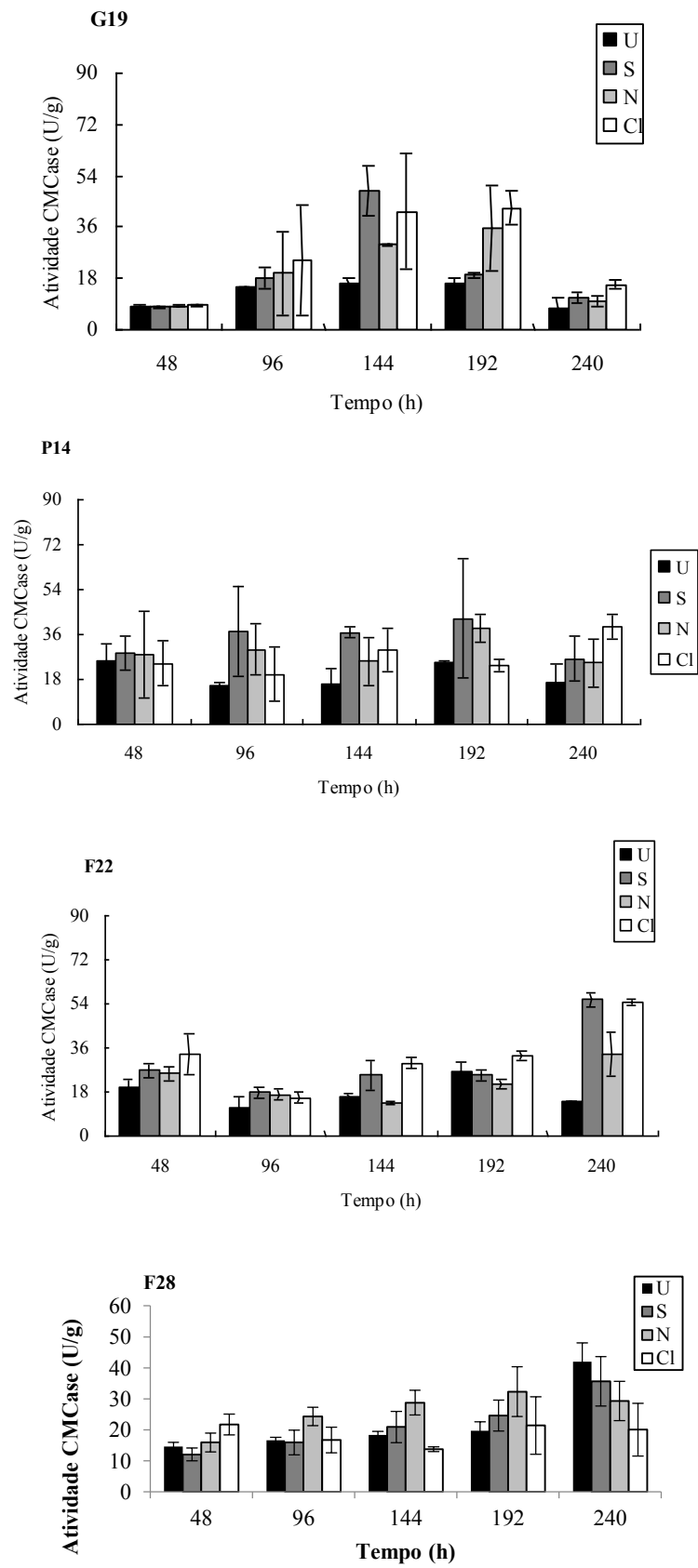


Figura 8: continuação



A partir do método usado para determinação das atividades enzimáticas não foi possível detectar a atividade de β -glicosidase no meio de cultivo de nenhuma das dez cepas de *Trichoderma*, assim como a produção de lacase.

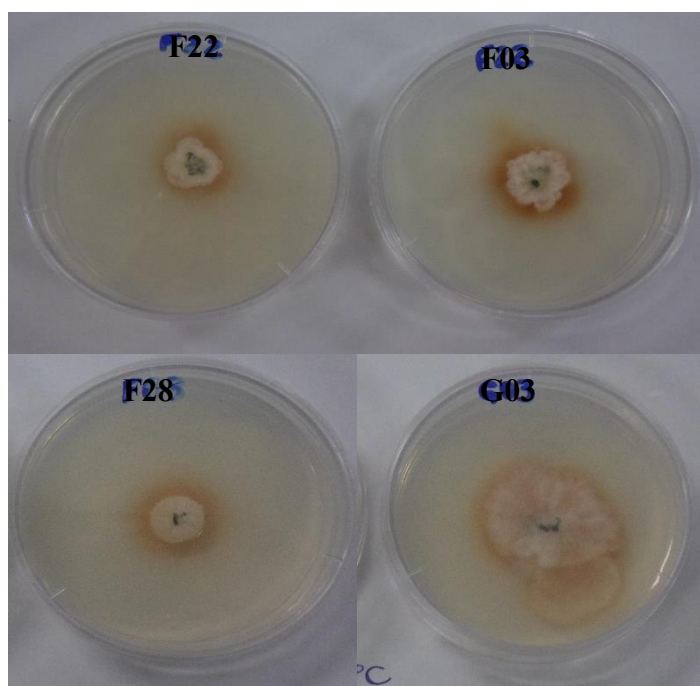
Entretanto, em avaliação qualitativa de lacase pelo método do guaiacol foi observada reação positiva nas adjacências das colônias das espécies, *T. asperelloides*, *T. harzianum*, *T. virens* e *Trichoderma* sp., como pode ser visto na Figura 9.

Todas as espécies identificadas e a cepa *Trichoderma* sp. G03 foram selecionadas para avaliar o perfil de produção, com base nos dados de lacase e das demais enzimas produzidas.

Compostos aromáticos oriundos da degradação de lignina podem ser usados como substratos para produção das enzimas lignolíticas (Kapich *et al.*, 2004; Pointing *et al.*, 2000). Sendo assim, os ensaios realizados para verificar a produção de lacase pelas cepas de *Trichoderma* apresentaram resultado positivo para três das quatro cepas testadas. Segundo Martínez *et al* (2009), os microrganismos ascomicetos, diferentemente do grupo basidiomicetos apresentam baixo potencial na produção de enzimas envolvidas na degradação da lignina. Entretanto, apesar do teste não ter sido quantitativo, foi possível observar que as espécies apresentam perfil de produção da enzima em questão.

A partir dos resultados obtidos, nas condições de cultivo avaliadas, os melhores resultados na produção de xilanase foram obtidos com a fonte de nitrogênio ureia. Já na produção de endoglucanase, três fontes apresentaram resultados satisfatórios sendo elas nitrato de amônio, sulfato de amônio e ureia. Por apresentar bons resultados na obtenção de ambas enzimas e sendo melhor na produção de xilanase, a ureia, foi a fonte de nitrogênio escolhida para dar continuidade nos demais experimentos.

Figura 24. Teste qualitativo de atividade de lacase nos meios de cultivo de *T. asperelloides* (F22), *T. harzianum* (F03), *Trichoderma virens* (F28) e *Trichoderma sp.* (G03) com as placas foram incubadas a 28°C durante 72 horas.



3.2 Identificação das espécies de *Trichoderma*

A partir dos melhores resultados obtidos quanto a produção das enzimas lignocelulósicas e o resultado positivo na produção de lacase, quatro cepas foram selecionadas para identificação morfológica e molecular. As espécies foram avaliadas por técnicas morfológicas sendo possível apenas a confirmação do gênero *Trichoderma*. A identificação em nível de espécies requereu a aplicação de técnicas moleculares. A região do genoma utilizada foram: ITS: *internal transcribed spacer*; TEF: fator de elongação alfa. A base de dados TrichoKey foi utilizada para a comparação. Os nomes atuais das espécies foram seguidos de acordo com o *Index Fungorum*.

As espécies identificadas são apresentadas na Tabela 2. *T. harzianum* é um complexo de espécies críticas, ou seja, compreende várias espécies morfológicamente semelhantes, porém apresentam variabilidade genética. O marcador ITS não é suficiente para separar as espécies

dentro desse complexo, sendo necessário sequenciar outro marcador molecular (TEF) para obter melhor caracterização taxonômica.

Tabela 8. Resultados da identificação molecular e filogenética.

Código do isolado	Identificação Morfológica	Identificação estabelecida no estudo	Região Sequenciada
F03	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i> species complex	ITS
F28	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma virens</i>	ITS
F22	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma asperelloides</i>	TEF

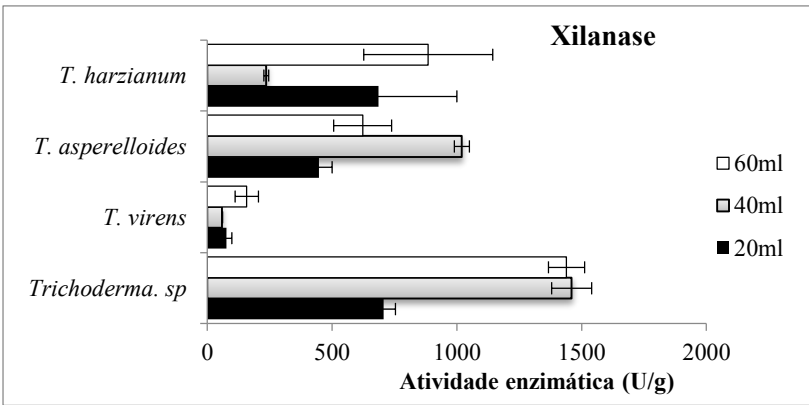
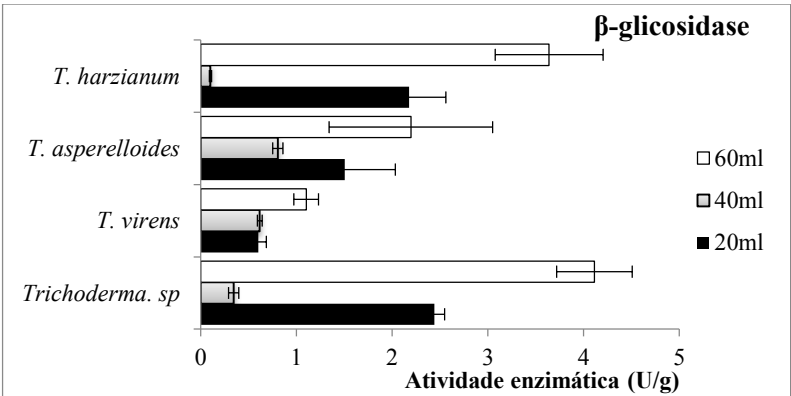
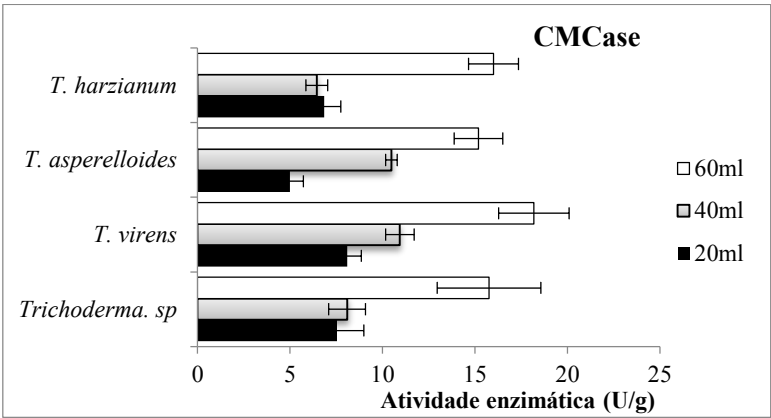
3.3. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido sob diferentes condições físico-químicas.

3.3.1. Avaliação da quantidade de eluente durante a extração das enzimas

Primeiramente, foi avaliada a quantidade de eluente na extração das enzimas. De acordo com a Figura 10 a melhor proporção de água/material para extração das enzimas do substrato fermentado foi de 60 mL. Os demais volumes assim como o volume de 100mL avaliado nos experimentos iniciais, diminuem a concentração enzimática no volume final. Possivelmente, com uma menor quantidade de eluente não é possível recuperar todas as enzimas durante o processo de extração, sendo que, com volumes superiores a 60mL as mesmas estejam muito diluídas, sendo difícil sua recuperação. Sendo assim a proporção essa proporção água: material fermentado (1:12) foi utilizada nos experimentos que se seguiram.

Figura 25. Extração das enzimas lignocelulósicas por diferentes volumes de eluente (água destilada) das espécies de *Trichoderma* (a) *Trichoderma asperelloides*, (b) *T.virens*, (c) *T.*

harzianum e (d) *T. sp.* As enzimas foram obtidas por cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e ureia a 28°C.

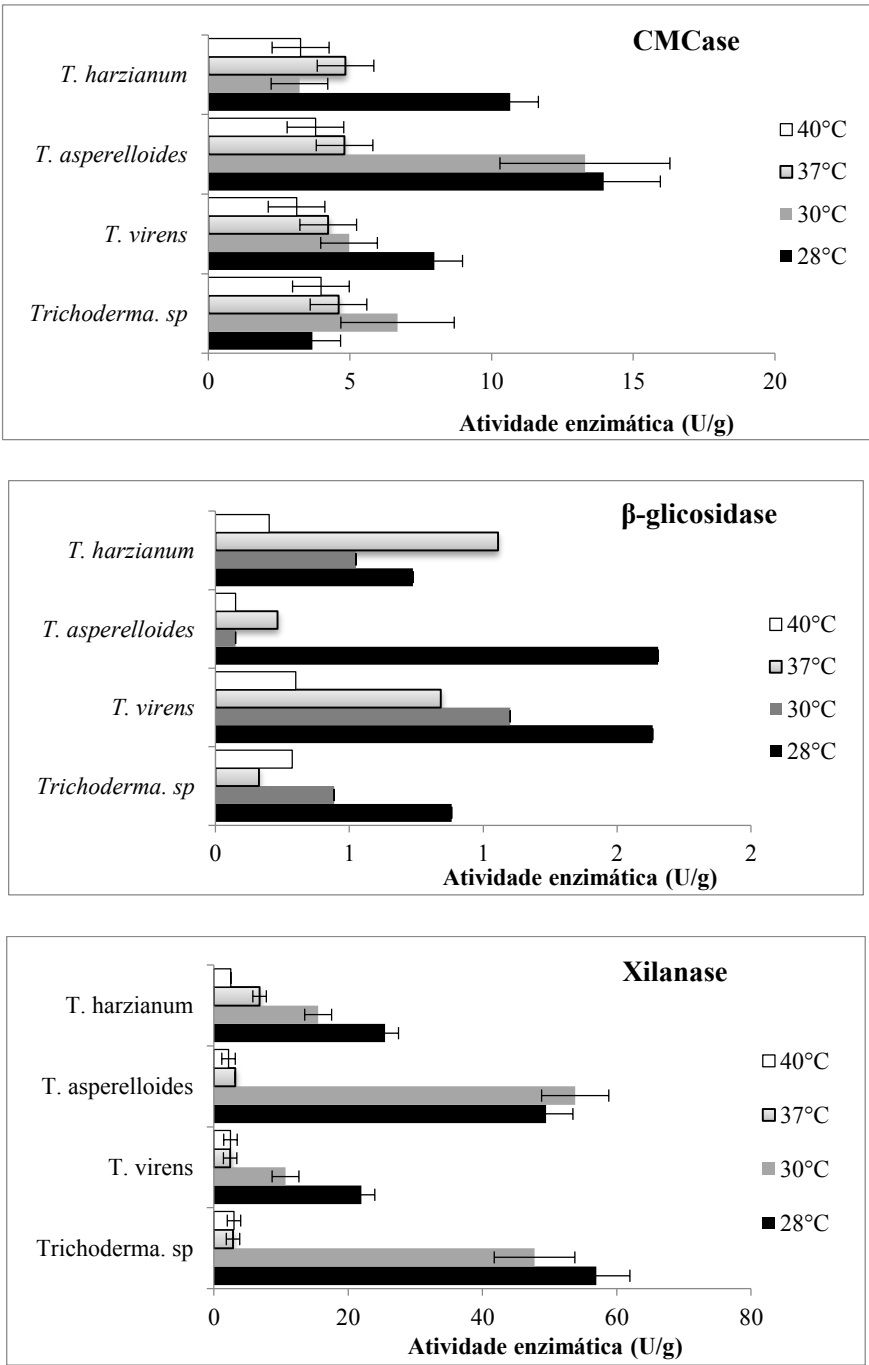


3.3.2. Avaliação da temperatura de incubação

O efeito da temperatura de incubação sobre a produção das enzimas pelas cepas de *Trichoderma* cultivadas por fermentação em estado sólido está representado na Figura 11. Com exceção dos resultados obtidos para *Trichoderma* sp. (espécie não identificada pelo método molecular), os valores mais elevados na produção de CMCase, xilanase e β -glicosidase foram registrados em temperatura de 28°C, embora para a enzima xilanase não tenha havido diferenças significativas entre as produção a 28°C e 30°C. Esses resultados são consistentes com os perfis mesolíticos das espécies em questão.

Estudos com as espécies *T. viride* (Goyal *et al.*, 2008) *T. reesei* (Maurya *et al.*, 2012) e *T. harzianum* (Rubeena *et al.*, 2013), com faixas de temperatura variando entre 20°C a 47°C, evidenciaram os melhores resultados na produção de CMCase e xilanase entre 25°C a 30°C. O mesmo perfil foi observado por Pandey *et al* (2014) ao avaliarem a produção de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase por *T. harzianum* em faixas de temperatura entre 24°C a 34°C, obtendo produção máxima de todas as enzimas a 28°C.

Figura 26. Perfil de produção enzimática em FES, em diferentes temperaturas de incubação.



3.3.3. Efeito do pH sobre a produção das enzimas

Os efeitos dos pH iniciais dos meios de cultivo foram avaliados a 28°C visto que esta foi a melhor temperatura para a produção das enzimas temperatura de incubação na produção das enzimas.

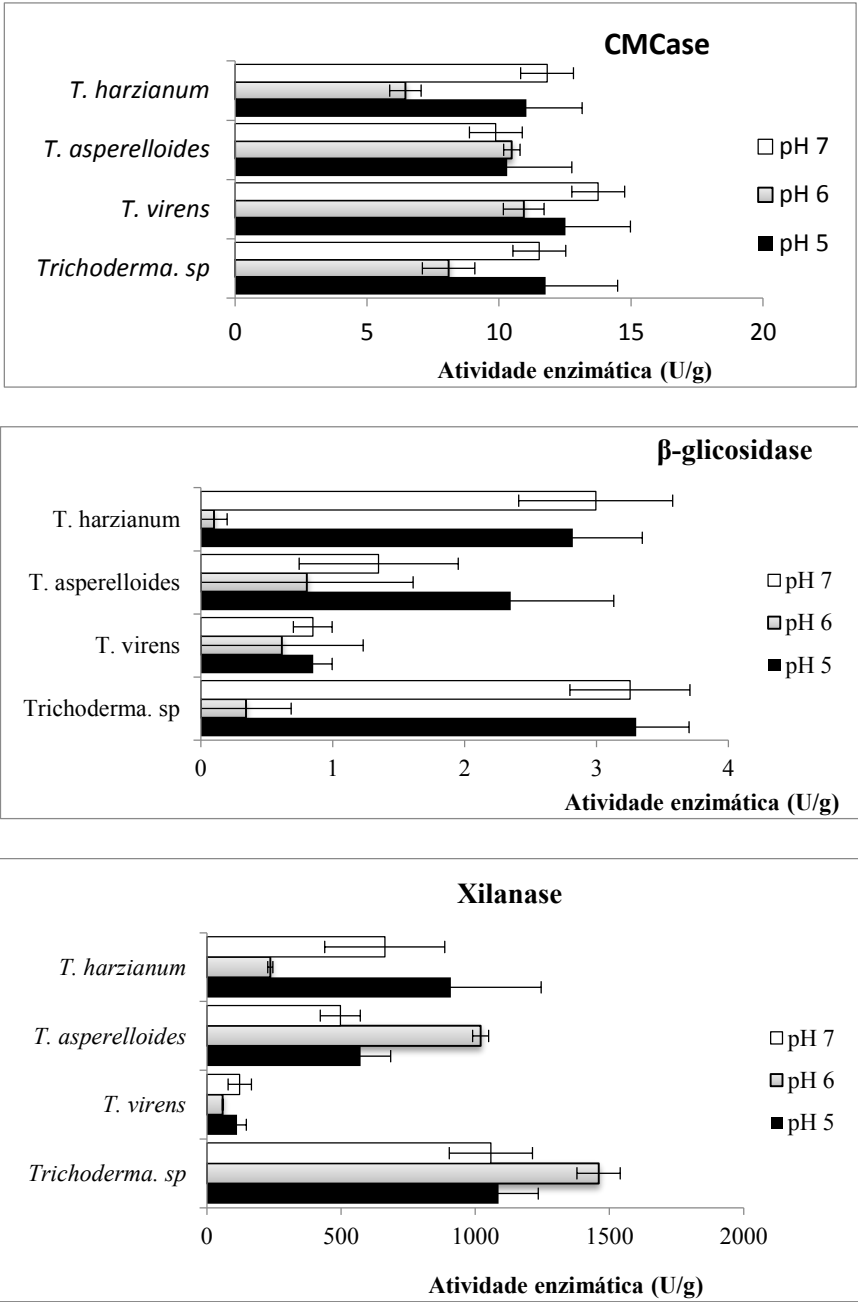
Na Figura 12 estão apresentados os resultados da influência do pH sobre a produção de CMCase, β -glicosidase e xilanase. Para a produção de CMCase não houve diferença entre os valores de pH avaliados, sendo que a maior produção de enzima produzida foi registrada em pH 7 com o cultivo de *T. virens*.

Na produção de β -glicosidase os melhores resultados também foram registrados em pH 7 (3, 4U/g) a partir do cultivo com *Trichoderma* sp.

Na produção de xilanase, os valores mais elevados foram observados no cultivo de *Trichoderma* sp. em pH 6 (1400 U/g).

No presente trabalho, os melhores resultados obtidos em pH 6 e 7, contrariam o reportado na literatura, de que a produção é 2000 U/ml (xilanase) por 3 U/ml (CMCase) com valores de pH entre 4 e 5. Segundo Maurya *et al.*, 2012 e Rubeena *et al.*, 2013, os melhores resultados na produção de celulase obtidos a partir do cultivo de *T. reesei* e *T. harzianum* foram com pH 5 e 4, respectivamente, variando a faixa de pH entre pH 1-8. Na produção de xilanase a partir do cultivo de *T. reesei* e *T. viride*, Goyal *et al.* (2008), obtiveram melhor produção em pH 4 para ambas as espécies.

Figura 27. Perfil de produção enzimática em FES, em diferentes valores de pH.



3.3.4. Efeito da fonte de nitrogênio (Ureia %) na produção enzimática

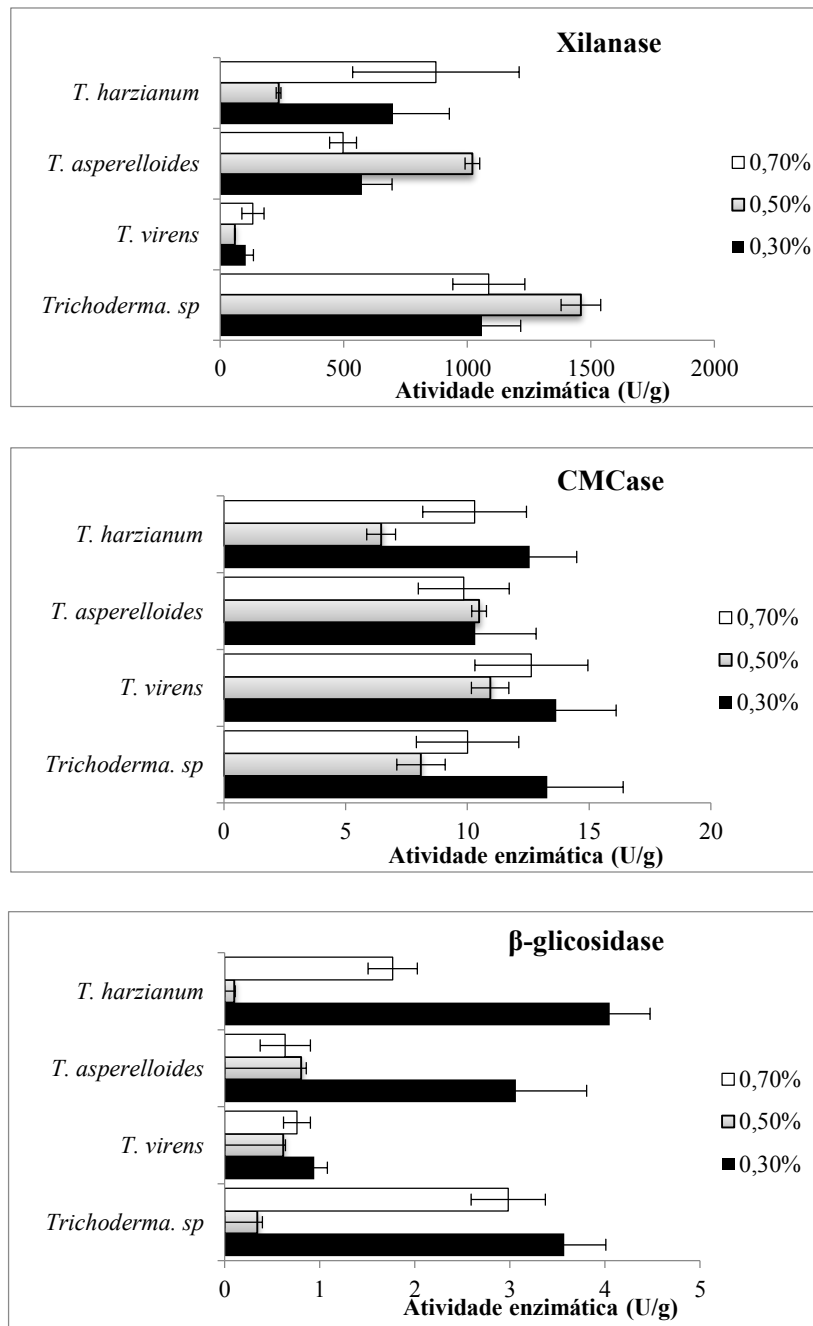
Considerando que a ureia foi a fonte de nitrogênio selecionada nos experimentos iniciais, para a produção das enzimas pelos fungos, esse composto foi utilizado em novos experimentos visando determinar a faixa de concentração mais indicada para a suplementação dos substratos com ureia. Nesses ensaios, o pH inicial dos meios foi 7 para CMC e β -glicosidase e 6 para xilanase e a temperatura de incubação de 28°C.

As maiores produções de xilanase foram obtidas com 0,5% de ureia pelo cultivo de *Trichoderma sp.* (1.460 U/g) e *Trichoderma asperelloides* (1020 U/g) e com 0,7% por *T. virens* (132 U/g) e *T. harzianum* (873), como pode ser visto na Figura 13.

Os picos de produção de CMCase assim como de β -glicosidase foram registrados com 0,3% ureia para maioria das espécies, entretanto, quando comparado aos valores de xilanase, a produção das duas enzimas foi baixa sendo o valor máximo (13 U/g) e mínimo (4 U/g) produzidos por *T. virens* e *T. harzianum*, respectivamente. Menores valores na produção de endoglucanases em comparação a xilanases são observados por outros autores. Kalogeris *et al.* (2003) obtiveram menor rendimento na produção de CMCase utilizando ureia durante o cultivo de *T. aurantiacus*. Enquanto que, Narasimha *et al.*, 2006 obtiveram 1 U/ml na produção de β -glicosidase (1 U/mL) quando suplementaram o substrato de cultivo de *A. niger* com ureia. Soni *et al.* (2008) obtiveram produção de xilanase de 1280 U/mL ao cultivar *T. viride*. A fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo pode afetar o pH desse meio durante a fermentação e influenciar na atividade enzimática.

A utilização de fontes orgânicas de nitrogênio, como a ureia, tem resultado em maior produção de enzimas como xilanase por fungos *Aspergillus awamori* do que com fontes inorgânicas (Lemos *et al.*, 2001; Bakri *et al.*, 2003).

Figura 28. Produção enzimática em FES, em diferentes concentrações de ureia como fonte de nitrogênio.



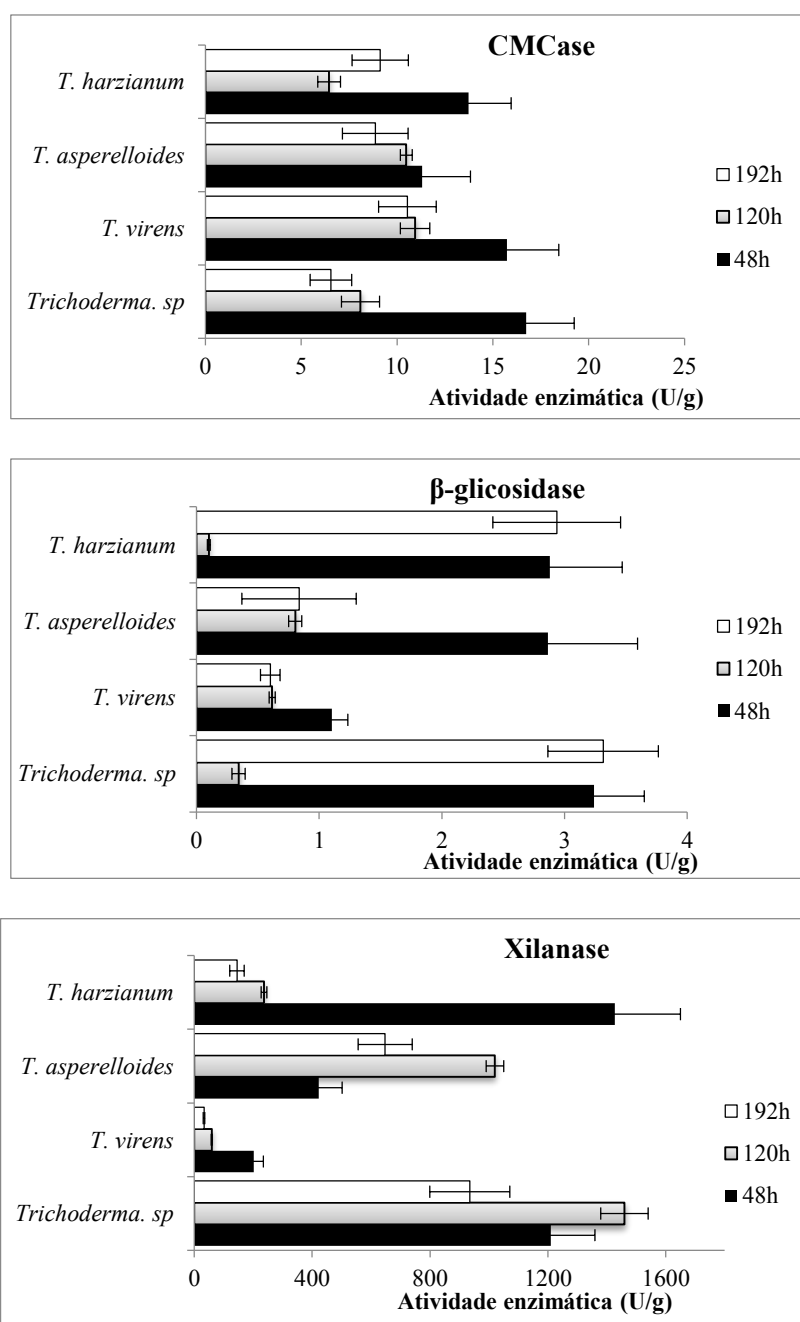
3.3.5. Produção das enzimas pelas espécies de *Trichoderma* ao longo do processo de fermentação em estado sólido.

A produção máxima de CMCase foi obtida após 48 horas de fermentação de todas as espécies cultivadas, com valores mínimos de 11 U/g (*Trichoderma asperelloides*) e máximo de 17 U/g (*Trichoderma* sp.) (Figura 14). A produção de β -glicosidase foi maior nas primeiras 48h para os fungos *T.virens* (1 U/g) e *T. asperelloides* (2,8 U/g) e após 192 h para *Trichoderma* sp (3,2 U/g) e *T. harzianum* (2,8 U/g). Para produção de xilanase, os melhores resultados foram registrados com 48 horas (*T. virens* -202 U/g e *T. harzianum*- 1300 U/g) e 120 horas (*Trichoderma* sp. – 1400 U/g e *T. asperelloides*- 1000 U/g).

A produção enzimática por diferentes espécies de *Trichoderma* em um período de incubação de 28 a 192 horas também foi reportada pelos autores, Sakthiselvan *et al.* (2012) (*T. harzianum* MTCC 4358) e Soliman *et al.* (2012) (*T. viride*) que obtiveram melhores resultados a partir das primeiras horas de fermentação (48h) até no máximo de 96 horas. Após esse período houve declínio da atividade enzimática.

O tempo de incubação está relacionado a fatores como a natureza do substrato, o tipo de microrganismo e as condições de fermentação (Soliman *et al.*, 2012). Sater *et al.* (2011) e Simoes *et al.* (2009) ao avaliarem a produção de xilanase pelas espécies *T. harzianum* e *T. viridae*, respectivamente, observaram que o melhor tempo de incubação na produção da enzima foi de 8 dias (*T. harzianum*) e de 6 dias (*T. viridae*) de fermentação. No trabalho de Pandey *et al.* (2014) o máximo de produção de celulasas foi observado em 120 horas, com queda na produção após esse período. Ao longo do tempo, o declínio na produção pode ocorrer pelo esgotamento de macro e micronutrientes presentes no meio ocasionando estresse ao fungo e inativando a produção de enzimas (Pandey *et al.*, 2014). Em função disso, apesar do tempo de incubação acima de 48 horas ter apresentado bons resultados na produção de xilanase, a produção das demais enzimas em um tempo menor foi satisfatório, sendo portando o tempo de 48h recomendável para produção enzimática das espécies de *Trichoderma* cultivadas.

Figura 29. Produção das enzimas pelas espécies de *Trichoderma* em FES, por 48h, 120h e 192h.



3.3.6. Avaliação do tipo de substrato na produção das enzimas

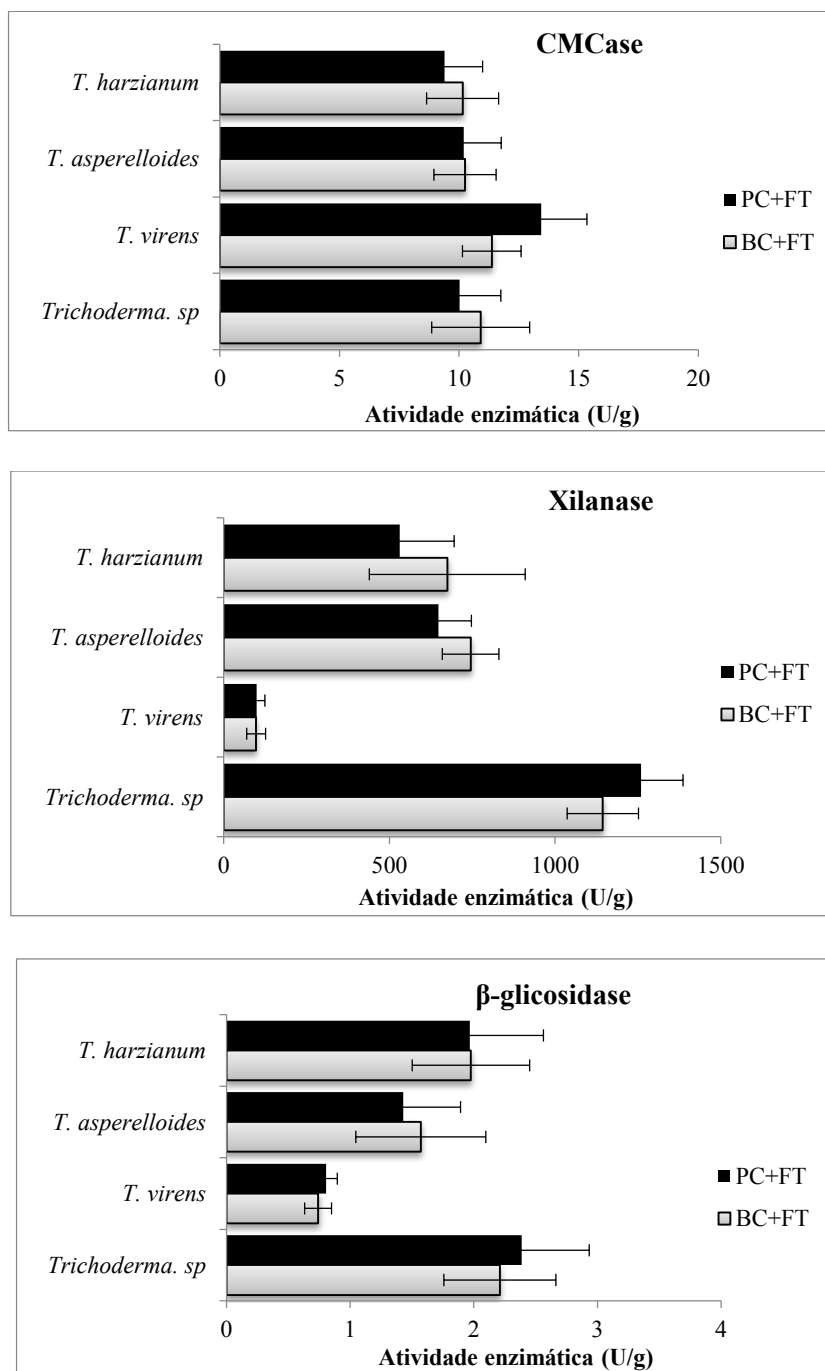
Os resultados na produção enzimática não apresentaram diferença significativa quanto aos dois tipos de substrato utilizados (bagaço de cana e farelo de trigo e palha de cana e farelo de trigo), sendo as atividades enzimáticas obtidas em meios com bagaço e farelo (BC+FT) um

pouco maiores que aqueles obtidos em palha de cana e farelo de trigo (PC+FT) para as quatro cepas de *Trichoderma* (Figura 15). A produção de xilanase utilizando bagaço de cana e farelo de trigo por *Trichoderma cf. asperelloides* foi de 745 U/g, 675 U/g por *T. harzianum*, 97 U/g por *T. virens* e 1.144 U/g por *Trichoderma* sp. Para CMCase, a maior produção foi obtida pelo cultivo de *T. virens* (11 U/g). A produção de β -glucosidase, em ambos os substratos analisados, foi detectada com valores entre 1 a 2,5 U/g.

Sohail *et al.* (2009), cultivaram *A. niger* MS82 e as maiores produções de endoglucanase (0,35 U/mL) e β -glicosidase (0,31 U/mL) foram obtidas em meios a base de farelo de trigo e bagaço, respectivamente. No trabalho de Irfan (2012), o cultivo de *T. viride* usando bagaço de cana pré-tratado resultou em valores mais expressivos na produção de CMCase (15 U/g) em relação a outros substratos testados pelo autor.

Ao selecionar o substrato deve-se levar em conta o custo e a viabilidade de uso, o que na maioria das vezes, em cultivo de substrato em meio sólido, resulta no uso dos resíduos agroindustriais (Pandey *et al.*, 2000), como o bagaço de cana.

Figura 30. Produção das enzimas pelas espécies de *Trichoderma* em FES, utilizando diferentes misturas de resíduos lignocelulósicos (5g de mistura de bagaço de cana com farelo de trigo na proporção de 1:1), a 28°C, e pelo tempo de incubação de melhor produção das enzimas.



A tabela 3 resume a produção enzimática obtida em trabalho anterior (Egea *et al.*, 2014).

As condições de cultivo foram: tempo de incubação 240h, sendo retirada a cada 24h uma

amostra; temperatura de incubação 28°C; pH 5; bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), solução salina composta de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 . Na Tabela 4 estão os melhores resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 9. Atividade enzimática das quatro dez linhagens de *Trichoderma* (Egea *et al.*, 2014).

Linhagens		CMCase (U/ml)	Xilanase (U/ml)
<i>Trichoderma sp.</i>	F22	2	3,5
<i>Trichoderma sp.</i>	F28	4,5	17
<i>Trichoderma sp.</i>	F03	1,5	12
<i>Trichoderma sp.</i>	G03	3,5	7,5

Tabela 10. Resumo das melhores condições obtidas no presente trabalho na produção de CMCase, B-glicosidade e Xilanase, sob diferentes condições físico-químicas.

Linhagens		CMCase
<i>T. asperelloides</i>	F22	60 ml, pH7, 28°C, 0,5%U, 48h
<i>T. virens</i>	F28	60 ml, pH7, 28°C, 0,3%U, 48h
<i>T. harzianum</i>	F03	60 ml, pH7, 28°C, 0,5%U, 48h
<i>Trichoderma sp.</i>	G03	60 ml, pH7, 28°C, 0,3%U, 48h
Linhagens		β-glicosidade
<i>T. asperelloides</i>	F22	60 ml, pH7, 28°C, 0,3%U, 48h.
<i>T. virens</i>	F28	60 ml, pH7, 28°C, 0,3%U, 192h
<i>T. harzianum</i>	F03	60 ml, pH7, 28°C, 0,5%U, 192h
<i>Trichoderma sp.</i>	G03	60 ml, pH7, 28°C, 0,3%U, 192h
Linhagens		Xilanase
<i>T. asperelloides</i>	F22	40 ml, pH6, 28°C, 0,5%U, 120h.
<i>T. virens</i>	F28	40 ml, pH6, 28°C, 0,3%U, 120h
<i>T. harzianum</i>	F03	60 ml, pH6, 28°C, 0,7%U, 48h
<i>Trichoderma sp.</i>	G03	40 ml, pH6, 28°C, 0,3%U, 120h

* U = ureia como fonte de nitrogênio

4. CONCLUSÕES

A avaliação do potencial de produção e a otimização no processo de obtenção das enzimas CMCase, β -glicosidase e xilanase sob diferentes condições de cultivo resultou em um aumento na produção das enzimas pelo processo de fermentação em estado sólido quando comparado a quantidade obtida em trabalho anterior.

Apesar de não ter sido possível dosar a quantidade de lacase a partir dos métodos utilizados, foi possível demonstrar pelo teste qualitativo que quatro das espécies de *Trichoderma* analisadas produzem essa enzima.

A partir da identificação morfológica e molecular das espécies melhores produtoras, dentre as dez cepas em estudo, *T. virens*, *T. harzianum* e *T. asperelloides* apresentaram melhores resultados na otimização da produção das enzimas de interesse, sendo, portanto, selecionadas para a continuidade do trabalho.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO E POSTERIOR SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

1. INTRODUÇÃO

O processo de produção de etanol de segunda geração demanda a transformação da celulose em monômeros de glicose para posterior fermentação. A hidrólise enzimática tem sido a melhor alternativa para a sacarificação da biomassa em termos de especificidade e redução de compostos tóxicos para as leveduras fermentativas. Porém, devido à natureza recalcitrante do material lignocelulósico, o acesso das enzimas aos polímeros de celulose e hemicelulose é dificultado e a eficiência da hidrólise torna-se muito baixa. Assim, pré-tratamentos do material antes da hidrólise enzimática tem se mostrado um método facilitador da atividade enzimática e de aumento nos rendimentos em glicose no hidrolisado (Kashaninejad & Tabil, 2011; Rijal *et al.*, 2012).

O princípio desse pré-tratamento é desestruturar as fibras, romper a cristalinidade da celulose e reduzir o teor de lignina que impede o acesso das enzimas a celulose durante a hidrólise enzimática (Goshadrou *et al.*, 2011).

Em vista da natureza diversificada do material lignocelulósico, vários processos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos têm sido empregados no pré-tratamento (Singh *et al.*, 2015), sendo que a associação entre esses métodos tem intensificado a eficácia do processo.

Os objetivos desta etapa foram avaliar os efeitos dos pré-tratamentos com micro-ondas em meio ácido, alcalino e em presença de glicerol em relação à desestruturação das fibras do bagaço de cana-de-açúcar e aplicar as enzimas obtidas no cultivo das cepas de *Trichoderma* na sacarificação desse bagaço tratado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Composição química do bagaço de cana

As composições de carboidratos e lignina dos bagaços tratado e não tratados foram avaliadas utilizando o método *NREL Laboratory Analytical Procedures* (Sluiter *et al.*, 2012). Para a determinação da celulose, hemicelulose e lignina, 0,3 g de amostra de bagaço seco foi misturado a 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% e agitado a 150 rpm por 30 min a 30°C). Após essa etapa foram acrescentados 84 mL de água destilada a cada amostra. O material foi autoclavado por 1 h e em seguida filtrado a vácuo. O filtrado foi utilizado para quantificação da fração lignina solúvel por análises espectrométricas ($\lambda=240$ nm), usando ácido gálico como padrão analítico e as frações de celulose e hemicelulose, por meio da quantificação de glicose e xilose liberadas utilizando a coluna CarboPac PA-1 acoplada a cromatógrafo iônico HPAEC-PAD (ICS 5000, Dionex Corporation-USA), fluxo usado foi de 1 mL/min. O material sólido retido no papel de filtro foi seco a 105°C para a determinação do peso seco e queimado à 550°C por 4 h para a quantificação das cinzas. Estes dados (peso seco e cinzas) foram utilizados para calcular a quantidade de lignina insolúvel ainda presente no material. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.2. Pré-tratamento do bagaço com aplicação de micro-ondas

Para a realização dos ensaios foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar previamente lavado, seco e triturado a partículas de 1 a 3 mm. Amostras de 3g foram suspensas em 30 mL de soluções ácida (ácido fosfórico a 0,05 M), alcalina (hidróxido de sódio a 0,01 M) e glicerol (10%) e água destilada por 24h. Após esse período, um bloco de amostras foi submetida à ação de micro-ondas (2450 MHz) por 2 min e outro, mantido nessas soluções a temperatura ambiente pelo mesmo período (2 min). Um forno de micro-ondas doméstico foi adaptado para acoplar um condensador com refluxo convencional, de modo a permitir o uso contínuo da irradiação sem perda de volume (figura 16). Após a aplicação de micro-ondas, 30 mL de água destilada

foram adicionados ao material, que foi homogeneizado e filtrado a vácuo. O material sólido foi seco a 105°C para determinação do peso seco e estocado para posterior utilização na hidrólise enzimática e caracterização química. O filtrado foi utilizado para a determinação dos teores de açúcares redutores (ART) pelo método Somogy-Nelson (Somogyi, 1952) a partir da curva padrão de glicose, compostos fenólicos totais (CFT) pelo método de Singleton *et al.* 1999, a partir da curva padrão de ácido vanílico e análises qualitativa e quantitativa dos açúcares liberados por técnicas cromatográficas, conforme descrito.

Figura 16. Forno micro-ondas adaptado (Silva *et al.*, 2006).



2.3. Avaliação dos potenciais inibidores da fermentação alcoólica gerados durante o tratamento do bagaço.

As análises de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) foram realizadas a partir do líquido obtido do tratamento do bagaço. As análises foram realizadas em HPLC-Uv-Vis, Dionex uHPLC 3000 com bomba P680, compartilhamento de coluna a 30°C e fluxo de 0,8ml/min. A coluna utilizada foi EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 CN de fase reversa, sendo a fase móvel isocrática composta por 90% de água e 10% de metanol com detecção a 276nm a partir do detector UVD 340v – Dionex.

2.4. Análises de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As amostras de bagaço in natura e submetidas aos tratamentos foram analisadas por termogravimetria (TG e DTG) utilizando o equipamento TG 4000 – Perkin Elmer®. Foram utilizadas aliquotas de 8 mg de bagaço e temperaturas de 50 a 700°C com taxa de aquecimento de 50°C/min e sob atmosfera de nitrogênio (20 mL/min).

As análises de DSC foram utilizadas para comparar as alterações ocorridas na estrutura do bagaço de cana após os diferentes pré-tratamentos. Aproximadamente 2 mg de bagaço tratado foram colocados no porta-amostra hermético de alumínio e então submetidos à aquecimento de 100 a 275 °C, a uma taxa de aquecimento de 25°C/min em um DSC Perkin Elmer (DSC 8000). O gás de arraste utilizado foi o N₂ puro (20 mL/min) e como referência foi utilizado um porta-amostra vazio.

2.5. Preparo do material para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)– caracterização morfológica do bagaço tratado e não tratado.

O material foi fixado por 24 h em solução de glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3), pós-fixado em tetróxido de ósmio 0,5% no mesmo tampão por 30 min, foi desidratado por meio de séries crescentes de soluções alcoólicas. O material foi seco em CO₂ líquido em aparelho de Ponto Crítico CPD 010 (Balzers Union) e recoberto com ouro em metalizador (MED da Balzers Union). A análise do material e a documentação fotográfica foram realizadas em MEV modelo Quanta 200 da Fei Company, pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências da UNESP Campus de Botucatu.

2.6. Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado

As hidrólises enzimáticas dos bagaços de cana in natura e tratados com micro-ondas e sem micro-ondas foram realizadas em Erlenmeyers de 20 mL tampados com rolhas de borracha utilizando-se 0,3g de bagaço seco para um volume de solução de reação de 7 mL, a qual continha tampão acetato (pH 5,0 / 0,1 M), endoglucanase, β -glicosidase, e xilanase obtidas do cultivo de *T. virens* (21, 4, 1640 U/g de bagaço seco, respectivamente), *T. harzianum* (21, 1.5, 1063 U/g, respectivamente) e *T. asperelloides* (23, 1.2, 1586 U/g, respectivamente) e a solução da enzima comercial Celluclast 1.5L (Novozymes) na proporção de 121 U/g endoglucanase; 49 U/g β -glicosidase and 407 xilanase U/g. As amostras foram incubadas a 40°C por 24h sob agitação de 150 rpm. O líquido obtido por filtração foi usado para análises de açúcares redutores totais pelo método Somogy-Nelson (Somogyi, 1952) e para análises qualitativas e quantitativas dos açúcares por cromatografia iônica e dos teores de fenóis totais pelo método de Singleton *et al.* 1999, a partir da curva padrão de ácido vanílico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição das fibras do bagaço não tratado e após o tratamento com micro-ondas e solubilização da massa

As composições centesimais dos bagaços de cana não tratado e pré-tratado estão representadas na tabela 5. O bagaço não tratado apresentou 45% de celulose, 26% de hemicelulose e 26% de lignina. Após o tratamento houve aumento na quantidade de celulose em todas as amostras, sendo que nas amostras referentes ao tratamento com NaOH as frações de celulose e de hemicelulose aumentaram para 51% e 28%, respectivamente. A fração de lignina no bagaço tratado foi reduzida sendo que as maiores reduções ocorreram nas amostras tratadas com micro-ondas na presença de glicerol (10%) e de NaOH (0,01 M).

O glicerol sob a irradiação de micro-ondas promove um aquecimento intenso da solução, podendo chegar a 240°, além disso, por ser um polialcool altamente polar tem fácil penetração nas fibras resultando na quebra da fração de lignina (Moretti *et al*, 2014).

No presente trabalho, apesar da redução na fração de lignina ter sido maior no tratamento com glicerol, a quantidade de fenóis totais liberados após o tratamento foi maior com a utilização da solução alcalina (4,2%) indicando que a presença de NaOH associado ao uso do micro-ondas, além da quebra exerce ação na solubilização da lignina. O glicerol, provavelmente, atuou mais nas ligações ésteres entre a lignina e hemicelulose do que na liberação de fragmentos mais solúveis.

Conforme demonstrado por Mood *et al* (2013) a associação entre tratamentos físico-químicos (micro-ondas com ácido ou base) resulta em vantagens como maior eficiência na produção de açúcares, maior redução da lignina e menor quantidade de inibidores formados. Hu & Wen (2008) ao avaliarem a quantidade de lignina removida no tratamento de *switchgrass* em duas condições distintas, observaram que no tratamento com micro-ondas associado a NaOH (21%) houve maior remoção do que no método de aquecimento convencional com NaOH (16%).

Tabela 11. Composição química do bagaço de cana não tratado e submetido ao tratamento com micro-ondas em meios ácidos, alcalino e em presença de glicerol.

Tratamento	Composição (%)			Fração líquida (%)	
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	ART	FT
H ₃ PO ₄	46±0,2	24±1,5	25±0,05	0,02 ± 0	1,1 ± 0,2
NaOH	48±0,02	26±0	25±0,04	0,02 ±0	3,7 ± 0.0
Glicerol	48± 0,09	27±1,0	23±1,0	0,05 ±0	1,9 ± 0.0
Água	48±1.9	27±1,05	26.2±0,09	0,02 ±0	1,4 ± 0
H ₃ PO ₄ /micro-ondas	45±4,0	24±3,03	26±0,04	0,02 ±0	1,2 ± 0,1
NaOH/micro-ondas	51±0,06	28±0,4	24±1,07	0,02 ±0	4,2 ± 0,0
Glicerol/micro-ondas	48 ±1,03	26 ±0,08	21 ±007	0,04 ±0	2,3 ± 0,1
Água/micro-ondas	47±2,0	26±0, 7	25±1,01	0,01 ±0	1,8 ± 0,2
Não tratado	45±2,09	26±1,0	26±0,02	0,02 ±0	2,0 ± 0,2

*ART açúcares redutores totais; CFT compostos fenólicos totais

3.2. Caracterização do eluente após tratamento: análises de açúcares redutores totais (ART), compostos fenólicos totais (CFT) e inibidores do material não tratado e pré-tratado.

A Figura 16a, apresenta a quantidade de açúcares redutores liberados após o pré-tratamento do bagaço de cana com e sem a aplicação de micro-ondas. Os resultados mostram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem aplicação de micro-ondas, sendo a maior quantidade de ART liberado (0,06 mg/g) no tratamento com glicerol associado a micro-ondas (*ANOVA*, $p=0$). Nos tratamentos sem aplicação de micro-ondas as quantidades de ART foram as mais baixas.

As concentrações de furfurais e compostos fenólicos liberados a partir das amostras de bagaço e detectadas no líquido eluente do tratamento foram analisadas. Quanto aos compostos fenólicos liberados, as maiores (4,24 mg/g) e menores (1,16 mg/g) concentrações resultaram do tratamento com NaOH e H₃PO₄, respectivamente (*ANOVA*, $p=0$), ambos com uso do micro-

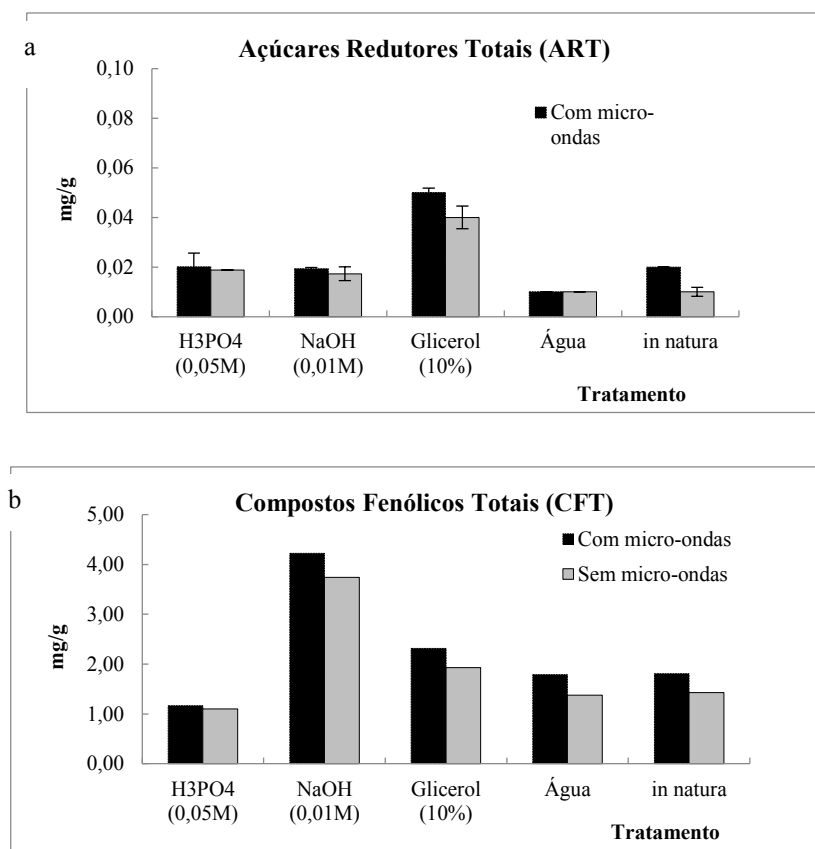
ondas (Figura 16b). Sem o uso de micro-ondas, as quantidades de CFT liberados foram menores em todos os tratamentos.

Um tratamento eficaz é aquele que proporciona o rompimento das barreiras físicas e químicas da biomassa de modo que as enzimas tenham acesso aos seus substratos e, ao mesmo, tempo minimiza a degradação dos polímeros de açúcares evitando a perda de açúcares. Quando esse tratamento gera material que é diretamente enviado a hidrólise enzimática também é desejável que o mesmo leve a menor formação possível dos compostos considerados inibidores da levedura *S. cerevisiae*, como os derivados da oxidação de açúcares como os furfurais e os fenólicos derivados da solubilização da lignina (Tomás-Pejó *et al.*, 2010).

Não foram detectados furfural e hidroximetilfurfural no eluente dos tratamentos. A formação de furfural pode ocorrer a partir da oxidação da xilose, proveniente da hidrólise da hemicelulose (Mosier *et al.*, 2005) enquanto que o de hidroximetilfurfural (HMF) é proveniente oxidação da glicose, resultante principalmente da hidrólise da celulose (Gámez *et al.*, 2006). Dados de literatura tem mostrado que esses compostos são facilmente formados em processos com elevada temperatura (Guo *et al.*, 2008).

No caso do presente trabalho, a etapa do pré-tratamento não foi imediatamente seguida pela hidrólise enzimática visto que houve a filtração e separação entre líquido do tratamento e o bagaço sólido, embora parte dos fenólicos possa ter ficado aderida ao material sólido.

Figura 17. Liberação de açúcares redutores totais (a) e de compostos fenólicos totais (b) após 2min de tratamento com ação de micro-ondas em presença de diferentes compostos químicos.



A perda de massa do material submetido aos tratamentos pode ser indicativo da extensão da degradação dos componentes do mesmo. Em todos os tratamentos houve redução no peso seco do bagaço de cana, sendo que solubilização significativa foram observadas no tratamento com micro-ondas e NaOH (14%) (*Anova*, $F=43$; $p<0,05$) (tabela 6). A maior perda de massa no tratamento com NaOH pode ser relacionado a maior solubilização da lignina.

Segundo Kim & Han (2012); Hu & Wen (2008), Taherzadeh & Karimi, (2008) e Kurakake, *et al* (2001) com a remoção da lignina, ocorre a abertura dos poros da biomassa favorecendo o acesso das enzimas celulolíticas às fibras do bagaço e um aumento na superfície exposta da celulose e diminuição no seu grau de polimerização e cristalinidade podendo facilitar a hidrólise enzimática. Entretanto, a completa ou parcial deslignificação do material nem sempre está associada aos melhores rendimentos na sacarificação enzimática visto que outros

fatores inerentes ao coquetel enzimático empregado também são determinantes da eficiência do processo (Várnai *et al.*, 2010).

Tabela 12. Diferença de peso do bagaço de cana in natura e após os tratamentos com NaOH, H₃PO₄, glicerol e água.

Tratamento	Peso após o tratamento (g)	Solubilização de material (%)
H ₃ PO ₄ /micro-ondas	2,70 ± 0,01	11
NaOH/micro-ondas	2,60 ± 0,02	14
Glicerol/micro-ondas	2,84 ± 0	6
Água/micro-ondas	2,75 ± 0,03	9
Não tratado	2,75 ± 0,03	9

* peso inicial 3g

3.3. Hidrólise enzimática

Para a hidrólise enzimática foram utilizadas apenas as amostras submetidas aos tratamentos com micro-ondas e as enzimas utilizadas foram aquelas obtidas pelo cultivo das espécies de *Trichoderma* selecionadas (*T. virens*, *T. harzianum* e *T. asperelloides*) e da enzima comercial Celluloclast 1.5L (Sigma). Como controle foi utilizado bagaço *in natura* e substituição da enzima por água.

Dentre os diferentes tipos de tratamento aos quais os bagaços foram submetidos, os melhores rendimentos na hidrólise, com exceção da hidrólise realizada pelas enzimas da espécie *T. harzianum* (F03), foram obtidos usando bagaço tratado com hidróxido de sódio, sendo obtidos 773 mg/g de açúcar com a enzima comercial e 535 mg/g de açúcar a partir das enzimas de *T. virens* (figura 17). O segundo maior rendimento (252 mg/g) foi obtido no tratamento com H₃PO₄ com essas mesmas enzimas.

A adição de ácido à biomassa tem sido descrita como um fator de remoção da hemicelulose aumentando a digestibilidade enzimática da celulose do sólido residual (Mood *et*

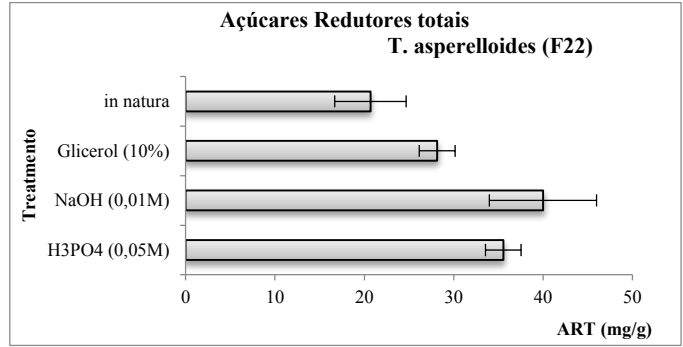
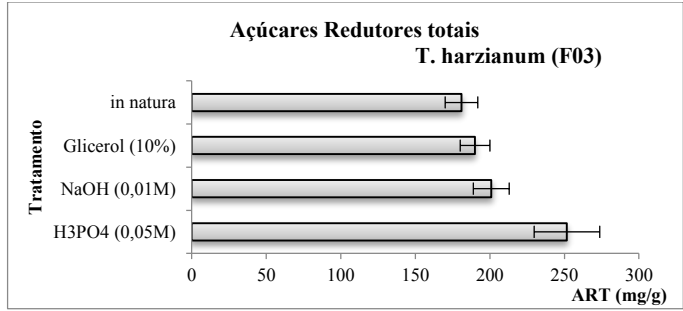
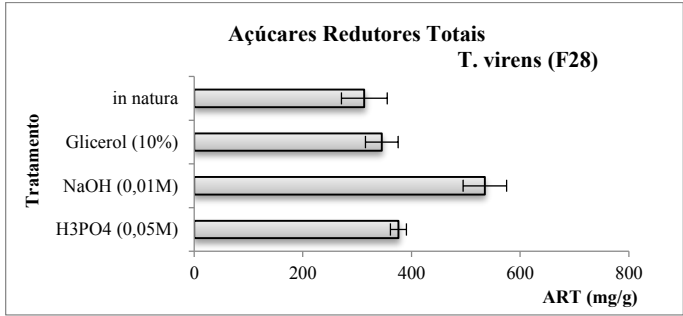
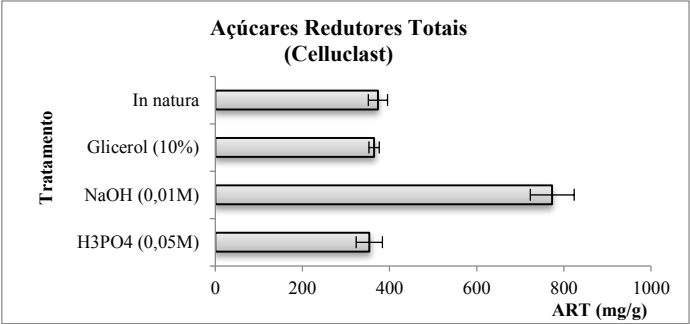
al 2013). Ramos *et al.* (2015), observaram um rendimento de 76 g/L de açúcar na hidrólise do bagaço de cana tratado com ácido fosfórico.

Esses dados são contrários aos observados no presente trabalho, no qual a melhor digestibilidade enzimática da celulose foi obtida com o uso de NaOH. O tratamento alcalino pode aumentar a hidrólise da celulose por modificar sua estrutura cristalina (Li *et al.*, 2012), o que proporciona melhores rendimentos na hidrólise e maior deslignificação da biomassa. Hu & Wen (2008) ao tratarem *switchgrass* com solução de NaOH, obtiveram um rendimento de 80% na hidrólise. Gupta *et al.* (2011) ao analisarem o efeito do tratamento com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e cloreto de sódio no rendimento da hidrólise enzimática, observaram que os melhores resultados foram obtidos com as soluções alcalinas (cloreto de sódio 90%, hidróxido de sódio 55%) em relação a solução ácida (máximo de 48%). Rezende *et al.* (2011), conseguiram um rendimento de 72% na hidrólise do bagaço de cana com NaOH (1%) em relação ao tratamento com H₂SO₄ (28%). Asgher *et al.* (2013), alcançaram 48% de deslignificação no tratamento do bagaço de cana a 5% de NaOH e 69% de celulose hidrolisada pelas enzimas de *T. harzinaum*.

Outros trabalhos da literatura corroboram a eficiência do tratamento com NaOH em diferentes biomassas, apontando essa solução como um agente facilitador da hidrólise. Maior digestibilidade da celulose foi obtida no tratamento com NaOH em relação a H₂SO₄ (Zhang *et al.*, 2013), Kim & Han (2012) observaram remoção de 52% de lignina no tratamento de palha de arroz com rendimento de 83% na hidrólise.

Entre as espécies de *Trichoderma*, os melhores resultados obtidos com *T. virens* podem ser em função da maior quantidade de β -glicosidase produzida por essa espécie em relação as demais.

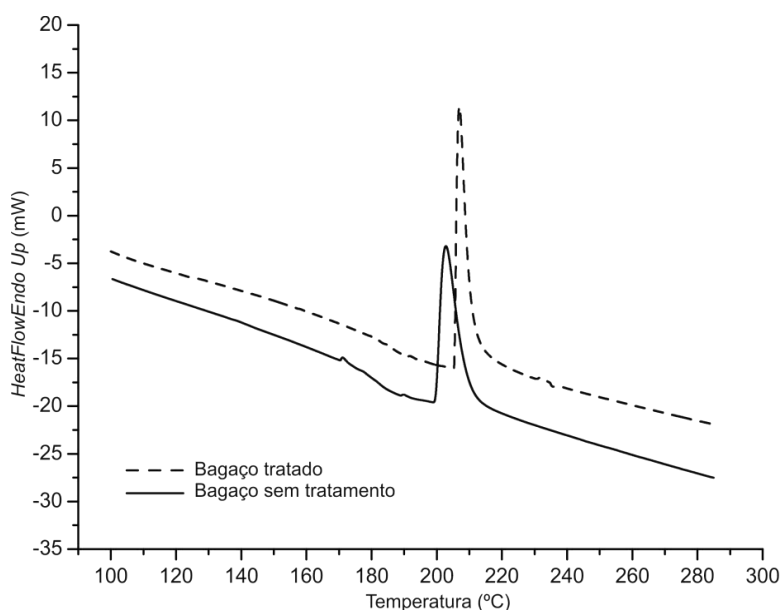
Figura 318. Quantidade de açúcar redutor total (ART) liberado por hidrólise enzimática utilizando preparado enzimático das espécies de *Trichoderma* e por enzima comercial Celluclast 1.5 L (Sigma).



3.4. Análises Termogravimétricas

Em função dos melhores resultados da hidrólise enzimática terem sido com o bagaço tratado com NaOH, este material foi escolhido para as análises termogravimétricas e a caracterização morfológica e o bagaço in natura foi usado como referência. Nos termogramas de DSC (Figura 18) do bagaço de cana de açúcar sem tratamento e do bagaço tratado com micro-ondas em meio alcalino apresentam um pico exotérmico (T_{onset}), sendo seus valores, respectivamente, 210°C e 199°C. A maior temperatura de degradação do bagaço tratado pode ser relacionado com o aumento da estabilidade térmica devido ao aumento da porcentagem de celulose após o tratamento. A energia absorvida (ΔH_{deg}) pelo bagaço após o tratamento foi 57% maior em relação ao bagaço sem tratamento (149 ± 1 e 95 ± 1 J/g) o que pode estar associado à redução da lignina e aumento da disponibilidade de carboidratos.

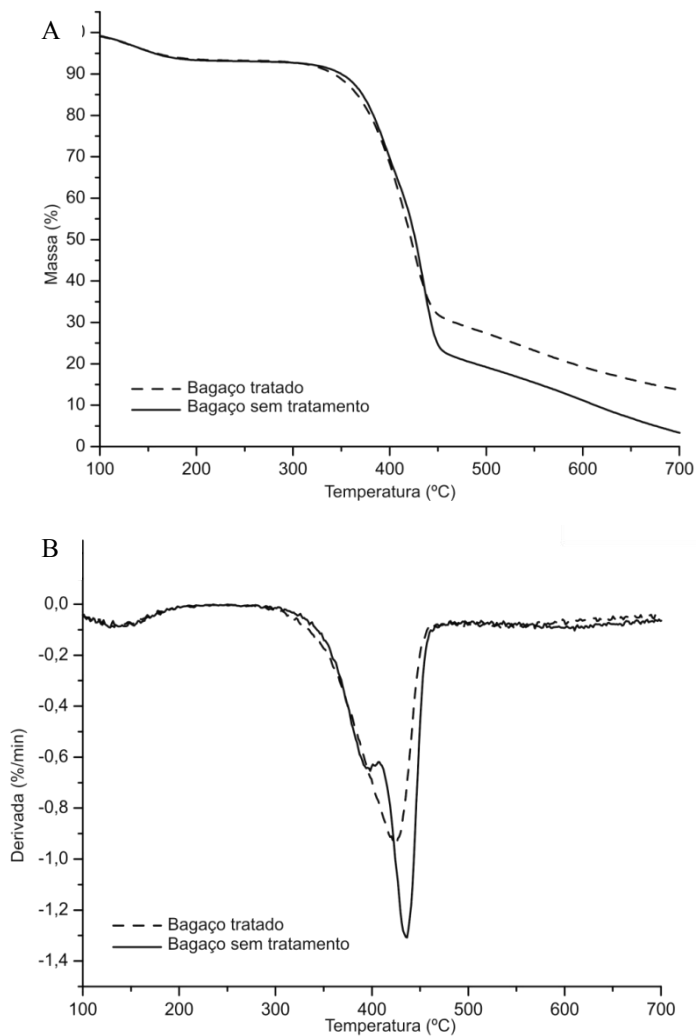
Figura 19. Termograma (DSC) do bagaço de cana não tratado e após tratamento com micro-ondas em solução alcalina.



Os termogramas de TGA (figura 19a) da amostra tratada e do bagaço sem tratamento apresentam uma diferença nítida no teor de cinzas finais, na qual o bagaço tratado tem aproximadamente 8,3% a mais em relação ao sem tratamento. Estes resultados indicam que pode ter ocorrido solubilização e/ou volatilização de compostos. A maior quantidade de cinzas no bagaço tratado pode ser em função da perda de material volátil durante o tratamento, resultado também observado no trabalho de Moretti *et al* (2014).

A DTG (figura 19b) apresenta dois principais eventos, sendo o primeiro em aproximadamente 100°C referente a perda de aproximadamente 7% de água. O segundo evento ocorreu em aproximadamente 278°C e refere-se ao início da degradação térmica do material, o ombro em 365°C é indicativo da presença de grandes quantidades de hemicelulose (Poletto *et al.*, 2012). A ausência do ombro em 365°C no termograma de DTG do bagaço tratado indica modificações na estrutura das hemiceluloses após o bagaço ser tratado. Estes resultados reforçam a hipótese de que parte da hemicelulose e da lignina podem teriam sido removidas após o tratamento. Segundo Mothé & Miranda (2009) durante o aquecimento do bagaço, podem ocorrer três eventos relacionados a perda de peso do material, sendo, a eliminação da umidade, a eliminação de produtos extraíveis orgânicos, tais como gorduras, ceras, alcalóides, glicosídeos e terpenóides, e a decomposição de celulose, hemiceluloses e lignina.

Figura 20. Termograma (TGA e DTG) do bagaço de cana não tratado após tratado com microondas em solução alcalina.



3.5. Caracterização morfológica do bagaço de cana tratado

Os resultados das análises em microscopia eletrônica mostraram importantes mudanças na morfologia ultraestrutural do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento com NaOH associado às micro-ondas, quando comparado com o material controle (bagaço in natura).

No bagaço controle pôde-se observar uma superfície lisa e, portanto, uma nítida preservação da fibra do bagaço de cana (Figura 20 A-D). Ainda observa-se a separação entre duas células parenquimáticas presentes em sua superfície (Figura 20 D).

Quando do uso de hidróxido de sódio observa-se mudanças drásticas na superfície do bagaço de cana como o eriçamento pronunciado (Figura 21 A-C), fraturas (Figura 21A-B), danos e remoção de material de superfície (Figura 21C). Alterações nos poros celulares, plasmodesmos, (Figura 21D) também ocorrem no material tratado.

Figura 321. Eletromicrografia (microscopia eletrônica de varredura – MEV) de bagaço de cana-de-açúcar controle (ausência de micro-ondas) – *in natura*.

- A) Observar a superfície lisa do bagaço de cana. 100X – barra= 1 mm.
- B) Detalhe da superfície do material. 200X – barra= 500 μm .
- C) Maior aumento da superfície mostrando sua integridade. 400X – barra= 400 μm .
- D) Detalhe mostrando a localização entre duas células parenquimáticas (seta). 1000X – barra= 100 μm .

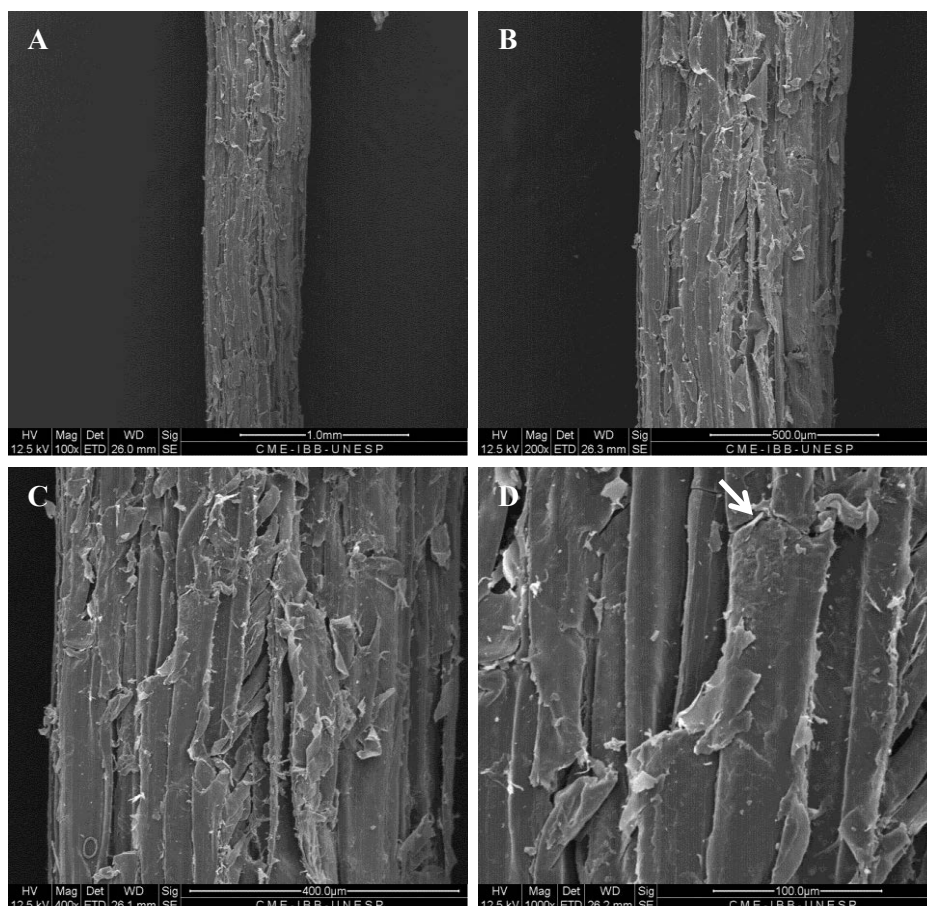
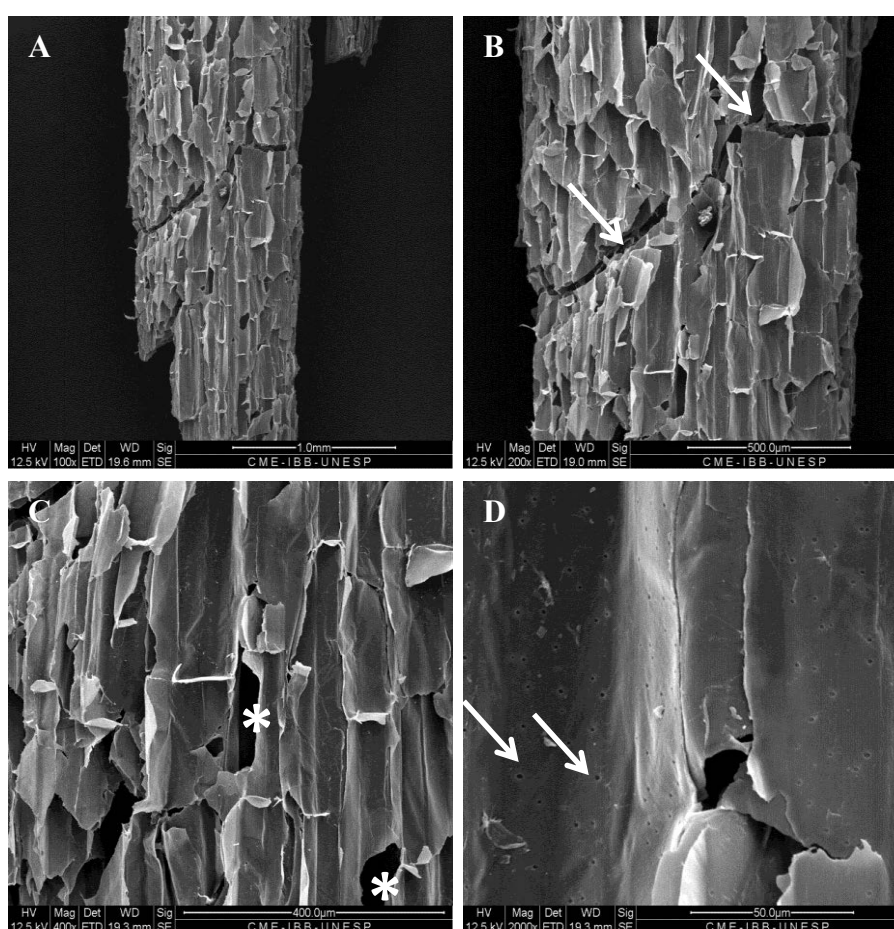


Figura 22. Eletromicrografia (MEV) de bagaço de cana de açúcar emergido por 24 h em solução de água associado a NaOH (0,01M) sob a ação de 2 min de micro-ondas.

- A) Visão geral do bagaço de cana onde observamos desarranjo das paredes celulares, sob a forma de eriçamento de sua superfície. 100X – barra= 1 mm.
- B) Detalhe do bagaço de cana mostrando fratura (setas). 200X – barra= 500 μm .
- C) Maior aumento mostrando danos/remoção (*) de material da superfície do bagaço de cana. 400X – barra= 400 μm .
- D) Poros celulares (plasmodesmos) na superfície (setas). 2000X – barra= 50 μm .



Nunes *et al.*, (dados não publicados) após submeter o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio em diferentes concentrações (0,001 M e 0,1M) à Microscopia eletrônica de varredura (MEV), observaram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Na Figura 20 é possível observar modificações na superfície da biomassa, como o eriçamento, danos/perda de material, fraturas e desestruturação. Essas diferentes modificações devem-se

a espessura da fibra. Fibras de bagaço mais densas sofreram rachaduras em sua superfície assim como perda/fratura do material e as fibras menos densas abriram-se quase que completamente.

Também é possível observar um desarranjo das paredes celulares e isso estendeu-se às paredes em torno da membrana de pontoação. A semelhança do que foi observado no presente trabalho, Nunes *et al* (dados não publicados) observaram rupturas entre a lamela média e a parede primária no material tratado com NaOH.

Pré-tratamentos direcionados a solubilização da lignina com reagentes como o NaOH que utilizamos nesse trabalho têm sido amplamente empregados. Além de minimizar a adsorção improdutiva das enzimas, este pré-tratamento geralmente acarreta em aumento na acessibilidade à celulose (Yang *et al.*, 2002).

Pré-tratamentos de biomassa com a aplicação de micro-ondas em meio alcalino reduziram em 50% o tempo para obtenção da mesma quantidade de açúcares redutores por hidrólise enzimática da palha de arroz quando comparado ao processo sem micro-ondas, e foi verificado um aumento de 5% no etanol obtido a partir de palha de trigo (Zhu *et al.*, 2006). Desta forma, a avaliação desta tecnologia na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar é promissora em termos de aumento no rendimento de obtenção de açúcares redutores (Cullingford *et al.*, 1993).

Utilizando microscopia eletrônica de varredura em um estudo utilizando *switchgrass* (com o objetivo de aumentar a digestibilidade desta gramínea para consumo animal), Hu & Wen (2007) observaram que a combinação de micro-ondas e pré-tratamento alcalino favoreceu a disruptura das estruturas recalcitrantes, em grande vantagem ao aquecimento convencional. A superfície da *switchgrass* sem tratamento é descrita como compacta e coberta com um fino filme, uma camada de cera comumente encontrada em biomassa de herbáceas. Após o tratamento por aquecimento convencional a 190 °C a camada de cera da

superfície desaparece, embora a estrutura geral permaneça relativamente intacta. Quando o material foi tratado com micro-ondas muitos grânulos apareceram na superfície indicando uma quebra parcial da estrutura da lignina, embora esta pudesse ainda estar presente na superfície das partículas. No terceiro tratamento em que houve a combinação de um pré-tratamento alcalino a descrição pelos autores se aproxima do observado em nosso material, sugerindo que a lignina foi dissolvida e então a celulose e a hemicelulose foram mais expostas.

Koo *et al.* (2010) observaram em microscopia eletrônica de varredura mudanças na estrutura física da biomassa de *Liriodendron tulipifera* durante o pré-tratamento com hidróxido de sódio. Além da fragmentação estrutural, os autores observaram a formação de rugas e fissuras na superfície e atribuíram o fato ao inchaço do material. Segundo os autores a técnica de preparo do material pode ser também a causa do inchaço já que foi utilizada liofilização no seu preparo. Contudo essa expansão do material foi considerada importante para a eficiência da hidrólise enzimática. Ficou evidente que houve perda estrutural e formação de rugas aumentando a área de superfície e também a absorção enzimática, assim a hidrólise enzimática aumentou significativamente. Em paralelo com o nosso trabalho, podemos dizer que as rugas ou fissuras descritas por estes autores foram muito semelhantes às rupturas observadas no bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de sódio.

Em estudo posterior Koo *et al.* (2010) trabalhando com a mesma espécie, observaram também em MEV mudanças na estrutura da lignina. A lignina foi separada do complexo carboidrato-lignina no estágio inicial e então migrou para a superfície da biomassa, sendo finalmente redistribuída na superfície. Essas mudanças estruturais formaram gotículas na superfície e aumentaram o volume dos poros na biomassa pré-tratada. O aumento do volume dos poros aumentou também a área de superfície e também a absorção enzimática no estágio inicial. Deste modo a conversão enzimática aumentou significativamente. Foi verificado que

as gotículas eram formadas principalmente por lignina e que estas inibiram a hidrólise enzimática através da adsorção com a celulase.

4. CONCLUSÕES

A ação de micro-ondas associado ao uso do solvente alcalino NaOH proporcionou maior remoção da lignina, como observado na quantidade de compostos fenólicos liberados (4,24 mg/g) em comparação aos demais tratamentos.

Os melhores resultados da sacarificação enzimática, também resultaram do tratamento com bagaço com NaOH, o qual permitiu melhor acesso das enzimas às fibras e liberando uma quantidade de até 773 mg/g e 535 mg/g de açúcares redutores a partir das enzimas Comerciais e de *Trichoderma virens*, respectivamente.

As análises de microscopia e termogravimétricas validam os melhores resultados obtidos a partir do uso de micro-ondas e NaOH, ao apontarem mudanças nas estruturas do material e perda de massa.

5. CONCLUSÃO GERAL

1. Foi possível identificar três espécies de *Trichoderma* com potencial para a produção das enzimas lignocelulósicas;
2. Os melhores resultados obtidos no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foram a partir da associação entre micro-ondas e o NaOH;
3. Após o tratamento da biomassa, mudanças morfológicas e estruturais foram observadas nas fibras do bagaço tratado com micro-ondas e NaOH, corroborando o efeito do tratamento na desestruturação das fibras e
4. Foram obtidos bons resultados na hidrólise do bagaço a partir do material tratado com a solução alcalina e as enzimas de *Trichoderma virens*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Halim, E. S. Chemical modification of cellulose extracted from sugarcane bagasse: Preparation of hydroxyethyl cellulose. **Arabian Journal of Chemistry**, 7, p. 362–371, 2014.

Achyuthan, K. E.; Achyuthan, A. M.; Adams, P. D.; Dirk, S. M.; Harper, J. C.; Simmons, B. A.; Singh, A. K. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. **Molecules**, 15, p. 8641-8688, 2010.

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**, 101, p.4851-4861, 2010.

Amores, I.; Ballesteros, I.; Manzanares, P.; Sáez, F.; Michelena, G.; Ballesteros, M. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion. **Renewable Energies Research Nucleus**, UC Temuco, volume 1, (1), 2013.

Arato, C.; Pye, E. K.; Gjennestad G. The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. **Appl Biochem Biotechnol**, 123, p. 871–82, 2005.

Asgher, M.; Ahmad, Z.; Iqbal, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**, 44, p. 488– 495, 2013.

Bakri, Y.; Jacques, P.; Thonart, P., 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnology**, 105–108, 737–748, 2003.

Baldrian, P. Fungal laccases — occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev**, 30, p. 215-242, 2006.

Bansal N.; Tewari, R.; Soni, R.; Soni, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, 32, p. 1341–1346, 2012.

Bardet, M., Robert, D.R., Lundqvist, K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. **Sven. Papperstidn**, 6, p. 61-67, 1985.

Barron GL (1968). The genera of hyphomycetes from soil. Robert E. Krieger, New York **Biochemistry**, 7, p. 7-12, 2012.

Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal, N.; Kumar, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 36, p. 91–106, 2014.

Benjamin, Y.; Cheng, H.; Görgens, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, 51, p.7– 18, 2013.

Bourbonnais, R.; Paice, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, 255, p. 445-450, 1988.

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**, 128, p. 81-88, 1995.

Cabrera, E.; Muñoz, M. J.; Martín, R.; Caro, I.; Curbelo, C.; Díaz, A. B. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, 167, p. 1–7, 2014.

Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Effect of Different Pretreatment of Sugar Cane Bagasse on Cellulase and Xylanases Production by the Mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

Cao, W.; Sun, C.; Liu, R.; Yin R.; Wu, X. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresour. Technol.**, 111, p.215–221, 2012.

Castro, A. M.; Jr. N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, p. 181-188, 2010.

Cesário, A. L. L.; da Costa, A. C.; Rabelo, S. C. Effect of particle size on dilute acid pretreatment and enzyme hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, 37, p. 409-414, 2014.

Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A. K.; Kuhad, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, 98, p. 1947–1950, 2007b.

Chang, V. S., Holtzapple, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84, p. 5–37, 2000.

Chen, W.; Tu, Y.; Sheen, H. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, 88, p. 2726–2734, 2011.

Cheng, J.; Su, H.; Zhou, J.; Song, W.; Cen, K. Microwave-assisted alkali pretreatment of rice straw to promote enzymatic hydrolysis and hydrogen production in dark- and photo-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36, p. 2093–2101, 2011.

Conessa, A.; Punt, P. J.; Van den Hondel, C. A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal Biotechnol**, 93, p. 143–158, 2002.

Conover, W. O. J., 1971. Practical nonparametric statistics: 1–302. John Wiley, New York.

Converse, A. O., Grethlein, H. E., 1985. Process for hydrolysis of biomass. US Patent 4,556,430.

Cubero, M. T. G.; Benito, G. G.; Indacoechea, I.; Coca, M.; Bolado, S. Effect of ozonolysis pretreatment of enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, 100, p. 1608–1613, 2009.

Cullingford, T. E.; Clark, T. B.; Phillips, I. R. Characterization of cDNAs encoding the rat testis-specific E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex: comparison of expression of the corresponding mRNA with that of the somatic E1 alpha subunit. **Biochim. Biophys. Act.**, 1216, p. 149–153, 1993.

De La Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. **Chem. Soc. Rev.**, 34, p. 164–178, 2005.

Demirbas A. Aqueous glycerol delignification of wood chips and ground wood. **Bioresource Technol**, 63, p. 179–85, 1998.

Demirbas, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Appl Energy**, 295, p. 86:S151–61, 2009.

Dhillona, G. S.; Oberoia, H. S.; Kaurb,S.; Bansald, S.; Brar, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, 34, p. 1160– 1167, 2011.

Dillon, A. Celulases. In: Said, S.; Pietro, R. C. L. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 22, pp.243-270, 2004.

Doherty, W. O. S.; Mousavioun, P.; Fellowsb, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, 33, p. 259–276, 2011.

Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T (1980) Compendium of soil fungi, vol. 1 and 2. Academic.

Duff, S. J. B.; Murray, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, 55, p. 1–33, 1996.

Dunlop, A. P. Furfural formation and behaviour. *Ind. Eng.Chemical*, 40, p. 204-209, 1948.

Durán, N.; Esposito, E. Potential application os oxidative enzymes and phenoloxidase- like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. Environ**, 28, p. 83-99, 2000.

Egea, T. C.; Rodrigues, A.; Atique, P. M.; da Silva, R.; Gomes, E. Assessment of fungi in soils of sugarcane crops and their potential for production of biomass-degrading enzymes. **African Journal of Microbiology Research**, 8, 2014.

El-Zawawya,W. K.; Ibrahima, M. M.; Abdel-Fattahb, Y. R.; Solimanb, N. A. Mahmoudc, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, 84, p. 865–871, 2011.

Fengel, D.; Wegener, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. De Gruyter, Berlin, 1984.

Ferrarezi, A. L.; Ohe T.H.K.; Borges, J.P.; Brito R.R.; Siqueira R.M.; Vendramini, P. H.; Quilles J.C.J.; Nunes C.C.C.; Bonilla-Rodriguez; G. O.; Boscolo, M.; Da-Silva, R; Gomes, E. Production and characterization of lipases and immobilization of whole hyphae of the thermophilic

Thermomucor indicae seudaticae N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic**.

Ferreira, V. F.; Rocha, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, 32, p. 623-638, 2009.

Gabhane, J.; Price Willian, S. P. M.; Vaidya, A. N.; Mahapatra, K.; Chakrabarti, Y. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment – A cellulosic ethanol perspective. **Biomass and Bioenergy**, 35, p. 96-102, 2011.

Gámez, S.; González-Cabriaes, J. J.; Ramirez, J. A.; Garrote, G.; Vázquez, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Eng**, 74, p. 78–88, 2006.

Gao J.; Weng, H.; Zhu, D.; Yuan, M.; Guan, F.; Xi, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermo-acidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour. Technol**, 99, p.7623-7629, 2008.

Gao, Y.; Xu, J.; Yuan, Z.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Liang, C. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. **Bioresource Technology**, 167, p. 41–45, 2014.

Garcia-Aparicio, M. P.; Ballesteros, I.; Gonzalez, A. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 129, p. 278–88, 2006.

Goldemberg, J. Em *Bioenergia no Estado de São Paulo*; Nigro, F. E. B.; Coelho, S. T., eds.; Imprensa Oficial do Estado de São Paulo: São Paulo, 2008, p. 110; World Energy Assessment - WEA 2000; *Energy and the challenge of sustainability*, United Nations Development Programme, United Nations Development of Economic and Social Affairs and World Energy Council.

Gomes, E.; Silva, R.; Serzedello, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Rev. Microbiology**, 29, p. 187-192, 1998.

Goshadrou, A.; Karimi, K.; Taherzadeh, M. J. Improvement of sweet sorghum bagasse hydrolysis by alkali and acidic pretreatments. **Bioenergy Technology**, p. 374-380, 2011.

Goyal, A., Ghosh, B., Eveleigh, D. **Bioresour. Technol**. p. 36- 37, 1991.

Goyal, M.; Kalra, K. L.; Sareen, V. K.; Soni, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Braz J Microbiology**, 39, p. 535–541, 2008.

Grabber, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, 45, p. 820–831, 2005.

Gray, K. A.; Zhao, L.; Emptage, M. Bioethanol. **Current Opin. Chem. Biology**, 10, p. 141–146, 2006.

Grous, W. R., Converse, A.O., Grethlein, H.E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme and Microbial Technology**, 8, 274–280, 1985.

Guo, G. L.; Chen, W. H.; Chen, W. H.; Men, L. C.; Hwang, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresour Technol**, 99, p. 6046–53, 2008.

Gupta, R.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**, 84, p. 1103–1109, 2011.

Gusakov, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, p. 1–7, 2011.

Hammel, K.E.; Cullen, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr. Opin. Plant Biol**, 11, p. 349–355, 2008.

Harrison, M. D.; Zhang, Z.; Shand, K.; O'Hara, I. M.; Doherty, W. O. S.; Dale, J. L. Effect of pretreatment on saccharification of sugar cane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, 148, p. 105–113, 2013.

Hendriks, A. T. W. M.; Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol**, 100, p. 10–8, 2009.

Holker, U.; Lenz, J. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, 8, p. 301–306, 2005.

Hsu, T. A., Ladisch, M. R., T. S. A. O, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, 10, p. 315-319, 1980.

Hu, Z.; Wen, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, 38, p. 369-378, 2007.

Hu, Z.; Wen, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochem. Engineer. Journal**, 28, p. 369-378, 2008.

Irfan, M.; Nadeem, M.; Syed, Q. Influence of Nutritional Conditions for Endoglucanase Production by *Trichoderma viride* in SSF. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, 7, p. 07-12, 2012.

Isci, A.; Himmelsbach, J. N.; Pometto, A. L.; Raman, D. R.; Anex, R. P. Aqueous Ammonia Soaking of Switchgrass Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemical Biotechnol**, 144, p.69–77, 2008.

Ishizawa, C. I.; Jeoh, T.; Adney, W. S.; Himmel, M. E.; Johnson, D. K.; Davis, M. F. Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover **Cellulose**, 16 p. 677–686, 2009.

Jeoh T.; Ishizawa C.I.; Davis MF, Himmel, M. E.; Adney, W. S.; Johnson, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnol Bioeng**, 98, p. 112–22, 2007.

Juhasz, T. Z.; Szengyel, N.; Szijarto; Reczey, K. Effect of pH on cellulases production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 201, p. 113-116, 2004.

Kalogeris, E.; Christakopoulos, 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**, 38, p. 1099-1104, 2003.

Kapich, A. N.; Prior, B. A.; Botha, A.; Galkin, S.; Hatakka, A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme Microb Technology**, 34, p.187–95, 2004.

Kar, S.; Gauri, S. S.; Das, A.; Jana, A.; Maity, C.; Mandal, A.; Das Mohapatra, P. K.; Pati, B. R.; Mondal, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess Biosyst Eng**, 36, p. 57–68, 2013.

Karp, S. G.; Woiciechowski, A. L.; Soccol, V. T.; Soccol, C. R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review. **Brazilian archives of biology and technology**, 56, p. 679-689, 2013.

Kaur, U.; Oberoi, H.S.; Bhargav, V. K.; Sharma-Shivappa, R.; Dhaliwal, S. S. Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Industrial Crops and Products**, 37, p. 219–226, 2012.

Kim, I.; Han, J-I. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, 46, p. 210- 217, 2012.

Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N. S.; Ladisch, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzyme from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, 48, p. 408-415, 2011.

Kolasa, M.; Ahring, B. K.; Lübeck, P. S.; Lübeck, M. L. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, 2014.

Koo, B-W.; Kim, H-Y.; Park, N.; Lee, S-M.; Yeo, H.; Choi, I-G. Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**. 35, p. 1833-1840, 2010.

Krause, D.O.; Denman, S.T., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiol.**, 27, p. 663–693, 2003.

Krishnan, C.; Lda, S.; Jin, M.; Chang, L.; Dale, B. E.; Balan, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol, *Biotechnol and Bioeng*, 107, p. 441–450, 2010.

Kristensen, J. B.; Thygesen, L. G.; Felby, C.; Jorgensen, H.; Elder, T. Cell-wall structure in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1-9, 2008.

Kumar, P. *et al.* Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 48, p. 3713–3729, 2009.

Kurakake, M.; Kisaka, W.; Komaki, T. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. **Appl. Biochem. Biotechnology**, 90, p. 251-259, 2001.

Lacke, A. H. 1,4- β -D-xylan xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. **Meth Enzymol**, 160, p. 679–684, 1988.

Laser, M.; Schulman, D.; Allen, S. G. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technol**, 81, p. 33-44, 2002.

Lee, J.; Li, P.; Lee, H.; Ryu, H. J.; Oh, K. K. Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, 127, p.119-125, 2013.

Leite, R. S. R.; Alves-Prado, H. F.; Cabral, H.; Pagnocca, F. C.; Gomes, E. Da-Silva, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme Microb Technol**, 43, p.391–395, 2008.

Lemos, J. L. S.; Fontes, M. C.; Pereira Jr., N. Xylanase Production by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation and Influence of , Nitrogen Sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 91-93, 2001.

Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J; Ziegenhagen, D.; Wojtas-Wasilewska, M. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fung. Genet. Biology**, 27, p. 175-185, 1999.

Li, C; Knierim , B; Manisseri , C; Arora , R; Scheller , H. V; Auer, M; Vogel , K; Simmons, B; Singh, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, 101, p. 4900–4906, 2010.

Li, G.; Chen, H. Synergistic mechanism of steam explosion combined with fungal treatment by *Phellinus baumii* for the pretreatment of corn stalk. **Biomass and Bioenergy**, 67, p. 1-7, 2014.

- Li, X., Converse, A. O., Wyman, C. E. *Biotechnol. Appl. Biochem*, p. 107- 515, 2003.
- Liu X. Y.; Huang, H.; Zheng, R. Y. Relationships within *Cunninghamella* based on sequence London. 2001.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E. *Biotechnol. Progr.* p. 15- 777, 1999.
- Maa, H.; Liub, W.; Chenc, X.; Wua, Y. J.; Yua, Z. L. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource Technology*, 100, p. 1279–1284, 2009.
- Maclellan J. Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic biomass. MMG 445 **Basic Biotechnol**, 6, p. 31–5, 2010.
- Maeda, R. N.; Serpa, V. I.; Rocha, V. A. L.; Mesquita, R. A. A.; Anna, L. M. M.; de Castro, A. M.; Driemeier, C. E.; Jr. N. P.; Polikarpov, I. Enzyme hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* celulasas. **Process Biochemistry**, 46, p. 1196-1201, 2011.
- Mark, H.; Meyer, K. H.; Ber. Dtsch. Chem. Ges, 61, 593, 1928.
- Martín, C. *et al.* Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 81, p. 1669–1677, 2006.
- Martin, C.; Galbe, M.; Jonsson, L. J. Comparison of the fermentability hydrolysates of sugar cane bagasse preteated by steam explosion using different impregnation agents. **Appl. Biochem. Biotechnology**, 98, p. 699-716, 2002.
- Maryana, R.; Ma'rifatun, D.; Wheni, A. I.; Satriyo K.W.; Angga, W. R. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**, 47, p. 250 – 254, 2014.
- Maurya, D. P.; Singh, D.; Pratap, D.; Maurya, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal Environ. Biology**, 33, p.5-8, 2012.
- Merino, S. T.; Cherry, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**, 108, p. 95–120, 2007.

McIntosh, S.; Vancov, T. Enhanced enzymes saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. **Bioresour Technol**, 101, p. 6718–27, 2010.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.

Mood, S. H.; Golfeshan, A. H.; Tabatabaei, M.; Salehi Jouzani, G.; Najafi, G. H.; Gholami, M.; Ardjmand, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 27, p. 77–93, 2013.

Moretti, M. M. S.; Bocchini-Martins, D. A.; Da Silva, R.; Rodrigues, A.; Sette, L. D.; Gomes, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, p. 1062–71, 2012.

Moretti, M., M. S.; Bocchini, D. A.; Nunes, C. C. C.; Villena, M. A.; Perrone, O. M.; da Silva, R.; Boscolo, M.; [Gomes, E.](#) Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, 122, p. 189–195, 2014.

Mosier, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, 96, p. 673–686, 2005.

Mothé, C. G.; Miranda, I. C. Characterization of sugarcane and coconut fibers by thermal analysis and FTIR. **Journal Therm Anal Calorim**, 97, p. 661–5, 2009.

Murnen, H. K.; Balan, V.; Chundawat, S. P.; Bals, B.; Sousa, L. C.; Dale, B. E. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus giganteus* to fermentable sugars. **Biotechnol Prog**, 23, p. 846–50, 2007.

Mussatto, S. I.; Teixeira, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: Mendez-Vilas A (editors). **Current research technology and microbial biotechnology**, 2010.

Nallapeta S.; Nigam, V. K.; Survajhala, P.; Mohan, K. Screening and selection of white rot fungi for biological delignification of agricultural residues. **Int J Adv Biotechnol Research**, 3, p. 790–6, 2012.

Narra M.; Dixit, G.; Divecha J.; Madamwar, D.; Amita R. Shah Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, 121, p. 355–361, 2012.

Nelson P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W.F.O. (1983) Fusarium species: an illustrated manual for OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa, **Quim. Nova**, 33, p. 1549-1558, 2010.

Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35, p. 1153-1169, 2000.

Pandey, S.; Shahid, M.; Srivastava, M.; Singh, A.; Sharma, A.; Kumar, V.; Srivastava, Y. K. Effect of Various Physiological Parameters and Different Carbon Sources on Cellulase and Xylanase Induction by Different Strains of *Trichoderma* Species. **Enzyme Engineering**, 3, p.1-5, 2014.

Papinutti, V. L.; Forchiassin, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. **Journal of Food Engineering**, 81, p. 54–59, 2007.

Pedersen, M.; Johansen, K.S.; Meyer, A. S. Low temperature lignocellulose pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw. **Biotechnol. Biofuels**, 4, 11., 2011.

Pereira, J. C.; Leite, R. S. R.; do Prado, H. F. A.; Bocchini Martins, D. A. B.; Gomes, E.; da Silva, R. Production and Characterization of β -glucosidase Obtained by the Solid-State Cultivation of the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl Biochem Biotechnol**, 2014.

Phitsuwana, P.; Sakkab, K.; Ratanakhanokchai, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and bioenergy**, 58, p. 390-405, 2013.

Pointing, S. B.; Jones, E. B. G.; Vrijmoed, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid cultures. **Mycologia**, 92, p. 139–44, 2000.

Polleto, M.; Zattera, A. J.; Santana, R. M. C. Structural Differences Between Wood Species Evidence from Chemical Composition, FTIR Spectroscopy and Thermogravimetric Analysis, 2012.

Qian, X. H. *et al.* A initio molecular dynamics simulations of beta-d-glucose and beta-d-xylose degradation mechanisms in acidic aqueous solution, **Carbohydr. Research**, 340, p. 2319–2327, 2005.

Reddy, G.V.; Ravindra, B. P.; Komaraiah, P.; Roy, K.R.R.M.; Kotharl, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzumes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Proc. Biochem.**, 38, p. 1457-1462, 2003.

Rabelo, S.C.; Amezquita Fonseca, N. A.; Andrade, R. R.; Maciel Filho , R. Costa, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 35, p. 2600- 2607, 2011.

Rabelo, S.C.; Andrade, R. R.; Maciel Filho, R.; Costa, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, 136, p. 349–357, 2014.

Rabelo, S.C.; Filho, R.M.; Costa, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse. **Appl Biochem Biotechnol**, 169, p. 1696–1712, 2013.

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

Ramos, L. P.; da Silva, L.; Ballem, A. C.; Pitarelo, S. P.; Chiarello, L. M.; Silveira, M. H. L. **Bioresource Technology**, 175, p.195-202, 2015.

Ramos, L. P.; Silva, L.; Ballem, A. C.; Pitarelo, A. P.; Chiarello, L. M.; Silveira, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, 175, p. 195-202, 2015.

Redding, A. P.; Wanga, Z.; Keshwanib, D. R.; Chenga, J. I. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysi. **Bioresource Technology**, 102. p. 1415–1424, 2011.

Reese, E. T.; Siu, R. G. H.; Levinson, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivaties and its relationship to the mechanim of cellulose hydolysis. **Journal Bacterioloy**, 59, p. 485-497, 1950.

Rezende, C. A.; de Limam M. A.; Maziero, P.; de Azevedo, E. R.; Garcia, W.; Polikarpov, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, p. 4-54, 2011.

Rodriguez, J.; Durán, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. Brazil. **Journal Med. Biol. Resear**, 21, p. 411-422, 1988.

Rosgaard *et al.*, 2007b; Shoemaker *et al.*, 1983

Rubeena, M.; Neethu, K.; Sajith, S.; Sreedevi, S.; Priji, P.; Unni, K. N.; Sarath Josh, M.K.; Jisha, V.N.; Pradeep, S.; Benjamin, S. Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum* Advances in **Bioscience and Biotechnology**, 4, p. 214-221, 2013.

Sakthiselvan, P.; Naveena, B.; Partha, N. Effect of medium composition and ultrasonication on xylanase production by *Trichoderma harzianum* MTCC 4358 on novel substrate. **African Journal of Biotechnology**, 11, p. 12067-12077, 2012.

Sater, M. A. A.; El-Said, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **Int. Biodeter. Biodegr**, 47, p. 15-21, 2001.

Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, 27, p. 185–194, 2009.

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

Sanseverino, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, 25, p. 660-667, 2002.

Sears, K.D., Beélik, A., Casebier, R.L., Engen, R.J., Hamilton, J.K., Hergert, H.L. Southern pine prehydrolyzates: characterization of polysaccharides and lignin fragments. **Journal Polym Science**, 36, 425-443, 1971.

Silva, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. Trabalho apresentado ao Curso de Tecnologia de Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

Simoës, M. L. G.; Tauk-Tornisielo, S. M.; Tapia, D. M. T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **Afr. Journal Biotechnology**, 8, p. 6317-6326, 2009.

Singh, J.; Suhag, M.; Dhaka, A. Augmented digestion of lignocelulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, 117, p. 624 -631, 2015.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Meth. Enzymol**, 299, p. 152-178, 1999.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP). **NREL**, Golden, Co., USA, 2012. Golden, Co., USA, 2012.

Soares, M. L.; Gouveia, E. R. Influence of the alkaline delignification on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, 147 p. 645–648, 2013.

Sohail M.; Siddiqi, R.; Ahmad, A.; Khan, S. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. **New biotechnol.**, 25, p. 437-441, 2009.

Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. 1995. Biometry: principles and practice of statistics in biological research: (3): 1-887. WH Freeman, New York.

Soliman, H. M.; Abdel-Dayem, A.; Sherief, A.; El-Tanash, A. B. Production of xylanases by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using Some Agriculture Residues. **International Journal of Agricultural Research**, 7, p. 46-57, 2012.

Somogy, N., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19.

Srivastava, L. M. CELL WALL, CELL Division, and Cell Growth. Chapter 2. In: **Plant Growth and Development**, p. 23-74, 2002.

Steffen, K. T.; Hofrichter, M.; Hatakka, A. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. **Enz. Microb. Technol**, 30, p. 550-555, 2002.

Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technol**, 83, p. 1-11, 2002.

Sunna, A., Antranikian, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Critical **Reviews in Biotechnology**, 17, p. 39-67, 1997.

Tabil, L.; Adapa, P.; Kashaninejad, M. Biomass feedstock pre-processing-Part-1:Pretreatment. In: M.A.D.S. Bernardes, editor. Biofuel's engineering process technology. **InTech**, p. 411–38 (Chapter 18), 2011.

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

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**, 16, p. 1070-73, 1999.

Terri, T. T. Crystalline cellulose degradation: a new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech.**, 15, p. 160-167, 1997.

Tomás-Pejó, E.; Bollesteros, A. M.; Negro, M. J. Pretreatment technologies for lignocelluloses-to-bioethanol conversion. cap. 7 p.149-176, 2010.

Torres, E.; Bustos-Jaimes, I.; Le Borges, S. Potencial use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Appl. Catal. Environ**, 46, p. 1-15, 2003.

Travaini, R.; Otero, M. D. M.; Coca, M.; Da-Silva, R.; Bolado, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, 133, p. 332–339, 2013.

Travaini, R.; Otero, M. D. M.; Coca, M.; Da-Silva, R.; Bolado, S. [Studies on the application of *Myceliophthora thermophila* JCP1-4 cellulases cocktail on sugarcane bagasse pretreated by different methods.](#) **Bioresource Technology**, 133, p. 332-339, 2013.

Ulbricht, R.J.; Sharon, J.; Thomas, J. A review of 5-hydroxymethylfurfura HMF in parental solutions. **Fundam. Appl. Toxicol**, 4, 843-853, 1984.

Van Dyk, J. S.; Pletschke, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, 30, p. 1458-1480, 2012.

Várnai, A.; Siika-Aho, M.; Viikari, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme Microb Technol**, 46, p. 185–193, 2010.

Vijaya C.; Reddy, M. Biodelignification ability of locally available edible mushrooms for the biological treatment of crop residues. **Ind Journal Biotechnol**, 11, p. 191–6, 2012.

Vries, R. P.; Michelsen, B.; Poulsen, C.H.; Kroon, P.A.; Van Den Heuvel, R.H.H., Faulds; C.B., Williamson, G.; Van Den Hombergh, J.P.T.W.; Visser, J. The *faeA* genes from *Aspergillus niger* e *Aspergillus tubigenensis* encod ferrulic acid esterases involved in the degradation of complex cell wall polysaccharides. **Appl. Environ. Microbiol**, 63, p. 4638-4644, 1997.

Wei, H.; Xu, Q.; Taylor, II, L.E.; Baker, J.O.; Tucker, M. P.; Ding, G, S. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 20, p. 330–338, 2009.

Wiseloge, A.; Tyson, J.; Johnsson, D. Em **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**; Wyman, C. E., ed.; Taylor & Francis: Washington, p. 105, 1996.

Wyk, J. P. H. van. **Trends Biotechnol**. p. 19- 172, 2011.

Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. Inhibition of cellulases by phenol. **Enzyme and Microbial Technology**, 46, p.170-176, 2010.

Yang, B.; Boussaid, A.; Mansfield, S. D.; Gregg, D. J.; Saddler, J. N. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 77, p. 678-684, 2002.

Yang, B.; Dai, Z.; Ding, S. Y.; Wyman C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, 2, p. 421–50, 2011.

Yoon, L. W.; Ang, T. N.; Ngoh, G. C.; Chua, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, 67, p. 319-338, 2014.

Yu, Q.; Zhuang, X.; Yuan, Z.; Qi, W.; Wang, W.; Wang, Q.; Tan, X. Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous Ammonia. **Bioresource Technology**, 144, p. 210–215, 2013.

Zar, J. H. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.750p.

Zhang, W.; Yi, Z.; Huang, J.; Li, F.; Hao, B.; Li, M.; Homg, S.; Lv, Y.; Sun, W.; Ragauskas, A.; Hu, F.; Peng, J.; Peng, L. Three lignocelulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. **Bioresource Technology**, 130, p. 30-37, 2013.

Zhang, Y. H. P.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, 24, p. 452-481, 2006.

Zhang, Y. H. P.; Lynd, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, 88, p. 797-824, 2004.

Zhao, X.B., Cheng, K.K., Liu, D.H. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 82, p. 815–827, 2009.

Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Liao, J.; Zhang, Y. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, 40, p. 3082–3086, 2005.

Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Chen, Q.; Wu, G.; Yu, F.; Wang, C.; Jin, S. Microwave-assited Alkali Pretreatment of Straw and its Enzymatic Hydrolysis. **Biosystems Engineering**, 94, p. 437-442, 2006.

Zhu, S.; Li, W.; Zhang, M.; Li, Z.; Wangb, Z.; Jameel, H.; Chang, H. Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. **Bioresource Technology**, 152, p. 364–370, 2014.

APÊNDICE 1

A. Resultados de *B-glicosidase*

	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>
Temperatura	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
40°C	79	104	30
45°C	83	170	15
50°C	80	152	12
55°C	60	75	0
60°C	15	32	0
pH	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
4.5	37	112	25
5.0	37	120	22
5.5	42	114	9
6.0	33	78	0
6.0	12	43	0

B.Resultados de Endoglucanase (CMCase)

	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>
Temperatura	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
40°C	84	95	71
45°C	55	105	64
50°C	55	79	57
55°C	36	63	55
60°C	26	56	46
pH	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
4.5	81	158	86
5.0	129	100	78
5.5	126	100	85
6.0	65	84	71
6.0	53	72	62

C. Resultados de Xilanase

	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>
Temperatura	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
40°C	79	18	7
45°C	61	13	9
50°C	7	8	7
55°C	7	6	6
60°C	8	5	6
pH	Atividade Residual %	Atividade Residual %	Atividade Residual %
4.5	36	12	6
5.0	61	14	3
5.5	63	10	4
6.0	57	9	2
6.0	52	4	2

Tabela 13. Carboidratos liberados por hidrólise enzimática do material tratado e não tratado, utilizando os preparados enzimáticos das espécies de *Trichoderma* e enzima comercial.

CARBOIDRATOS %										
	Glicose (mg/ml)	% Hidrolise Celulose	Xilose (mg/ml)	Arabinose (mg/ml)	% Hidrolise Hemicelulose	Glicose (mg/ml)	% Hidrólise Celulose	Xilose (mg/ml)	Arabinose (mg/ml)	% Hidrólise Hemicelilose
Tratamento	Enzimas de <i>T. virens</i>					Enzimas de <i>T. harzianum</i>				
H ₃ PO ₄	1.0	24	0.8	0.5	27	0.85	18	0.4	0.1	12
NaOH	1.2	25	1.0	0.4	30	0.10	1	1.0	0.1	25
Glycerol	1.0	21	0.4	0.3	16	0.51	11	0.3	0.07	7
Water	0.9	18	0.5	0.4	20	0.42	9	0.3	0.08	7
Controle	1.0	18	0.6	0.4	21	0.40	9	0.5	0.1	8
	Enzimas de <i>T. asperelloides</i>					Enzima Comercial (Celluclast)				
H ₃ PO ₄	0.5	11	0.008	0.002	0.2	1.3	28	0.4	0.23	12
NaOH	0.8	18	0.01	0.003	0.4	1.8	38	0.3	0.78	23
Glycerol	0.7	15	0.004	0.001	0.1	1.2	24	0	0.24	4
Water	0.4	8	0.004	0.001	0.1	1.1	23	0	0.24	4
Control	0.5	9	0.005	0.001	0.1	1.0	21	0	0.26	5

