
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA
APLICADA)**

**EXTRAÇÃO DE XILANA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
MICROBIOLOGICAMENTE PRÉ-TRATADO**

JEFFERSON POLES FELIPUCI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro - 2020

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA
APLICADA)**

**EXTRAÇÃO DE XILANA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
MICROBIOLOGICAMENTE PRÉ-TRATADO**

JEFFERSON POLES FELIPUCI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Coorientadora: Profa. Dra. Derlene
Attili de Angelis

Rio Claro - 2020

F315e Felipuci, Jefferson Poles
Extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar
microbiologicamente pré-tratado / Jefferson Poles Felipuci. --
Rio Claro, 2020
66 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Michel Brienzo
Coorientadora: Derlene Attili de Angelis

1. Micro-organismos. 2. Cana-de-açúcar. 3. Hemicelulose. 4.
Microbiologia. 5. Fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESLIGNIFICAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULOSICA POR MICRO-ORGANISMOS E EXTRAÇÃO XILANA

AUTOR: JEFFERSON POLES FELIPUCI

ORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

COORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

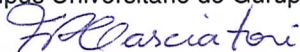
A handwritten signature in blue ink, reading "M. Brienzo".

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia do Câmpus de Rio Claro - UNESP

Prof. Dr. EZEQUIEL MARCELINO DA SILVA

Campus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins

A handwritten signature in blue ink, reading "F. Casciadori".

Profa. Dra. FERNANDA PERPETUA CASCIATORI

Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 20 de fevereiro de 2020

Título alterado para: "Extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar microbiologicamente pré-tratado"

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sônia e Jair, pelo apoio e amor,

À minha namorada Mayara Mulato dos Santos, por sempre estar ao meu lado,

Aos meus orientadores Michel Brienzo e Derlene Attili de Angelis, pelos ensinamentos e paciência,

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto proveniente da moagem do colmo para extração de caldo de sacarose. Suas principais aplicações são na área energética, mas pode ser reaproveitado na geração de produtos de maior valor agregado. Para isto, a separação de suas macromoléculas é um passo fundamental no processo, visto que os métodos empregados industrialmente utilizam grandes cargas de reagentes químicos ou demandam muita energia. Micro-organismos são uma alternativa a estes métodos, suas capacidades naturais de degradação são uma opção para reduzir o custo destes processos e diminuir a quantidade de reagentes químicos. A combinação do pré-tratamento biológico com o químico é uma alternativa para aumentar o rendimento na extração dos componentes da biomassa e reduzir custos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo aplicar o tratamento microbiológico previamente ao tratamento químico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar, a fim de avaliar o grau de deslignificação do material e, com isso, verificar este efeito no processo de extração de xilana utilizando menor carga de reagente químico, bem como avaliar a digestibilidade enzimática do material pré-tratado. Os fungos *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Aspergillus fumigatus* e *Pleurotus ostreatus* foram cultivados até cinco meses em sacos de polipropileno contendo 250 g de bagaço de cana-de-açúcar a 75 % de umidade. O material parcialmente deslignificado foi submetido à caracterização química e à extração de xilana com peróxido de hidrogênio (3 %). Após o tratamento microbiológico foi feita a hidrólise enzimática do material para verificar a conversão de celulose em glicose. A caracterização química apontou aumento percentual no teor de lignina nos materiais para todas as amostras, ao mesmo tempo que diminuiu a porcentagem de celulose e hemicelulose. Apenas o experimento referente à *A. fumigatus* não atingiu resultado superior a extração de xilana do bagaço in natura, com porcentagem média de extração igual a 30,31 %. Por outro lado, a porcentagem de extração referente à *G. trabeum* e *C. puteana* foram superiores a extração de xilana do bagaço in natura, chegando a 99,74 %. Os resultados referentes à conversão da celulose em glicose mostraram que o melhor período de tratamento foi de um mês, com 65 % conversão. O trabalho constatou que, embora os micro-organismos tenham consumido parte da xilana do material, houve modificação na estrutura lignocelulósica, facilitando a extração da xilana residual e melhorou a digestibilidade enzimática da celulose.

Palavras-chave: xilana, micro-organismos, pré-tratamento microbiológico, recalcitrância e bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is a by-product acquired from milling the stalk for saccharose broth extraction. Its main applications are not only in the energy area, but also in the generation of higher added value products. For this, the separation of its macromolecules is a fundamental step in the process, provided that the methods employed industrially use large loads of chemical reagents or demand a lot of energy. As an alternative to those methods, microorganisms present natural degradation capabilities which might cheapen such procedures and reduce the amount of chemical reagents. Thus, the combination of biological pretreatment and chemical pretreatment is an option to increase the extraction yield of biomass components and reduce costs. In this context, this work aimed to apply the microbiological treatment prior to the chemical one in the decomposition of sugarcane bagasse, in order to evaluate the degree of delignification of the material and, thereby, verify the effect in the xylan extraction process while applying lower chemical reagents loading, as well as evaluating enzymatic digestibility of pretreated material. The fungi *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Aspergillus fumigatus* and *Pleurotus ostreatus* were grown for up to five months in polypropylene bags containing 250 g of sugarcane bagasse at 75 % of humidity. The partially delignified material was subjected to chemical characterization and xylan extraction with hydrogen peroxide (3%). Following the microbiological treatment, enzymatic hydrolysis of the material was performed to verify the cellulose conversion to glucose. The chemical characterization presented a percentage increase in the lignin content in the materials for all samples, whereas the percentage of cellulose and hemicellulose decreased. Only the experiment related to *A. fumigatus* did not reach greater result than the *in natura* bagasse xylan extraction, with average extraction percentage of 30.31%. On the other hand, the xylan extraction percentage for *G. trabeum* and *C. puteana* were higher than the *in natura* bagasse value, which reached 99.74%. The results regarding the conversion rate of cellulose to glucose reported that the best treatment period was one month, with 65 % conversion. Although the microorganisms consumed part of the material's xylan, this study noted a change in the lignocellulosic structure, facilitating residual xylan extraction and improving enzymatic digestibility of cellulose.

Key words: xylan, micro-organism, microbiological pretreatment, recalcitrance and sugarcane bagasse.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Biomassa lignocelulósica e bagaço de cana-de-açúcar.....	9
2.1.1 Celulose.....	11
2.1.2 Hemicelulose.....	13
2.1.3 Lignina.....	16
2.2 Micro-organismos degradadores de biomassa.....	18
2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	21
2.3.1 Pré-tratamento químico.....	24
2.3.2 Pré-tratamento biológico.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Biomassa e pré-tratamento biológico.....	30
4.2 Caracterização química do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado.....	32
4.2.1 Remoção e determinação de extrativos.....	32
4.2.2 Determinação de carboidratos estruturais e lignina.....	32
<u>4.2.2.1 Hidrólise ácida com H₂SO₄.....</u>	<u>32</u>
<u>4.2.2.2 Determinação de lignina solúvel.....</u>	<u>33</u>
<u>4.2.2.3 Determinação de lignina insolúvel.....</u>	<u>34</u>
4.3 Extração de xilana.....	34
4.4 Hidrólise enzimática do material pré-tratado e <i>in natura</i>.....	35
4.5 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Colonização fúngica no bagaço de cana-de-açúcar.....	37
5.2 Caracterização química do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado.....	39
5.2.1 Determinação de extrativos.....	39

5.2.2 Determinação de carboidratos estruturais e lignina.....	39
5.3 Extração de xilana.....	44
5.3.1 Extração da xilana em massa.....	44
5.3.2 Xilana presente no bagaço após pré-tratamento microbiológico.....	47
5.3.3 Rendimento de extração de xilana em porcentagem.....	50
5.4 Hidrólise enzimática do material pré-tratado e <i>in natura</i>.....	53
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O bagaço de cana-de-açúcar é obtido a partir da moagem da cana para extração do caldo e pode ser destinado para geração de energia elétrica por meio da queima, reutilizado para produzir etanol de segunda geração ou aproveitado na produção de itens de maior valor agregado. No último caso, é importante a separação e remoção das macromoléculas que estão presentes em sua parede celular, isto é, celulose, hemicelulose e lignina. Um dos principais polissacarídeos do bagaço é a xilana, um tipo de hemicelulose. Esta macromolécula, quando isolada dos demais componentes da parede celular, tem aplicação para diversos fins industriais, como aditivo na produção de papel, na área farmacêutica, dentre outros.

A extração de xilana da biomassa da cana-de-açúcar pode ser realizada por métodos variados, no entanto estes resultam em impurezas e consomem grande quantidade de reagentes químicos. A estrutura recalcitrante da parede celular vegetal, a interação com a lignina e constituintes químicos dificultam os processos de separação da hemicelulose. Isto posto, tratamentos em meios alcalinos são utilizados para separar as macromoléculas da biomassa. Tais tratamentos são frequentemente selecionados para a extração de xilana na forma macromolecular, contudo observa-se que uma parte da lignina é extraída junto à hemicelulose. Dependendo do uso pretendido para esta xilana, é interessante que não haja resíduos de lignina, uma vez que isto pode interferir na qualidade do produto final. Um exemplo disto é o papel, o qual é composto majoritariamente por celulose e, caso apresente uma quantidade significativa de lignina, ficará mais amarelado e mais suscetível a rasgos.

A aplicação de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio quebra as ligações entre celulose e hemicelulose, enquanto a lignina é separada num processo posterior com lavagem em etanol. Nestes processos podem haver resíduos de lignina na hemicelulose extraída, bem como de reagentes químicos usados no procedimento. Uma alternativa a tratamentos químicos e físicos para a separação da hemicelulose da biomassa lignocelulósica é o uso de tratamentos biológicos. Existem espécies de fungos filamentosos reconhecidamente degradadores de lignina, que podem ser uma alternativa não somente ao tratamento alcalino, no qual parte da lignina é solubilizada, mas também a outros que não atingem o grau de pureza do produto desejado.

A capacidade de degradar a lignina por meio de ações enzimáticas específicas, como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), justifica o crescente interesse pelo uso de espécies fúngicas em estudos dessa natureza. Contudo, a grande complexidade molecular da lignina a torna quase sempre uma segunda opção para os fungos, atrás da hemicelulose e celulose. Isso significa que, apesar de determinados fungos consumirem a lignina do material, geralmente os outros componentes também serão consumidos, em menor ou maior quantidade.

A combinação de tratamento biológico com tratamento químico pode ser uma possibilidade para otimizar a extração de hemicelulose. Considera-se ideal que a extração de xilana seja a mais eficiente possível, ou seja, que haja maior rendimento, menor tempo de extração, com menos resíduos de lignina e produtos de degradação. Por mais que o período de crescimento dos micro-organismos seja um impasse a nível industrial, a modificação estrutural causada na biomassa lignocelulósica torna este método vantajoso ao aumentar o rendimento de extração e utilizar menos reagentes químicos no processo.

Neste estudo, a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada por fungos degradadores de biomassa, a fim de se avaliar a extração de xilana por via química após um tratamento biológico. Desta forma, foi verificada a contribuição da ação de micro-organismos para um processo mais vantajoso de extração de xilana de bagaço de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

Um dos principais tipos de biomassa lignocelulósica utilizados é o gerado da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Além de ser considerada a principal fonte de carboidrato para produção de etanol no Brasil, a estimativa de produção para a safra de cana-de-açúcar 2019/2020 passa dos 622 milhões de toneladas (FERNANDES *et al.*, 2018; CONAB, 2019). Uma tonelada de cana-de-açúcar gera cerca de 140 quilos de bagaço (massa seca), o qual é o resíduo restante após a moagem do colmo para extração do caldo. Este bagaço é composto por 25-45 % de celulose, 28-32 % de hemicelulose e 15-25 % de lignina. Em menor proporção aparecem os extrativos (até 10 %) e cinzas (2,3 %) (NAIDU *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2004). Atualmente, a principal destinação do bagaço é a produção de energia térmica e elétrica por meio de sua combustão nas caldeiras de alta pressão em usinas (FERNANDES *et al.*, 2018). Outra aplicação é utilizá-lo para obtenção de etanol de segunda geração, servindo como alternativa aos combustíveis fósseis, petróleo e carvão vegetal.

A biomassa lignocelulósica abrange toda matéria orgânica diretamente de fontes vegetais. É a maior fonte de carboidratos na natureza, com grande abundância, disponibilidade e variedade, envolvendo madeiras, plantas, resíduos agroindustriais e resíduos municipais. O que chama a atenção para estes materiais é o fato de serem recursos renováveis com potencial energético. Isto os faz possíveis substitutos para os combustíveis fósseis, gerando energia sustentável por meio do etanol e da co-geração de energia elétrica (queima do bagaço) (WYMAN, 1994; NANDA *et al.*, 2015). Consequentemente, o interesse pela pesquisa, tanto na área acadêmica quanto na industrial, cresce a cada ano (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; CANILHA *et al.*, 2013; BILGILI *et al.*, 2016; MAO *et al.*, 2015; ASLAN, 2016; TOKLU, 2017; SHARMA; XU; QUIN, 2019).

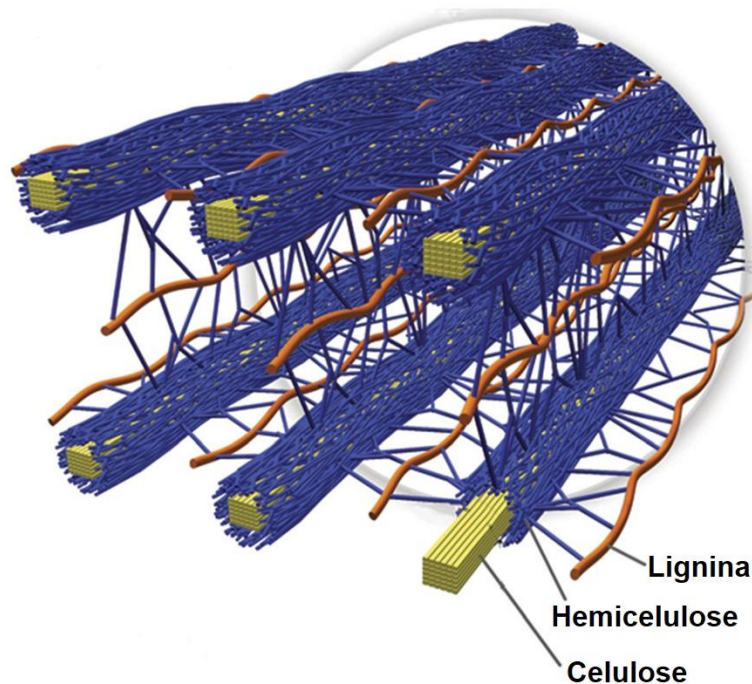
Além da aplicação na área de energia, a biomassa lignocelulósica também é utilizada na produção de papel, roupas, pele artificial, e outros produtos de uso comum (KIM, *et al.*, 2010; MIZUHASHI, *et al.*, 2015; MELANDRI, *et al.*, 2006; FERREIRA, *et*

al., 2009; KIM, *et al.*, 2014). Mais especificamente, na área da conversão de biomassa e biotecnologia, é possível produzir briquetes, adsorventes de carbono e biofilmes (MYERS; HOOD, 2010; EFFENDI; GERHAUSER; BRIDGWATER, 2008; SAVOSA, *et al.*, 2001; WAHAB, *et al.*, 2014). A produção destes itens depende do tratamento ao qual a biomassa será submetida. Para a separação de cada macromolécula, há um ou uma série de tratamentos para se basear.

A biomassa lignocelulósica tem como principal característica a parede celular, presente em todas as formas vegetais. Sua composição é principalmente celulose, seguida por hemicelulose e lignina, e a quantidade de cada componente pode variar de acordo com a biomassa, localização geográfica, tipo de solo, entre outros fatores (DE VASCONCELOS, 2015). Além destes três compostos, encontram-se também pectinas, proteínas e extrativos (NAIDU *et al.*, 2018; LEE, J., 1997). Os três principais componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina) são rearranjados de forma organizada e com alta recalcitrância, dificultando a separação entre eles num processo biotecnológico. A hemicelulose se liga fortemente à celulose por meio de pontes de hidrogênio, podendo estar localizada, inclusive, entre as fibras de celulose (KEEGSTRA, 2010; BUSSE-WICHER, 2016), enquanto a lignina se liga aos carboidratos formando uma complexa rede de interação (GRABBER; RALPH; HATFIELD, 2002) (Figura 1).

Sua alta recalcitrância é um desafio na busca por melhores métodos de separação das macromoléculas. Com isso, tem se desenvolvido diferentes métodos de pré-tratamentos, visando contornar esse problema e, posteriormente, separar seus componentes. Uma solução seria deslignificar a biomassa, ou seja, diminuir o teor de lignina, que têm se mostrado uma barreira na extração dos carboidratos (NOVO *et al.*, 2011; KARP *et al.*, 2013).

Figura 1 – Interação entre os principais componentes da parede celular vegetal.



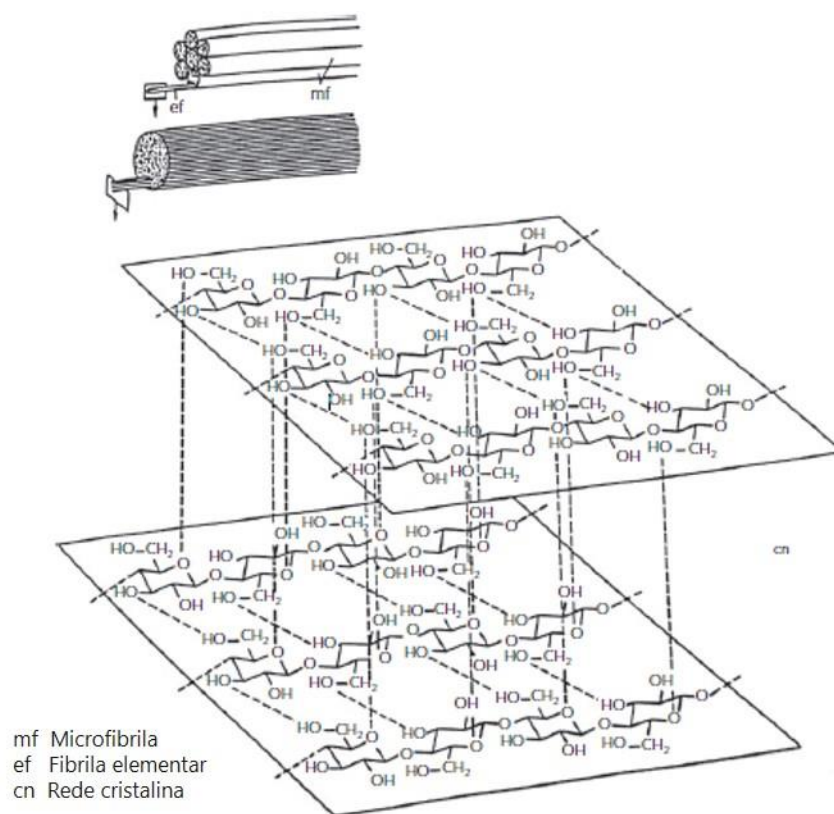
Fonte: adaptado de BRANDT *et al.*, 2013.

2.1.1 Celulose

A celulose é o polímero orgânico mais abundante do planeta, sendo a principal molécula na parede celular das plantas. A quantidade deste polissacarídeo varia entre as diferentes biomassas: tostas de arroz possuem 28,7 a 34,7 %; o algodão possui em torno de 95 % e o bagaço de cana-de-açúcar possui de 25 a 45 % de celulose (NAIDU *et al.*, 2018; KLEMM; SCHMAUDER; HEINZE, 2005). A celulose é composta por cadeias lineares de moléculas de celobiose (dímeros de glicose) unidas por ligações β -1,4 (Figura 2), que também são responsáveis por sua cristalinidade. Há também regiões não cristalinas, chamadas de regiões amorfas (FENGEL; WEGENER, 1984; SANTOS *et al.*, 2012; IOELOVICH, 2016).

A celulose é bastante visada na indústria como matéria prima de produtos de uso comum, como papel, verniz, filmes, entre outros (KIM, *et al.*, 2010; ILEKTI; MONDET; TOURNILHAC, 2005; DONG, 2013), por isso seu isolamento é bastante estudado. As ligações glicosídicas β -1,4 podem ser quebradas por um tratamento ácido, ou separadas dos demais carboidratos por um tratamento alcalino, no qual ocorre também a quebra de éster, resultando em uma modificação estrutural da parede e facilitando a separação dos polissacarídeos (GALLETI; ANTONETTI, 2012).

Figura 2 – Modelo de estrutura molecular e fibrilar da celulose.



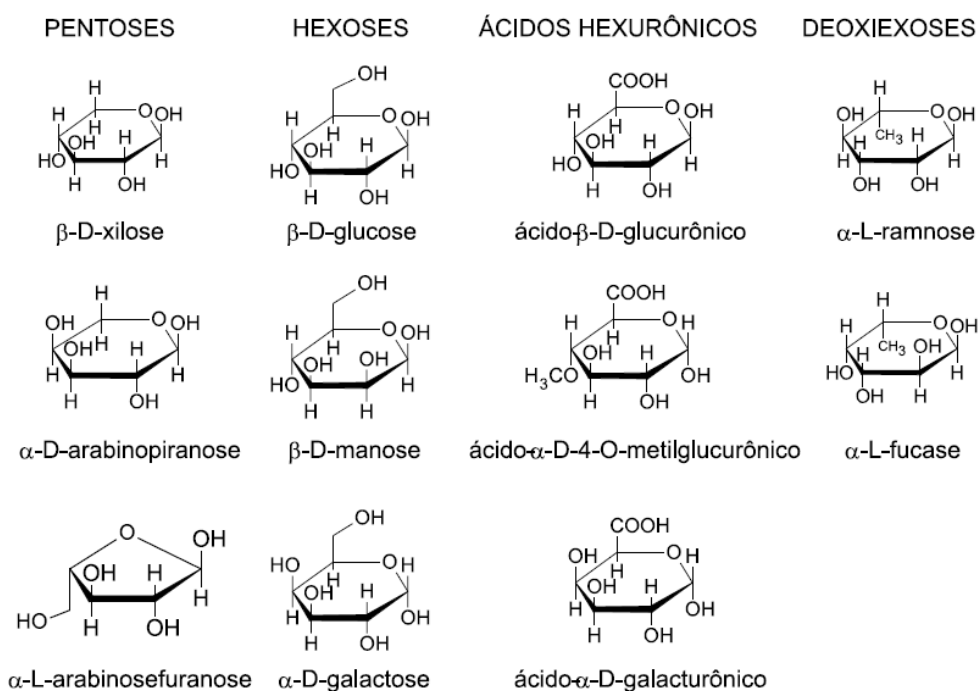
Estrutura molecular de microfibrila de celulose, sendo (mf) microfibrila, (ef) fibrila elementar e (cn) rede cristalina.

Fonte: adaptado de XU, 2010.

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo composto por diferentes tipos de monossacarídeos entre 80-200 unidades, podendo ser pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônicos (ácidos glucurônico e galacturônico) ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4 (TIMELL, 1964; SANTOS *et al.*, 2012) (Figura 3). Possui menor grau de polimerização que a celulose e característica amorfa (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 1999; SAHA *et al.*, 2003). A hemicelulose corresponde a um terço de todo o carbono renovável da Terra e compõe de 15 a 35% da biomassa lignocelulósica (LIMAYEM; RICKE, 2012; BIELY, 1985). Na parede celular das plantas, este composto está relacionado à integridade e tem grande importância em seu formato e resistência (COSGROVE, 2005).

Figura 3 – Monossacarídeos da hemicelulose.



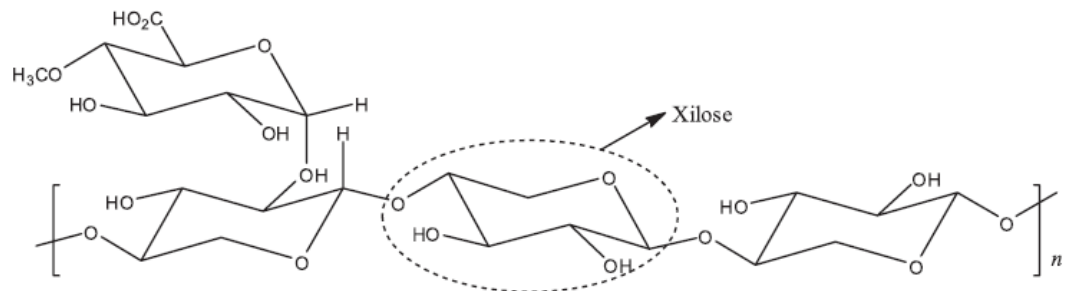
Estrutura molecular dos monossacarídeos que compõem a hemicelulose.

Fonte: retirado de MORAIS; NASCIMENTO; MELO 2005.

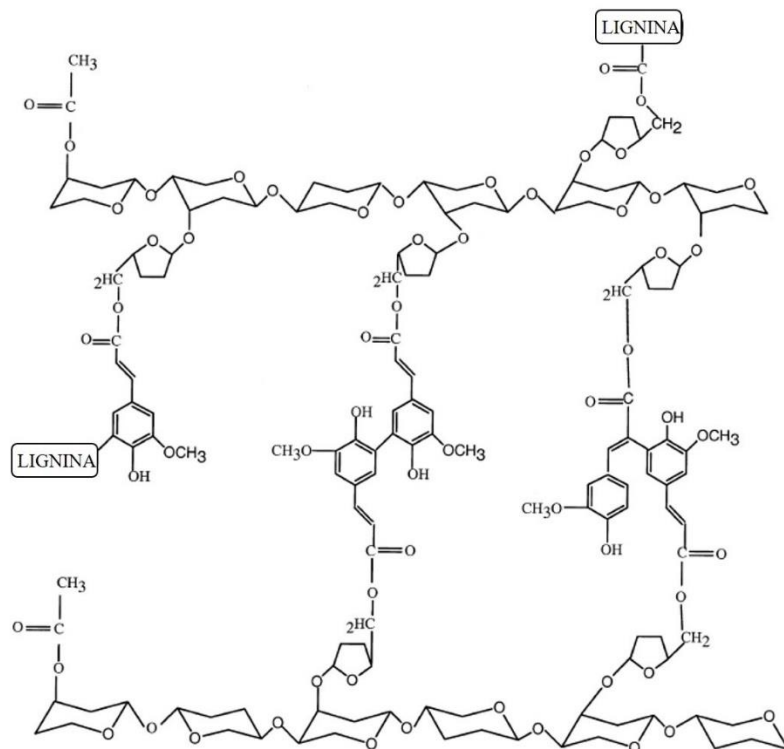
As hemiceluloses podem ser também subdivididas em três grupos principais: mananas, xiloglicanas e xilanas (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). As mananas são formadas por subunidades de manose e podem ser encontradas no endosperma de plantas como a noz e leguminosas (PETKOWICZ *et al.*, 2001). A xiloglicana é encontrada nas paredes primárias de plantas superiores, possui comprimento de 0,15 – 1,5 μm com unidades ligadas por ligações β -1,4 (FRY, 1988).

A xilana é a hemicelulose mais abundante no mundo e é a principal hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar. Compõe cerca de 28-32 % do material (NAIDU *et al.*, 2018) e são formadas por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas em sua cadeia principal, podendo ter variação em sua estrutura de acordo com o tecido em que estão localizadas (Figura 4). As xilanas são consideradas homopolissacarídeos de cadeia linear, sendo sintetizadas no complexo de Golgi por proteínas de membrana tipo II. Sua síntese ocorre principalmente para regulação da parede celular da planta, todavia ainda há dúvidas sobre o papel de determinadas enzimas em sua produção (SILVA *et al.*, 1999, RENNIE; SCHELLER, 2014; SANTOS *et al.*, 2012; COSGROVE, 2005). Na parede celular, a xilana localiza-se ao redor das fibras de celulose e liga-se à lignina por ligações éster e éter, desempenhando papel fundamental na arquitetura da parede celular (Figura 5).

Industrialmente, as xilanas são aproveitadas na produção de papel, na área farmacêutica, como agente microbiano, entre outros (PETZOLD-WELCKE *et al.*, 2012). A partir da hidrólise da hemicelulose e obtenção dos seus monômeros, podem ser produzidos diversos produtos, entre eles: xilitol, butanodiol, diversos biopolímeros e emulsificantes (CANILHA *et al.*, 2013). A xilana apresenta interesse na forma hidrolisada como xilose para processos fermentativos, e na forma de oligômeros (xilo-oligossacarídeos), os quais apresentam efeito prebiótico (DE FREITAS *et al.*, 2019).

Figura 4 – Estrutura da xilana.

Fonte: SANTOS *et al.*, 2012

Figura 5 – Associação da xilana com a lignina.

Estrutura de xilana com indicação do local onde a associação com a lignina ocorre.

Fonte: adaptado de MATHEW; ABRAHAM, 2004.

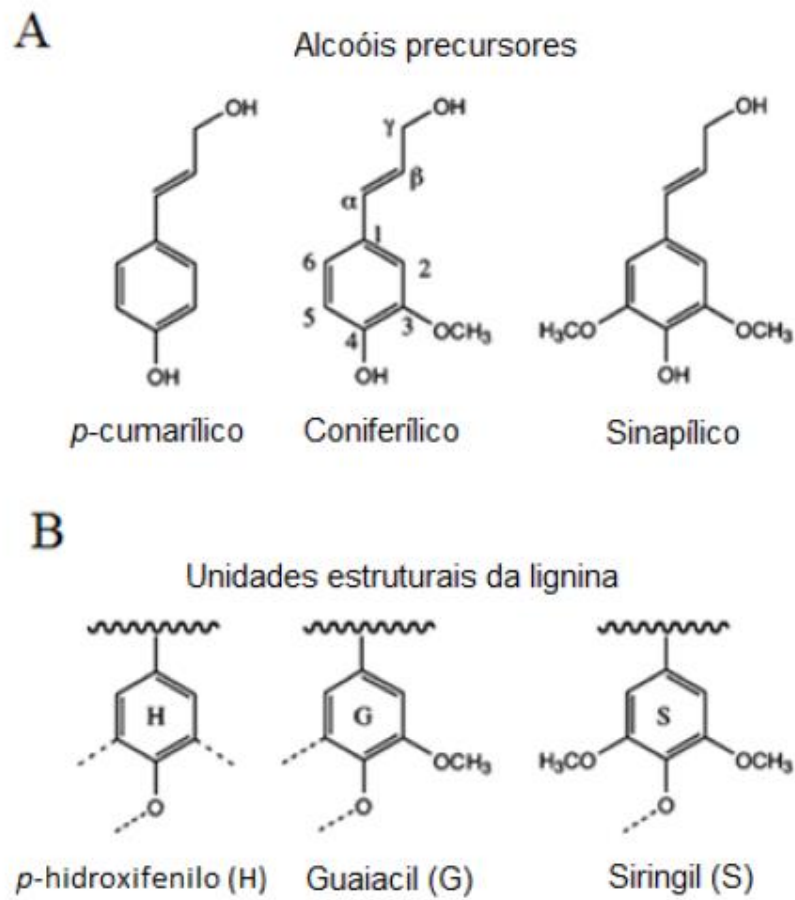
2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula que possui estrutura polifenólica e é composta por unidades de fenilpropano: guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H) ligadas de forma irregular e tendo sua estrutura amorfa (FENGEL; WEGENER, 1984) (Figura 6). Nas plantas do tipo gramíneas, na qual se encontra a cana-de-açúcar, a lignina é do tipo G-S-H (guaiacila-siringila-p-hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006).

A lignina, dependendo da espécie, compreende cerca de 10 a 20 % da biomassa lignocelulósica (LIMAYEM; RICKE, 2012), sendo a terceira macromolécula mais abundante. Para as plantas, a lignina auxilia na proteção contra insetos e fungos, além de contribuir no desenvolvimento e na força mecânica (VANHOLME *et al.*, 2010). Está disposta principalmente na parede secundária, tornando-a rígida e impermeável. Sua biossíntese pode ser iniciada por múltiplos motivos, tanto bióticos quanto abióticos, como infecção, estresse metabólico e perturbações na estrutura da parede celular (TRONCHET *et al.*, 2010).

A formação de ligações ésteres é bastante comum na madeira dura, podendo ser uma resposta às baixas possibilidades de formação de ligações glicosídicas e éter por acetilação. Sendo assim, a acetilação pode servir como regulador do tipo e frequência das ligações entre lignina e carboidrato (GIUMMARELLA; LAWOKO, 2016) (Figura 7). Devido ao grande número de possibilidades de ligações entre as unidades formadoras da lignina, sua estrutura irregular e sua tendência em se ligar com a hemicelulose, há uma baixa probabilidade de existir duas moléculas de ligninas iguais (RALPH, *et al.*, 2004). Este grande número de possibilidades é um dos motivos pelo qual a lignina é conhecida por aumentar a recalcitrância de sua biomassa. Em laboratório, na separação das macromoléculas, a lignina é um obstáculo na separação dos carboidratos.

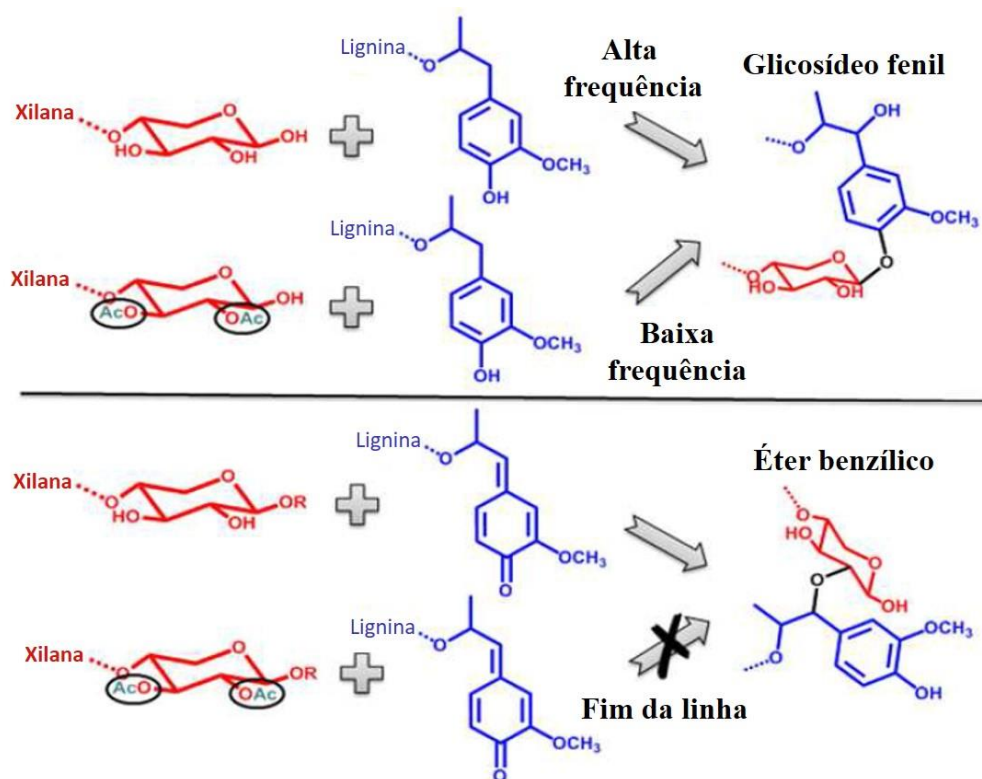
Figura 6 – Esquema das subunidades da lignina.



Subunidades da lignina, onde (A) estão álcoois precursores e (B) unidades estruturais da lignina.

Fonte: adaptado de WONG, 2009 e COELHO, 2019.

Figura 7 – Ligação entre lignina e xilana formando diferentes combinações de moléculas.



Ligação entre xilana e lignina resultando em glicosídeo fenil e éter benzílico. (AC): grupo acetil.

Fonte: adaptado de GIUMMARELLA; LAWOKO, 2016.

2.2 Micro-organismos degradadores de biomassa

Os micro-organismos participam dos principais ciclos biogeoquímicos, reciclando a maior parte das moléculas da biosfera. Deste modo, a atividade metabólica microbiana é a mais apta em biodegradar moléculas xenobióticas, isto é, compostos químicos estranhos ao ambiente natural e ao organismo humano (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Estudos sobre degradação de compostos químicos apresentam diversos micro-organismos versáteis no catabolismo de moléculas recalcitrantes, como bactérias, fungos ou plantas (PEREIRA; FREITAS, 2012). Ao contribuírem com a degradação da biomassa vegetal morta, auxiliam na ciclagem de nutrientes e fertilização dos solos e mostram-se uma importante fonte para aplicação na biotecnologia (SANTOS, 2003).

A eficiência da degradação por estes micro-organismos depende, em muitos casos, da estrutura química da molécula e da presença de enzimas eficientes em degradar o composto, as quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos (MEYER, 1978; PEREIRA; FREITAS, 2012; GAYLARD; BELLINASO; MANFIO, 2005). A estrutura química influencia a metabolização por micro-organismos, especialmente no que diz respeito às taxas e à extensão da biodegradação. No caso de enzimas catabolizantes que possuem baixa especificidade pelo seu substrato, os xenobióticos com estrutura química semelhante aos compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sistema ativo da enzima e, conseqüentemente, aproveitados pelo micro-organismo como fonte de nutrientes e energia (PEREIRA; FREITAS, 2012; GAYLARD; BELLINASO; MANFIO, 2005).

Os fungos apresentam características interessantes para aplicação em biodegradação, entre elas está sua capacidade de crescer sob condições de estresse ambiental, e seu modo de crescimento, o qual é induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico. O alongamento e ramificação das hifas permitem a colonização de grandes áreas e o desenvolvimento do sistema de biodegradação fúngico. Isto otimiza o contato superficial com o xenobiótico e, assim, sua biodegradação (CHANDER; ARORA; BATH, 2004; PEREIRA; FREITAS, 2012). As hifas também penetram em tecidos vegetais com maior facilidade do que bactérias e protozoários, garantindo acesso a um conteúdo celular indisponível para outros micro-organismos do mesmo ambiente (SANTOS, 2003). Finalmente, boa parte de suas enzimas são extracelulares (WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993).

Fungos decompositores têm sido aplicados em bioprocessamento de material vegetal ao converterem a biomassa em produtos de alto valor comercial para a indústria alimentícia, farmacêutica, petrolífera (combustíveis), entre outras. Além de melhorar a qualidade destes produtos, são capazes de reduzir os custos dos processos de produção e torná-los menos agressivos ao meio ambiente (SANTOS, 2003).

Os fungos decompositores produzem celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, empregadas na hidrólise da parede vegetal (SZAKACS; TENGEDY, 1997). Os fungos da podridão branca, por exemplo, são degradadores naturais de lignina, celulose e hemicelulose. De acordo com Santos (2003), estes fungos de decomposição branca formam um grupo heterogêneo entre os basidiomicetos

caracterizados pela sua capacidade de degradar todos os componentes da parede celular, inclusive a lignina. A degradação preferencial de lignina resulta em maior quantidade de celulose, concedendo uma cor esbranquiçada ao produto. As hifas colonizam o lúmen celular e causam erosão da parede, gerando vazios que são preenchidos com micélio.

A decomposição por fungos pode ser classificada com base na razão holocelulose/lignina do decomposto: a) Classe 1, com razão inferior a um (corresponde aos agentes de decomposição parda); b) Classe 2, cujo processo apresenta baixa quantidade de lignina residual; c) Classe 3, na qual o conteúdo de holocelulose equivale de duas a cinco vezes ao de lignina. Ambas as classes 2 e 3 correspondem a agentes de decomposição branca (TROJANOWSKI, 2001).

Coniophora puteana é um fungo bastante utilizado em trabalhos com biomassa na degradação de madeira e produção de enzimas. Este micro-organismo tem se mostrado eficiente na degradação de hemicelulose e modificação da estrutura da celulose e lignina, o que pode auxiliar em processos de extração dos açúcares. Tem se observado que *C. puteana* tem preferência por polímeros associados a regiões menos cristalinas na parede celular (LEE *et al.*, 2004; IRBE *et al.*, 2006; IRBE *et al.*, 2014; PAPADOPOULOS; HILL, 2002).

Outro micro-organismo conhecido por degradar estruturas lignocelulósicas é o *Pleurotus ostreatus*, principalmente lignina. Este fungo está dentro do grupo dos fungos de podridão branca, sendo um dos mais conhecidos, ao lado de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium*. Além da lignina, foi observado também a degradação dos polissacarídeos por parte do *P. ostreatus*, porém em menor grau. Isto é vantajoso quando se trabalha com solubilização destas macromoléculas (KARP *et al.*, 2013; TANIGUCHI *et al.*, 2005).

Gloeophyllum trabeum é um fungo de podridão parda comum em estudos sobre degradação de polissacarídeos. Sua eficiência em degradar a xilana é bastante estudada e tem mostrado bons resultados. Alguns trabalhos mostram que este fungo, ao promover a remoção parcial da xilana, possibilita a acessibilidade à celulose, o que o torna uma ótima ferramenta na extração de celulose. Além disso, foi observado que *G. trabeum* utiliza ciclos de redução de quinona como componente chave na

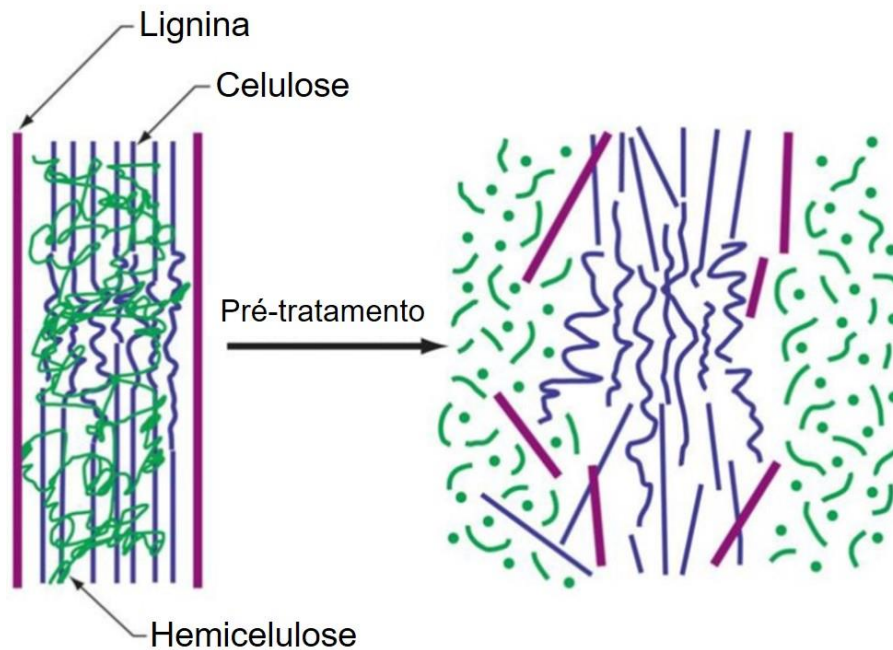
biodegradação (KEREM; JENSEM; RAMMEL, 1999; FILLEY *et al.*, 2002; GAO; MORI; KONDO, 2012)

Diferente dos demais fungos citados, *Aspergillus fumigatus* é um fungo do filo Ascomycota, e é de interesse médico por sua patogenicidade: é comum infectar as vias respiratórias de mamíferos com baixa imunidade. Por este motivo, grande parte de seus estudos se limita apenas na produção de enzimas, e não em tratamentos biológicos com biomassa. Estes estudos têm mostrado que *A. fumigatus* tem grande potencial de produzir celulases, e outras espécies de *Aspergillus* tem potencial de produzir diversos tipos de xilanases. Por este motivo, é interessante aplicar este micro-organismo em uma biomassa lignocelulósica para analisar seus efeitos na degradação de suas macromoléculas (XIMENES; FELIX; ULHOA, 1996; CLEVELAND *et al.*, 2009; SHARMA; XU; QIN, 2019).

2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A recalcitrância de uma biomassa lignocelulósica é característica da organização dos componentes da sua parede celular. A quantidade de lignina, hemicelulose e cristalinidade da cadeia de celulose são algumas características que mudam o nível de recalcitrância de uma biomassa (HIMMEL *et al.*, 2007; ISHIZAWA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2010). Um pré-tratamento é a modificação ou quebra desta estrutura lignocelulósica (Figura 8), tendo como requisitos 1: melhorar a formação de açúcares fermentáveis ou a capacidade de formação de açúcares fermentáveis por hidrólise; 2: evitar a perda de carboidratos; 3: evitar a formação de subprodutos que possam inibir os processos subsequentes e 4: ter um bom custo-benefício (KUMAR *et al.*, 2009).

Figura 8 – Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: adaptado de MOSIER *et al.*, 2005.

Há pré-tratamentos químicos, físicos, físico-químicos e biológicos. Cada metodologia visa causar efeitos diferentes na biomassa, por isso é necessário conhecer a biomassa estudada e também o pré-tratamento escolhido. Não há um pré-tratamento universal, e todos possuem vantagens e desvantagens (Tabela 1). Os pré-tratamentos químicos utilizam reagentes químicos para fazer a quebra do material, podendo citar o ácido e alcalino; do tratamento físico a moagem; do tratamento físico-químico a explosão a vapor; e de tratamento biológico a cultura de micro-organismos.

Tabela 1 – Tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento	Modificação na biomassa lignocelulósica	Vantagens	Desvantagens
Hidrotérmico	Solubilização da hemicelulose	- Elevada recuperação dos açúcares - Baixa formação de inibidores - Não necessita de reagentes	- Alta demanda energética - Elevada utilização de água - Baixa concentração de açúcar na fração líquida
Explosão a vapor	Auto-hidrólise da hemicelulose	- Baixo impacto ambiental - Elevada concentração de açúcares - Viável aplicação industrial	- Formação de inibidores - Degradação parcial da hemicelulose e lignina - Elevado custo
AFEX	Redução da cristalinidade da celulose	- Aumento da acessibilidade das enzimas - Baixa formação de compostos inibitórios	- Baixa efetividade para amostras com elevado teor de lignina - Elevado custo com reagentes - Baixa remoção da hemicelulose
Ácido	Solubilização da hemicelulose e lignina	- Aumento da taxa de hidrólise - Elevada concentração de açúcares na fração líquida	- Elevado gasto energético - Necessidade de reatores resistentes a corrosão - Formação de inibidores
Alcalino	Alteração na estrutura da lignina, redução da cristalinidade da celulose e solubilização parcial da hemicelulose	- Remoção eficiente da lignina - Aumento da acessibilidade das enzimas - Redução da polimerização e cristalinidade da celulose	- Elevado custo após o processo - Não é eficiente em escala industrial
Biológico	Degradação da lignina por meio das enzimas secretadas pelos micro-organismos	- Baixo custo - Não utiliza reagentes químicos - Baixo gasto energético - Condições ambientais	- Baixo rendimento em glicose - Necessidade de micro-organismos mais eficientes para a remoção da lignina - Elevado tempo de processo

Tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos, indicando as modificações proporcionadas na biomassa, vantagens e desvantagens.

Fonte: adaptada de COELHO, 2019 e RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017.

Os efeitos causados na parede celular dependem de qual método foi designado para tratar a biomassa. Normalmente, pré-tratamentos alcalinos causam saponificação na estrutura lignocelulósica, separando a lignina da hemicelulose (TARKOW; FEIST, 1969; MOURE *et al.*, 2006). Dependendo da base utilizada, pode haver inchamento da estrutura da celulose, causando danos como diminuição da cristalinidade (WEIL *et al.*, 1994). O tratamento biológico tem como característica degradar algum componente da estrutura lignocelulósica. Fungos de podridão branca tem como característica degradar a lignina do material, enquanto fungos de podridão parda são conhecidos por degradar os polissacarídeos. Estas degradações costumam acompanhar uma modificação na estrutura da parede celular, podendo diminuir a recalcitrância.

É possível também usufruir de combinações: um pré-tratamento biológico reduziria a quantidade de lignina e modificaria a estrutura da biomassa, enquanto um pré-tratamento alcalino na sequência finalizaria a separação da hemicelulose com a lignina. Para um processo de extração de hemicelulose, essa combinação é uma alternativa para reduzir custos, reagentes e produtos (KUMAR *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2014). A escolha de um pré-tratamento deve estar relacionada com o tipo de componente que se deseja isolar e com a composição química do material.

2.3.1 Pré-tratamento químico

Existem diversos tipos de pré-tratamentos químicos, mas os principais são os ácidos e os alcalinos. No primeiro, são manuseados diversos tipos de ácidos orgânicos e inorgânicos, sendo o mais comum o ácido sulfúrico. Suas metodologias podem variar entre concentrações, temperaturas e tempo. Este tipo de tratamento é eficiente na quebra dos polissacarídeos, transformando-os em monômeros que podem ser isolados dos outros compostos da parede celular (ZHENG *et al.*, 2014; WEIL *et al.*, 1994).

Um ácido forte é mais eficiente na hidrólise da celulose, porém é tóxico, corrosivo e de custo elevado. O ácido diluído pode ser utilizado para reduzir custos, já que possui bons resultados pela quantidade de reagente empregado. O ácido

sulfúrico diluído possibilita a hidrólise da hemicelulose em monômeros e furfural (KUMAR *et al.*, 2009).

Diferente do pré-tratamento ácido, o alcalino é mais útil quando o teor de lignina é maior (ZHENG, 2014). Emprega-se uma base para elevar o pH do meio, fazendo com que as ligações éster sofram saponificação, separando a hemicelulose da lignina (TARKOW; FEIST, 1969). Além disso, o uso de bases como NaOH provocam inchaço na estrutura da celulose, aumentando a área de contato, diminuindo a cristalinidade e rompendo a estrutura da lignina (WEIL *et al.*, 1994).

Em um processo de remoção de hemicelulose, por exemplo, utiliza-se peróxido de hidrogênio junto ao hidróxido de sódio para fazer a extração (BRIENZO, 2009). Este tratamento é conhecido como alcalino oxidativo, onde o peróxido de hidrogênio é aplicado junto a uma base. Neste caso, a deslignificação ocorre devido à formação de hidroxila e oxigênio, que iniciam o processo de remoção da lignina. Outra propriedade do peróxido de hidrogênio é a reação com as regiões aromáticas e alifáticas da lignina, o que torna o processo de extração mais eficiente. Ao mesmo tempo que o peróxido de hidrogênio também remove sílica, graxas e participa em processos de branqueamento de polpa, por outro lado, pode formar radicais oxidantes, que pode ocasionar em produtos de degradação (CURRELI *et al.*, 1997; LIU, 2003; KADLA; CHANG, 2001).

2.3.2 Pré-tratamento biológico

Outra maneira de reduzir a recalcitrância, modificar a estrutura lignocelulósica ou separar as macromoléculas é realizando pré-tratamentos biológicos. Este tipo de tratamento é baseado na ação de micro-organismos, os quais produzem enzimas para degradação das macromoléculas e obtenção de energia. Entre as inúmeras enzimas produzidas pelos fungos, as mais estudadas são lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (MESTER; VARELA; TIEN, 2004; PAMIDIPATI; AHMED, 2019). O processo biológico em questão baseia-se em fungos para modificar e/ou degradar um material lignocelulósico, como na redução da cristalinidade da celulose e na remoção de polissacarídeos ou lignina (HATAKKA; HAMMEL, 2011). Os fungos possuem um

arsenal enzimático capaz de degradar todos os componentes da biomassa lignocelulósica, dentre os quais os fungos de podridão branca são conhecidos por degradar a lignina de forma mais eficiente (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

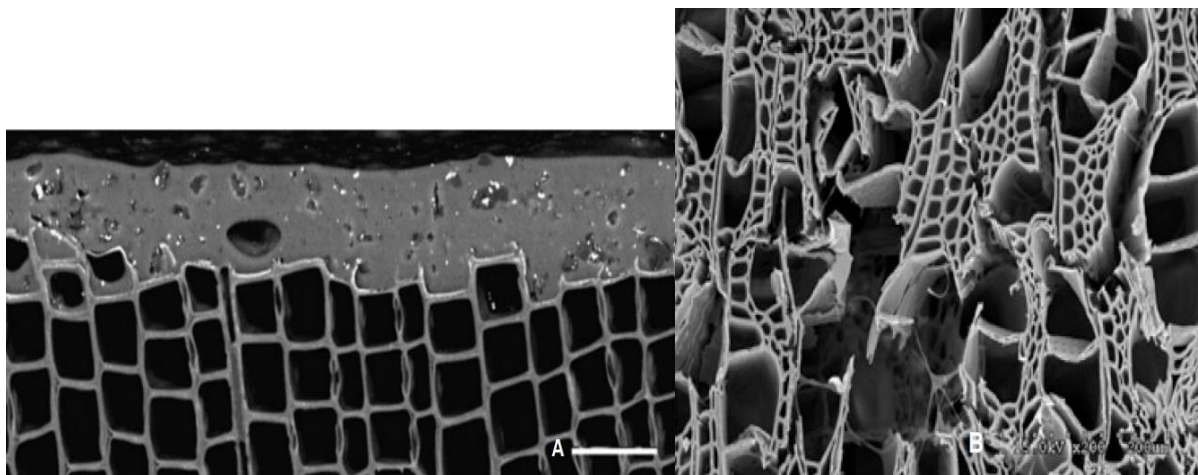
Os fungos que degradam a celulose e a hemicelulose de maneira eficiente são conhecidos por fungos de podridão parda. A madeira quando degradada por estes micro-organismos apresenta um aspecto amarronzado, devido à perda dos polissacarídeos e da alta quantidade de lignina. Por outro lado, quando a madeira é degradada pelos fungos de podridão branca, ela fica com cor mais clara, devido a remoção da lignina (HATAKKA; HAMMEL, 2011).

Apesar de vários outros métodos estarem disponíveis e com resultados semelhantes, o pré-tratamento biológico é ecologicamente promissor e não há geração de inibidores durante o processo (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Além disso, selecionando as melhores linhagens e as condições de cultura, o pré-tratamento pode se tornar mais eficiente reduzindo o tempo de experimento (tratamento) e a perda de carboidratos (KUIJK *et al.*, 2015). Os fatores que podem afetar este tipo de pré-tratamento variam desde a composição da biomassa, o próprio micro-organismo, temperatura e tempo de incubação, umidade, taxa de aeração, pH e tamanho das partículas do substrato (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

As ligninas possuem grupos funcionais que afetam diretamente sua reatividade a diversas reações químicas, tais como: hidroxila fenólica, hidroxila alifática, álcool benzílico, éter benzílico não cíclico, grupamentos carbonila e grupamentos metoxil (KATAHIRA; ELDER; BECKHAM, 2018).

Durante o período de crescimento fúngico, a parede celular sofre modificações estruturais que dão acesso aos componentes em seu interior (Figura 9) (RILEY *et al.*, 2014). Apesar das enzimas degradadoras serem conhecidas e estudadas, não se pode afirmar que a degradação ocorre de forma idêntica em todas as situações: a estrutura da parede celular e o arsenal enzimático são fatores que determinam o nível de degradação do material. Isto dificulta o entendimento total de como a biomassa é consumida e como o processo de degradação ocorre.

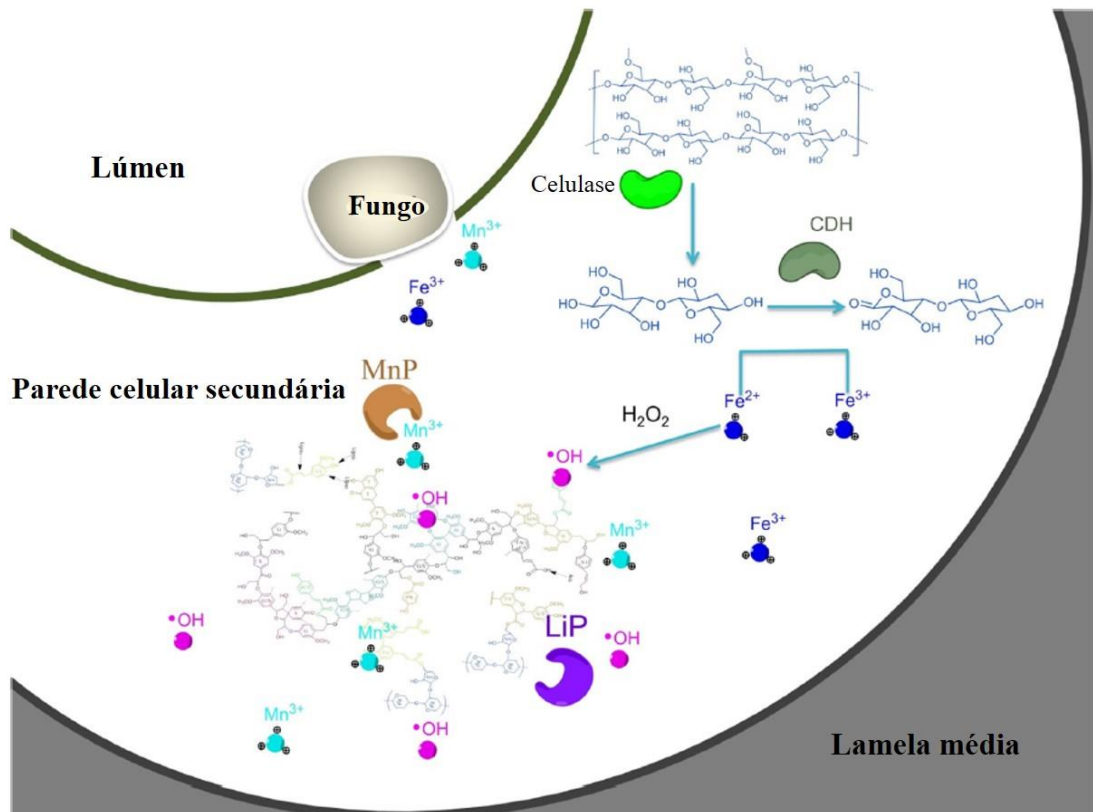
Figura 9 – Modificação sofrida na parede celular vegetal por micro-organismos em comparação com madeira que não passou por pré-tratamento microbiológico.



Fonte: A: madeira de abeto preto, adaptado de COOL, 2011; B: madeira de álamo degradada por *Botryobasidium botryosum*, adaptado de RILEY *et al.*, 2014.

Zeng *et al.* (2014) estudaram o efeito da degradação da palha de milho por *Phanerochaete chrysosporium* para tentar esclarecer como ocorre o processo da mudança da estrutura da lignina na parede celular. Seus resultados mostram que o fungo tem preferência pelos terminais fenólicos, mas não degrada significativamente outros componentes da lignina. O processo de crescimento se inicia com o acoplamento da hifa no interior da parede celular, logo após, enzimas são secretadas, como celulasas, hemicelulasas e ligninases. Radicais de hidroxila, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+} podem ser gerados por meio da interação entre celobiose dehidrogenases, oxidases e reações de Fenton. Foi possível observar também que Mn^{2+} foi oxidado em Mn^{3+} pela manganês peroxidase (MnP). A difusão destes radicais ocorre predominantemente na parede celular secundária, onde estão presentes os carboidratos e as estruturas aromáticas. Esta radicalização contribui para o inchaço estrutural ao quebrar as ligações éter, facilitando o acesso de enzimas de maior massa molecular (ZENG *et al.*, 2014) (Figura 10). O trabalho indicou que, em termos de hidrólise da celulose, não há necessidade da total desconstrução do complexo da lignina.

Figura 10 –Degradação de parede celular vegetal por fungo.



Esquema proposto sobre a degradação da parede celular de palha de milho pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Primeiramente, o fungo acopla a hifa na parede celular secundária, secretando enzimas durante seu crescimento (como a celulase, em verde claro, e a lignina peroxidase, em roxo escuro). Por sua vez, a manganês peroxidase (MnP, em marrom) oxida Mn^{2+} . Ocorre também a difusão de radicais de hidroxila, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+} ocasionando a quebra das ligações éter e favorecendo o acesso de enzimas de maior peso molecular.

Fonte: adaptado de ZENG *et al.*, 2014.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar o pré-tratamento biológico na deslignificação de biomassa lignocelulósica previamente à extração de xilana empregando peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O efeito da deslignificação foi avaliado no processo de extração de xilana e na caracterização química do bagaço pré-tratado.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar por ação de fungos de podridão branca e um ascomiceto;

Avaliar a composição química do material pré-tratado em celulose e hemicelulose por ação de fungos de podridão branca e por um ascomiceto;

Avaliar a deslignificação do bagaço como efeito no processo de extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar utilizando menor quantidade de reagente químico;

Avaliar a digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar microbiologicamente tratado.

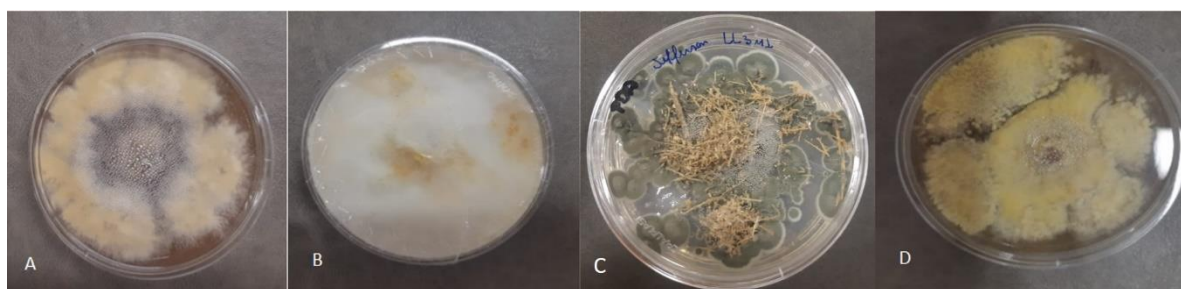
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Biomassa e pré-tratamento microbiológico

Nesta etapa foram empregados os fungos *Coniophora puteana* (CBMAI 0870) e *Gloeophyllum trabeum* (CBMAI 0872). Estas linhagens foram cedidas pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/CPQBA/Unicamp. O fungo *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2338), foi adquirido no Instituto de Botânica de São Paulo. *Aspergillus fumigatus* (Figura 11) obtido do ar, isolado pela Dra. Derlene Attili de Angelis e identificado pelo LMA também foi incluído nesse estudo.

Todas as linhagens foram cultivadas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantidas a uma temperatura constante de 25 °C por períodos de 07 a 15 dias, Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental – LMA, localizado no Centro de Estudos Ambientais – CEA, na UNESP de Rio Claro.

Figura 11 – Macromorfologia dos fungos estudados em meio BDA.



A: *Gloeophyllum trabeum*; B: *Pleurotus ostreatus*; C: *Aspergillus fumigatus*; D: *Coniophora puteana*.

Fonte: elaborado pelo autor (2018-2019).

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi gentilmente cedido pela Usina São João, Araras, SP. Sua umidade foi ajustada para 75 %, e em seguida, 60 sacos de polipropileno contendo 250 g foram preparados para receber os inóculos (BRIENZO; SILVA; MILAGRES, 2007). Um tubo Falcon foi introduzido para formar um canal no centro do material contido no saco, com o objetivo de facilitar a inoculação. Utilizou-

se papel manteiga e anéis concêntricos de PVC para fechar os sacos, os quais foram autoclavados duas vezes à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 1 h (Figura 12), em intervalos de 24 h. A preparação dos sacos foi feita no Laboratório de Caracterização e Conversão de Biomassa – LCCB, localizado no Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN de Rio Claro, SP.

Figura 12 – Processo de preparação dos sacos contendo bagaço de cana-de-açúcar para inoculação dos fungos.



A: bagaço com 75% de umidade no saco de polipropileno; B: tubo Falcon inserido no bagaço para formação de um canal para a futura inoculação dos micro-organismos; C: Saco fechado com anéis concêntricos de PVC e papel manteiga.

Fonte: elaborado pelo autor.

O experimento foi feito em triplicata e executado da seguinte forma: utilizou-se como inóculo cerca de um terço do micélio fúngico crescido na placa de Petri por 15 dias. Os sacos inoculados foram então incubados a 25 °C por um período de 1 a 5 meses, em estufa incubadora para análise de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). Utilizaram-se 3 sacos por análise até o quinto mês (total 15 sacos para cada micro-organismo). As análises aconteceram após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de incubação. No total foram utilizados 60 sacos de polipropileno.

Após o período de crescimento do micélio, os sacos foram novamente transportados ao LCCB para a realização dos experimentos de extração de xilana e caracterização química. Primeiramente, o bagaço pré-tratado foi separado pela

metade: a primeira metade foi congelada para futuros experimentos; a segunda metade foi seca sob temperatura ambiente até massa constante.

4.2 Caracterização química do bagaço *in natura* e pré-tratado

4.2.1 Remoção e determinação de extrativos

Para a remoção dos extrativos, foram preparados sacos de papel filtro, adicionando cerca de 1,5 g de bagaço *in natura* ou pré-tratado, que então foram inseridos no sistema de extração Soxhlet. No extrator, ao balão foi adicionado 250 mL de etanol 96 % para a primeira lavagem/extração, realizando de 3 a 4 sifonações por hora, com duração de 8 h de extração. Na etapa seguinte o conteúdo passou pelo mesmo processo, porém utilizando água destilada como solvente. Ao final do processo de extração com ambos os solventes, o conteúdo foi seco a 105 °C, para determinação dos extrativos, o qual foi determinado pela diferença de massa do material, antes e após a extração.

4.2.2 Determinação de carboidratos estruturais e lignina

4.2.2.1 Hidrólise ácida com H₂SO₄

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados foram caracterizadas quanto ao conteúdo de celulose/glicana, hemicelulose e lignina. Nesta etapa, foi pesado cerca de 0,3 g de bagaço, livre de extrativos, com umidade em torno de 3 % e colocados em frascos Schott de 100 mL. Foi adicionado ácido sulfúrico 72 % (m/m) por 7 min a 45 °C em banho termostatizado, sob constante agitação com um bastão de vidro. Em seguida, foram adicionados 84 mL de água destilada, diminuindo a concentração do ácido para 4 %, e autoclavado por 30 min a 121 °C (GOUVEIA *et al.*, 2009 - adaptado). Após o resfriamento, o meio foi filtrado em cadinhos com filtro

de placa porosa nº 4 de porosidade de 10 a 16 µm, previamente tarado. Uma alíquota da fração líquida foi separada para análise de lignina solúvel. O resíduo sólido retido no cadinho foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação do teor de lignina insolúvel.

A fração solúvel foi utilizada para determinação de açúcares e ácido acético por HPLC, utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 45 °C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H₂SO₄ 50 mM, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL. Para esta etapa, as amostras foram previamente filtradas em filtros de 0,44 e 0,22 µm, sequencialmente.

4.2.2.2 Determinação de lignina solúvel

O teor de lignina solúvel foi determinado após a filtração na etapa 4.2.2.1. Uma porção da fração líquida teve sua absorbância lida em 215 e 280 nm em espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração de lignina solúvel foi utilizada a seguinte equação (IPBEN, 2017):

$$C_{LS} = \left[\frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \right] \times fd_{LS}$$

Onde: CLs é a concentração em gramas por litro (g/L) de lignina solúvel no hidrolisado;

A₂₁₅ é o valor de absorbância da amostra em 215 nm;

A₂₈₀ é o valor de absorbância da amostra em 280 nm;

fdLS é o fator de diluição utilizado no hidrolisado.

Com o valor da concentração de lignina solúvel, calculou-se o teor/porcentagem de lignina solúvel utilizando a equação:

$$LS = \left(\frac{C_{LS} \times V}{MBle_s} \right) \times \left[1 - \left(\frac{Et}{100} \right) \right] \times 100$$

Onde: LS é o teor em porcentagem massa por massa (% m/m) de lignina solúvel no bagaço de cana-de-açúcar;

CLs é a concentração em gramas por litro (g/L) de lignina solúvel no hidrolisado;

V é o volume em litros (L) do hidrolisado e igual a 0,087 L;

MBles é a massa do material em gramas (g);

Et é o teor de extrativos totais em porcentagem massa por massa (% m/m).

4.2.2.3 Determinação de lignina insolúvel

Os cadinhos utilizados no item 4.2.2.1 para filtração foram colocados na estufa a 105 °C por uma noite para secagem e, posteriormente, colocados em dessecador por 30 min para resfriar. Após o resfriamento, sua massa foi determinada. A lignina insolúvel foi determinada calculando a diferença entre a massa do cadinho com a lignina subtraindo a massa do cadinho tarado, sem lignina.

O cálculo para determinar o teor de lignina total foi a soma da lignina solúvel mais a lignina insolúvel.

4.3 Extração de xilana

A extração de xilana foi realizada com o bagaço *in natura* e pré-tratado microbiologicamente, baseada em método otimizado para bagaço de cana-de-açúcar (Brienzo *et al.*, 2009), com modificação na concentração de reagente peróxido de hidrogênio. Uma amostra de 10 g da biomassa foi tratada com peróxido de hidrogênio

3 % ou 6 % (v/v) em meio alcalino com o pH ajustado para 11,6 com NaOH 5 mol/L, em um volume de reação de 200 mL. A suspensão foi agitada a 110 rpm por 4 h e depois foi filtrada, e o resíduo insolúvel foi descartado. O líquido sobrenadante teve seu pH ajustado para 6 com HCl 6 mol/L, e depois concentrado a cerca de um terço do seu volume em estufa sob circulação de ar a 50 °C. Na amostra concentrada foi adicionado etanol 96 % para precipitar a xilana, a qual foi lavada quatro vezes com etanol 70 %. A hemicelulose decantada foi seca em estufa por circulação de ar a 50 °C e depois pesada e armazenada em frascos plásticos.

A extração de xilana do bagaço foi realizada sem prévia moagem do material. O bagaço utilizado, da forma recebida da usina, apresentou um tamanho de partícula com predominância de 16 mesh (FERNANDES, 2018). Salienta-se que os trabalhos apresentados na literatura aplicam moagem previamente à extração de xilana, e que esta moagem ou seleção de bagaço com tamanho de partícula menor pode resultar em aumento no rendimento de extração da mesma (ALVES, 2018). Uma vez que o objetivo foi utilizar o bagaço da forma que é gerado na usina, o cultivo/crescimento dos fungos e extração de xilana foi realizado com o material sem moagem. Nessa etapa utilizou-se 3 % de peróxido de hidrogênio, carga de peróxido de hidrogênio 50 % menor do que o empregado na literatura (BRIENZO *et al.*, 2019; ALVES 2018). Uma vez que o objetivo foi avaliar o efeito do crescimento dos fungos no bagaço, a carga de reagente foi reduzida para melhor verificação da ação dos fungos em facilitar a extração da xilana. Houve também a extração de xilana com peróxido de hidrogênio 6 %, como indicado na literatura, do bagaço *in natura* e dos dois micro-organismos que obtiveram os melhores resultados para fins de comparação.

4.4 Hidrólise enzimática do material pré-tratado e *in natura*

As amostras de bagaço *in natura* e microbiologicamente pré-tratados foram submetidas à hidrólise enzimática para avaliar o rendimento de liberação de glicose. Aproximadamente 0,1 g de amostra foi submetido à hidrólise enzimática para comparar a digestibilidade, utilizando coquetel comercial (Cellic Ctec 2 - Novozymes) em meio tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 (BRIENZO *et al.*, 2015). Foi utilizada atividade enzimática de 15 FPU/g de substrato em reação a 50 °C e agitação

de 150 rpm por 24 h. A amostra foi imersa em banho fervendo por 5 min e depois centrifugada (2500 rpm por 10 min). Cerca de 0,1 mL da amostra foi adicionada a 0,9 mL de água destilada e 1,5 mL de reagente DNS, e então imersa em banho fervendo por 5 m. A leitura da absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm para determinar a glicose liberada.

4.5 Análise estatística

A análise estatística, realizada no software Bioestat, incluiu 3 testes: A: comparação entre valores de xilana extraída em massa (g) das linhagens estudadas, B: comparação da porcentagem de xilana no material pré-tratado microbiologicamente, incluindo o bagaço *in natura* e C: comparação da porcentagem de xilana extraída do material pós pré-tratamentos microbiológicos.

Para a análise comparativa dos resultados de extração de xilana entre os micro-organismos, utilizou-se o teste estatístico de Friedman. Este teste é considerado não-paramétrico e serve para diferenciar amostras de baixo número amostral, diferente do ANOVA, que utiliza dados com número amostral maior (ZAR, 1999).

Com os dados de cada composto determinado, foi feita uma comparação estatística entre os valores de xilana dos bagaços que passaram pelo pré-tratamento microbiológico e do bagaço *in natura*. Esta comparação mostrou qual dos micro-organismos consumiu mais xilana, e se estes valores são significativamente diferentes entre eles e o do bagaço *in natura*. O teste estatístico escolhido para esta análise foi o de Mann-Whitney, que é um teste não-paramétrico e pode analisar duas ou mais amostras independentes, com valores de N amostral diferentes (SIEGEL; CASTELLAN, 2006).

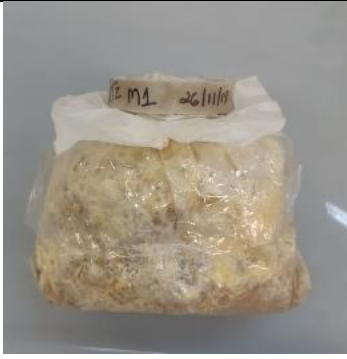
Com os valores da extração de xilana em massa e os valores dos teores dela em cada amostra, calculou-se sua porcentagem extraída da biomassa em cada pré-tratamento. Para a comparação dos diferentes pré-tratamentos foi utilizado novamente o teste estatístico de Mann-Whitney (SIEGEL; CASTELLAN, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Colonização fúngica no bagaço de cana-de-açúcar

Após o tempo determinado para o crescimento dos micro-organismos, os sacos com os bagaços de cana-de-açúcar microbiologicamente pré-tratados foram retirados da BOD para análise (Quadro 1). Metade de seu conteúdo foi congelado para repetição de experimentos, caso necessário, e experimentos posteriores. O crescimento de *G. trabeum* no bagaço foi o mais rápido, e no primeiro mês o micélio já havia ocupado todo o material. No quarto mês o experimento foi interrompido, pois o micro-organismo havia colonizado completamente o substrato. Jensen *et al* (2002) consideram este fungo um degradador de madeira altamente eficiente, o que pode explicar o seu rápido crescimento em relação aos demais. Levando-se em conta que a madeira e o bagaço de cana-de-açúcar são biomassas semelhantes quanto às suas características lignocelulósicas, o bagaço foi um ótimo substrato para seu desenvolvimento. Os fungos *A. fumigatus*, *C. puteana* e *P. ostreatus* tiveram crescimento visual mais lento. Mudanças visuais foram observadas apenas nos sacos contendo *P. ostreatus* e *G. trabeum*, no decorrer dos meses.

Quadro 1 – Micro-organismos e biomassa pré-tratada.

Fungos	Crescimento em placa de Petri	Crescimento em bagaço de cana-de-açúcar
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)		
<i>A. fumigatus</i>		
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)		
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)		

Micro-organismos utilizados no trabalho com 11 dias de crescimento e sacos com bagaço inoculados com 4 meses de crescimento.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Caracterização química do bagaço *in natura* e pré-tratado microbiologicamente

5.2.1 Determinação de extrativos

O teor de extrativos no bagaço *in natura* foi de 15,06 % (Tabela 2), faixa também encontrada no material pré-tratado com os fungos *A. fumigatus* e *P. ostreatus* (15,09 % e 16,42 %, respectivamente). O conteúdo de extrativos está alto em relação a alguns estudos reportados na literatura (BRIENZO *et al.*, 2017). Valores maiores foram mencionados, chegando a 26 % no teor de extrativos para o bagaço de cana-de-açúcar (KLEMM; SCHMAUDER; HEINZE, 2005; DAS; GANESH; WANGIKAR, 2004). O bagaço pré-tratado com *G. trabeum* apresentou o maior teor de extrativos, com média de 31,75 % e valores entre 25,21 % e 35,69 %. O material que passou pelo pré-tratamento com *C. puteana* apresentou uma média de 29,91 % no teor de extrativos, com máxima de 33,32 % no terceiro mês de tratamento. O aumento no teor de extrativos também foi observado em tratamentos com palha de trigo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*: em uma semana, houve aumento em até 18,4 %. Neste caso, também houve degradação de outros componentes, como da lignina, o que levou a aumentar o teor de extrativos (ZENG; SINGH; CHEN, 2011).

5.2.2 Determinação de carboidratos estruturais e lignina

A caracterização química do bagaço *in natura* mostrou a seguinte composição: 42,71 % de celulose, 30,41 % de hemicelulose (23,82 % de xilana) e 20,42 % de lignina (lignina solúvel mais fração insolúvel) (Tabela 2). Na literatura, os valores de celulose foram reportados entre 25 e 45 %; xilana de 28 e 32 % e lignina entre 15 e 25 %, para o mesmo material (NAIDU *et al.*, 2018). Apenas o valor de xilana está abaixo em comparação a esta faixa apresentada na literatura. Variação na composição química pode ocorrer devido à diversos fatores, como: variação da planta, estado de maturação, condições climáticas, fertilização/irrigação, localização da plantação, tipo do solo e tempo de colheita (DE VASCONCELOS, 2015).

Tabela 2 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado microbiologicamente (em porcentagem).

Micro-organismo	Tempo (mês)	Celulose	Hemicelulose	Lignina insolúvel	Lignina solúvel	Extrativos
<i>in natura</i>	0	42,71 ± 15,34	30,41 ± 13,13	18,78 ± 8,51	1,64 ± 0,80	15,06 ± 1,06
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (CBMAI 0872)	1	34,24 ± 5,94	15,10 ± 3,06	58,99 ± 1,68	1,04 ± 0,13	25,21 ± 1
	2	45,65 ± 0,81	19,33 ± 2,02	48,22 ± 6,3	1,21 ± 0,02	29,74 ± 2,11
	3	39 ± 3,31	23,40 ± 1,59	32,32 ± 2,04	1,30 ± 0,25	35,69 ± 2,94
	4	42,42 ± 2,94	16,06 ± 1,75	55,61 ± 1,3	1,39 ± 0,02	33,42 ± 3,39
	5	44,46 ± 2,17	16,24 ± 1,45	32,91 ± 3,85	1,35 ± 0,06	34,71 ± 2,09
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	27,39 ± 5,72	18,89 ± 5,49	53,90 ± 4,30	1,21 ± 0,08	14,54 ± 0,29
	2	27,77 ± 8,93	18,79 ± 5,72	37,08 ± 3,73	—	—
	3	46,39 ± 1,95	30,85 ± 1,28	40,96 ± 3,40	1,38 ± 0,04	15,46 ± 0,36
	4	42,57 ± 4,15	23,96 ± 1,94	46,75 ± 6,31	1,34 ± 0,11	15,83 ± 1,25
	5	44,14 ± 1,82	27,66 ± 2,93	43,91 ± 6,62	1,33 ± 0,07	14,55 ± 0,39
<i>Coniophora puteana</i> (CBMAI 0870)	1	28,51 ± 8,82	17,48 ± 5,9	23,62 ± 0,63	1,15 ± 0,23	19,82 ± 3,6
	2	38,16 ± 8,86	14,66 ± 2,7	36,14 ± 6,09	1,40 ± 0,08	29,61 ± 0,7
	3	41,90 ± 1,61	17,87 ± 0,58	35,82 ± 7,82	1,39 ± 0,18	33,32 ± 1,39
	4	33,84 ± 2,16	15,95 ± 1,57	36,34 ± 7,90	1,28 ± 0,09	36,0 ± 2,98
	5	38,73 ± 0	18,13 ± 5,02	29,59 ± 17,81	1,37 ± 0,18	30,84 ± 6,73
<i>Pleurotus ostreatus</i> (CCIBt 2338)	1	-	-	19,61 ± 7,21	1,84 ± 0,23	16,95 ± 0,95
	2	-	-	27,89 ± 4,89	1,71 ± 0,20	17,08 ± 1,14
	3	-	-	24,33 ± 2,22	1,63 ± 0,18	16,79 ± 0,87
	4	-	-	36,72 ± 7,25	1,88 ± 0,03	16,02 ± 0,42
	5	-	-	30,06 ± 9,02	1,64 ± 0,06	15,26 ± 0,21

Composição química em porcentagem para cada micro-organismo de acordo com o mês de cultivo. Legenda: —: dados não determinados.

Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando diferentes materiais lignocelulósicos, o teor de xilana pode apresentar uma ampla variação, de 15 a 35 %, como em madeira e sabugo de milho, respectivamente (MELATI *et al.*, 2019). O teor de celulose também pode variar de acordo com estes materiais, desde 25 % em bagaço de cana-de-açúcar, até 95 % em plantas como algodão, enquanto os valores de lignina podem variar de 1 %, como no algodão, até 30 % em gramíneas (NAIDU *et al.*, 2018; KLEMM; SCHMAUDER; HEINZE, 2005). Já a caracterização química de diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar apresenta teor de hemicelulose entre 24,6 e 32,8 %, incluindo variedades geneticamente modificadas (BRIENZO *et al.*, 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar que passou pelo pré-tratamento microbiológico apresentou variação nos teores dos carboidratos e demais compostos. Para todos os experimentos, a celulose e a xilana tiveram teores menores em comparação com a literatura e ao bagaço *in natura*, e apenas a lignina apresentou maior teor nesta biomassa (Tabela 2). Sabe-se que um substrato lignocelulósico submetido ao tratamento microbiológico pode apresentar modificações estruturais e na composição química (KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999).

O bagaço de cana-de-açúcar tratado com *G. trabeum* apresentou o menor teor de celulose no primeiro mês de tratamento (34,24%), aumentando posteriormente quando se poderia esperar uma diminuição. Este comportamento também foi observado nas amostras tratadas com *A. fumigatus* (27,39 %) e *C. puteana* (28,51 %), que apresentaram os menores teores no primeiro mês. Esse aumento pode ter sido resultado da solubilização/remoção dos demais componentes da biomassa, que em porcentagem contribuíram para o subsequente aumento da celulose no material (MELATI *et al.*, 2019; SHMATZ *et al.*, 2019). Nos meses seguintes, o teor de celulose aumentou para todos os fungos, sendo os maiores valores para *G. trabeum* de 45,65 %, no segundo mês; 46,39 % para *A. fumigatus* e 41,90 % para *C. puteana*, ambos no terceiro mês de tratamento.

O teor de hemicelulose diminuiu para todos os bagaços pré-tratados, em praticamente todos os meses de cultivo em comparação com o bagaço *in natura* (Tabela 2). De fato, este carboidrato foi provavelmente o mais consumido dentre os componentes do bagaço, o que explica o aumento nos teores de celulose e lignina ao longo do tempo do experimento (Tabela 2).

Neste trabalho, a linhagem de *C. puteana* estudada foi o micro-organismo que mais degradou a hemicelulose. Em média, nos 5 meses de crescimento, o fungo consumiu 44,72 % deste carboidrato. O menor teor se deu no segundo mês de tratamento, com 14,66 %. Empregando madeira de pinho como substrato, o fungo *C. puteana* (BAM Ebw.15) degradou os carboidratos de 70,6 % a 56,5 % em 2 meses de cultivo, chegando a 40,6 % em 4 meses de cultivo (IRBE *et al.*, 2006). O bagaço pré-tratado por *G. trabeum* apresentou teor mínimo de hemicelulose igual a 15,10 % no primeiro mês, com uma variação do teor com os demais tempos de cultivo. A média de hemicelulose disponível no bagaço para este fungo nos 5 meses de pré-tratamento foi de 18,02 %, ou seja, o fungo consumiu 40,74 % da hemicelulose disponível. Em experimentos com palha de milho em pó, utilizando 5 g de material, *G. trabeum* (NBRC6509) foi cultivado por 30 dias à 30 °C e a quantidade de xilana diminuiu cerca de 43 % em relação ao controle (GAO; MORI; KONDO, 2012). Esta comparação mostra que o tempo de 30 dias de cultivo na palha de milho ou 5 meses no bagaço de cana-de-açúcar resulta em efeito semelhante na remoção de hemicelulose, o que indica também a eficácia deste fungo na degradação da hemicelulose mesmo em pouco tempo de cultivo, podendo ser uma opção a métodos cujo o tempo de processamento é limitado.

O fungo *A. fumigatus* também apresentou redução no teor de hemicelulose, com o menor teor de 18,79 % no segundo mês de cultivo. Em média, *A. fumigatus* consumiu 20,97 % de toda a hemicelulose que havia no material. Experimentos com *A. fumigatus* degradando palha de arroz mostraram resultados parecidos, porém o tempo de cultivo foi de apenas duas semanas (MATTHEWS, 2016).

O teor de lignina no bagaço que foi cultivado por *G. trabeum* apresentou aumento médio de 2,29 vezes em relação à quantidade presente no bagaço *in natura*. A maior quantidade de lignina observada foi no primeiro mês, 60,03 %. Para *A. fumigatus*, o aumento médio no percentual de lignina foi de 2,23 vezes, tendo como maior valor 55,11 % no primeiro mês de tratamento. Diferente dos demais fungos, o bagaço cultivado por *P. ostreatus* resultou no menor teor de lignina observado: variando entre 38,6 % no quarto mês e 21,45 % no primeiro mês. A média total de lignina subiu apenas 1,44 vezes em relação ao teor de lignina *in natura*. Para *C. puteana*, o teor de lignina na biomassa subiu 1,6 vezes, e o maior teor deste componente se deu no quarto mês, 38,34 %. Utilizando-se pinho como meio de

crescimento para este mesmo micro-organismo, o teor de lignina aumentou de 29,4 % a 43,5 % em 2 meses de cultivo e subiu para 59,4 % após 4 meses de cultivo (IRBE *et al*, 2006).

Apesar da degradação dos polissacarídeos ser mais eficiente no primeiro mês, é importante notar que houve degradação durante todo o experimento, mas não apenas da celulose, e sim de outros compostos simultaneamente.

Os teores de arabinana e acetil foram menores nos bagaços tratados microbiologicamente em comparação com o bagaço *in natura* (Tabela 3). Para o bagaço *in natura*, o teor médio de arabinana foi de 2,48 % e o de acetil foi 4,11 %. O resultado com o bagaço cultivado com *G. trabeum* foi de 1,88 % para arabinana e 3,0 % para acetil, enquanto *A. fumigatus* teve média de 2,48 e 2,08 % de arabinana e acetil, respectivamente. *C. puteana* apresentou 2,16 % no teor de arabinana e 2,25 % no teor de acetil. Estes resultados sugerem que também houve degradação destes compostos pelo crescimento dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 3 – Teor médio de arabinana e acetil no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado microbiologicamente após 5 meses de degradação (em porcentagem).

Micro-organismos	Arabinana	Acetil
<i>In natura</i>	2,48 ± 0,98	4,11 ± 2,02
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	1,88 ± 0,23	3 ± 0,48
<i>A. fumigatus</i>	2,48 ± 0,38	2,08 ± 0,84
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	2,16 ± 0,23	2,25 ± 0,25
<i>Pleurotus ostreatus</i> (CCIBt 2338)	-	-

Teor médio de arabinana e acetil em porcentagem para cada micro-organismo.

Legenda: —: dados não determinados.

Fonte: elaborado pelo autor.

Com o crescimento dos micro-organismos observou-se que a quantidade percentual de celulose e hemicelulose diminuiu enquanto a de lignina aumentou à medida que os meses de cultivo avançaram (Tabela 2). Esta alteração na composição química do material era esperada, pois os fungos podem degradar um ou mais componentes da biomassa (BRIENZO; SILVA; MILAGRES, 2007). Estes resultados

podem ser explicados pelo arsenal enzimático que cada fungo possui para a degradação da parede celular da planta. *C. puteana* não possui MnP para degradar a lignina, mas possui xilanase para degradar a xilana (IRBE *et al.*, 2014). Kerem, Jensen e Hammel (1999) observaram que *G. trabeum* utiliza reações de Fenton extracelulares não-enzimáticas dirigidas por hidroquinonas para clivar polietileno glicol. Os autores propõem que o fungo utiliza reações semelhantes para quebrar materiais lignocelulósicos pela semelhança entre este polieter e o material lignocelulósico. Isso pode explicar a mudança estrutural no bagaço microbiologicamente pré-tratado.

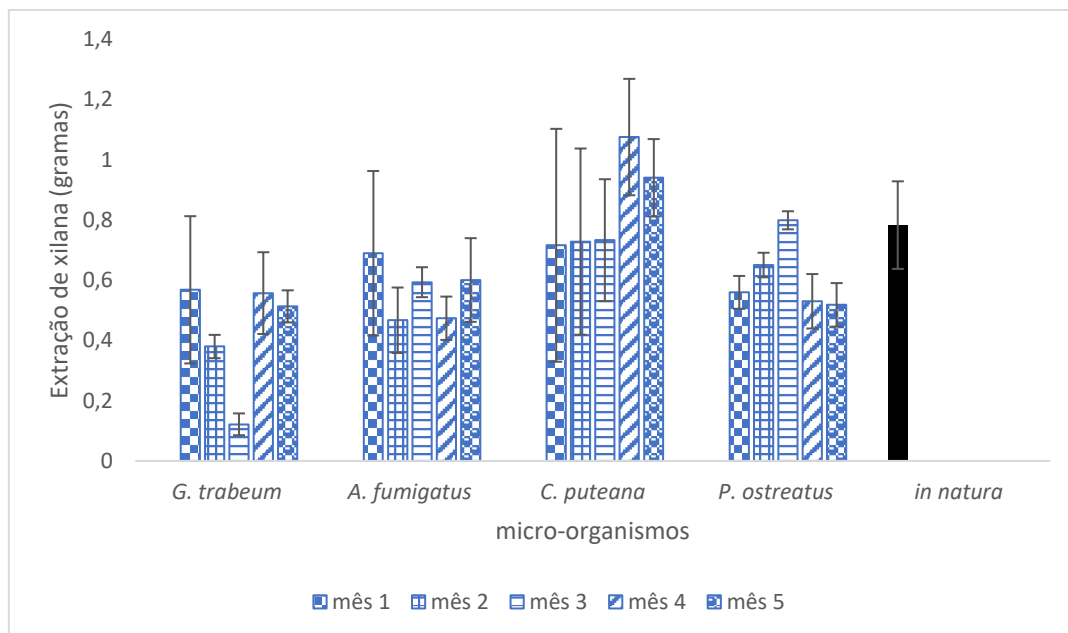
5.3 Extração de xilana

A extração de xilana foi realizada em ensaios com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* ou pré-tratado pelos fungos em estudo. Os resultados apresentados nos tópicos subsequentes abordam o rendimento em massa (gramas de xilana extraída de 10 g de bagaço), e rendimento em porcentagem de extração de xilana.

5.3.1 Extração de xilana em massa

A extração de xilana do bagaço *in natura* foi de 0,78 g, enquanto que para os materiais pré-tratados pelos fungos ocorreu majoritariamente uma diminuição na quantidade de xilana extraída (Figura 13). O bagaço que foi pré-tratado com *G. trabeum* teve rendimento de extração de xilana médio de 0,42 g, com valores entre 0,12 e 0,56 g no terceiro e primeiro mês, respectivamente. Para o bagaço pré-tratado com *A. fumigatus*, a extração de xilana resultou entre 0,46 e 0,68 g no segundo e primeiro mês, respectivamente, tendo uma média de 0,56 g.

Figura 13 – Rendimento de extração de xilana em massa (g) com peróxido de hidrogênio 3 % em meio alcalino do bagaço microbiologicamente pré-tratado in natura e pré-tratado com micro-organismos.



Fonte: elaborado pelo autor.

O bagaço pré-tratado por *C. puteana* apresentou os maiores valores de extração de xilana em comparação com os demais micro-organismos estudados. A massa de xilana extraída foi de 1,07 g respectivo ao quarto mês de cultivo e uma média de extração de 0,83 g. O menor valor de extração se deu no primeiro mês com 0,71 g de xilana, resultado acima da média em relação aos outros fungos estudados. A xilana extraída cujo pré-tratamento do bagaço foi com *P. ostreatus* apresentou média de 0,61 g, com rendimento máximo de 0,79 g no terceiro mês de tratamento e mínima de 0,51 g no quinto mês de tratamento.

Com o teste estatístico de Friedman, os valores para a extração em massa da xilana foram comparados (Tabela 4). Se o valor de $P \geq 0,05$, então considera-se que os valores são iguais, ou seja, os pré-tratamentos não diferem entre si para a extração da xilana, mas se $P < 0,05$, então os valores são diferentes, isto significa que os pré-tratamentos se diferem.

Tabela 4 – Valor de P quando comparados os valores de extração de xilana em massa (g) dos bagaços microbiologicamente pré-tratados, com o teste estatístico de Friedman.

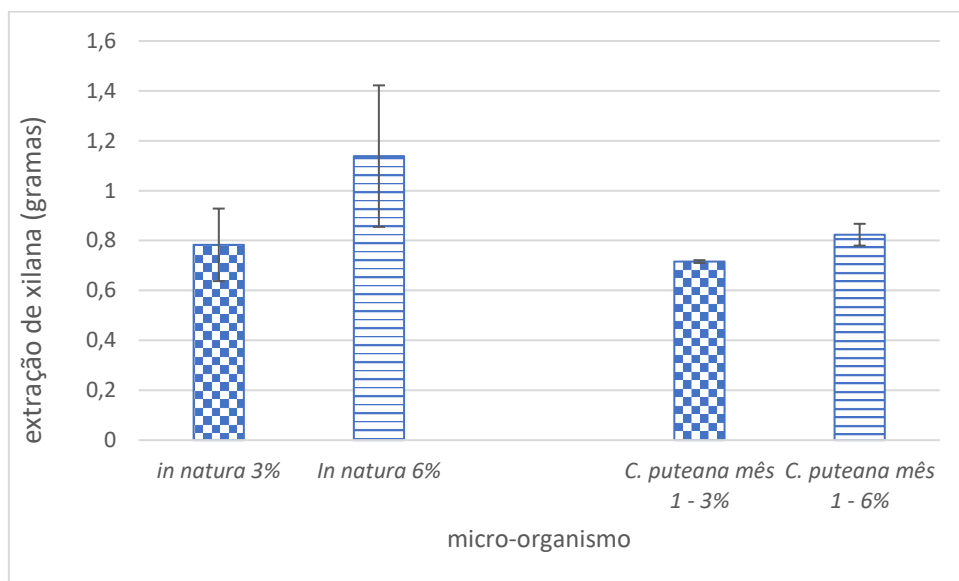
	<i>G. Trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. Puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. Ostreatus</i> (CCIBt 2338)
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x			
<i>A. fumigatus</i>	0,1797	x		
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0,02535	0,0253	x	
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	0,65472	0,6547	0,1797	x

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados das extrações cujo pré-tratamento utilizado foi com fungo *C. puteana* teve valor significativamente diferente dos pré-tratamentos referentes à *G. trabeum* e *A. fumigatus*, com ambos valores de $P < 0,05$. Porém, quando comparado com *P. ostreatus*, o valor de $P > 0,05$, mostrando que não há diferença significativa entre os valores da extração. Já a comparação entre os valores de extração obtidos pelo pré-tratamentos com *G. trabeum*, *A. fumigatus* e *P. ostreatus* mostrou que não há diferença estatística.

A extração de xilana também foi feita com peróxido de hidrogênio 6 % no bagaço *in natura* e na amostra referente à *C. puteana* do primeiro mês (Figura 14). Esta comparação permitiu avaliar se a extração pós pré-tratamento microbiológico alcançaria os mesmos resultados em comparação à extração utilizando metade do reagente.

Figura 14 – Rendimento e extração de xilana do bagaço *in natura* e microbiologicamente pré-tratado utilizando 3 e 6 % de reagente químico (H_2O_2).



Fonte: elaborado pelo autor.

A extração referente ao bagaço *in natura* 3 % teve média de 0,78 g, enquanto a extração com 6 % resultou em média 1,13 g de xilana. Isto mostra que a carga dobrada de reagente aumenta o rendimento, mas não ao ponto de dobrar o valor dos resultados. Os resultados referentes à *C. puteana* foram em média 0,82 g de xilana extraída utilizando 6 % de peróxido de hidrogênio, valor praticamente idêntico ao pré-tratamento utilizando metade da carga de reagente. Foi visto que a extração de xilana em bagaço de cana-de-açúcar utilizando 6 % de peróxido de hidrogênio como reagente alcança até 90 % de rendimento (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), resultados com pré-tratamento microbiológico chegaram a resultados parecidos, mas com metade do reagente químico. Com isso, percebe-se que, quando o bagaço passa pelo pré-tratamento microbiológico, não há necessidade de utilizar maior quantidade de reagente.

5.3.2 Xilana presente no bagaço após pré-tratamento microbiológico

Os valores no item 4.3.1 correspondem apenas à quantidade em massa da xilana extraída, não levando em consideração a quantidade de xilana disponível neste

bagaço. Com os dados da caracterização química foi possível calcular a quantidade de xilana presente no material em comparação com os demais compostos da parede celular (Tabela 5). Este valor é diferente dos apresentados na tabela de composição química porque nos valores de hemicelulose estão considerando arabinana e ácido acético.

O bagaço *in natura* apresenta 23,82 % de xilana em sua composição. Os bagaços que passaram pelo pré-tratamento microbiológico tiveram valores para o teor de xilana menores que o bagaço *in natura*. Isto mostra que os micro-organismos tiveram preferência pela a xilana do material em comparação com os demais compostos disponíveis. O bagaço cultivado por *C. puteana* apresentou o menor teor de xilana de todos, com média de 12,41 % e variação de 10,78 a 13,6 %, o que indica que este fungo consumiu mais xilana em comparação aos demais micro-organismos. *G. trabeum* teve média de 13,14 % no teor de xilana, com valores variando entre 11,68 e 14,74 %. O bagaço pré-tratado com *A. fumigatus* teve o maior teor de xilana apresentado, com máximo de 24,83 e mínimo de 14,98 %, com média de 19,46 % de xilana disponível. Ou seja, este fungo foi o que menos consumiu o açúcar dentre os micro-organismos.

Tabela 5 – Teor de xilana no bagaço *in natura* e microbiologicamente pré-tratado.

Mês	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	<i>B. in natura</i>
1	11,68 ± 2,25	14,98 ± 3,77	13,6 ± 5,22	-	23,82 ± 10,12
2	14,74 ± 1,45	14,98 ± 4,43	12,39 ± 2,44	-	
3	14,62 ± 0,29	24,83 ± 1	12,22 ± 0,23	-	
4	12,21 ± 1,19	18,94 ± 0,87	10,78 ± 0,95	-	
5	12,49 ± 1,17	23,59 ± 1,21	13,07 ± 4,53	-	

Legenda: –: dados não determinados.

Fonte: elaborado pelo autor.

Com o teste estatístico de Mann-Whitney foi possível comparar se os pré-tratamentos diferem entre si (e com o ensaio *in natura*) quanto à porcentagem de xilana disponível no bagaço analisado (Tabela 6). Com este resultado pode-se diferenciar se a quantidade de xilana consumida pelos fungos são significativamente diferentes ou iguais.

Para este teste estatístico, se $P > 0,05$, então corrobora com a hipótese nula $H_0 \rightarrow$ pré-tratamento microbiológico = *in natura*, mas se $P < 0,05$, então corrobora a hipótese alternativa $H_a \rightarrow$ pré-tratamento microbiológico < *in natura*. Como não é possível que haja mais xilana disponível nas biomassas que passaram pelo pré-tratamento microbiológico, então usa-se o P valor unilateral.

Tabela 6 – Valor de P quando comparados os teores de xilana no bagaço microbiologicamente pré-tratado pelos fungos.

	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	<i>in natura</i>
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x				
<i>A. fumigatus</i>	0,0045	x			
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0,3008	0,0045	x		
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	-	-	-	x	
<i>in natura</i>	0,0721	0,2919	0,0339		x

Legenda: –: dados não determinados.

Fonte: elaborado pelo autor.

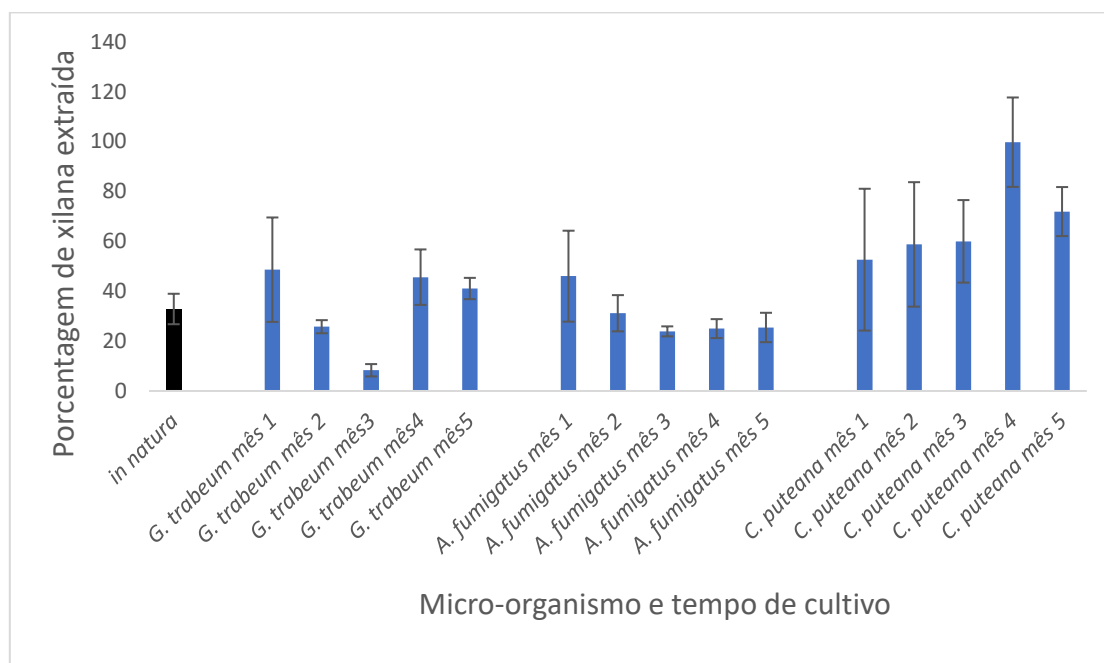
O bagaço *in natura* difere estatisticamente quanto à quantidade de xilana disponível apenas do bagaço pré-tratado por *C. puteana*, com valor de $P < 0,05$. Já o material que passou pelo pré-tratamento com *A. fumigatus* apresenta quantidade de xilana significativamente diferentes de *G. trabeum*, e *C. puteana*, enquanto a biomassa que foi pré-tratada com *G. trabeum* possui teor de xilana disponível significativamente igual à biomassa pré-tratada com *C. puteana*.

5.3.3 Rendimento de extração de xilana em porcentagem

Com os dados dos valores da extração da xilana em massa e da quantidade da mesma disponível nos bagaços pré-tratados, foi possível calcular qual a porcentagem desta xilana que foi extraída (Figura 15). Como cada pré-tratamento foi feito com um micro-organismo diferente, e considerando os diferentes valores para a degradação e extração, os valores para o rendimento da extração em porcentagem foram diferentes entre os ensaios, como já era esperado.

O bagaço *in natura* apresentou 32,86 % de sua xilana extraída empregando 3 % de peróxido de hidrogênio, com a metodologia utilizada. O bagaço que passou pelo pré-tratamento com *G. trabeum* teve média de 33,88 % de sua xilana extraída, com máximo de 48,63 % no primeiro mês de tratamento. O valor da mediana para este ensaio foi de 41,07 %, valor próximo ao do bagaço *in natura*.

Figura 15 – Porcentagem de xilana extraída do bagaço microbiologicamente pré-tratado com peróxido de hidrogênio 3 %.

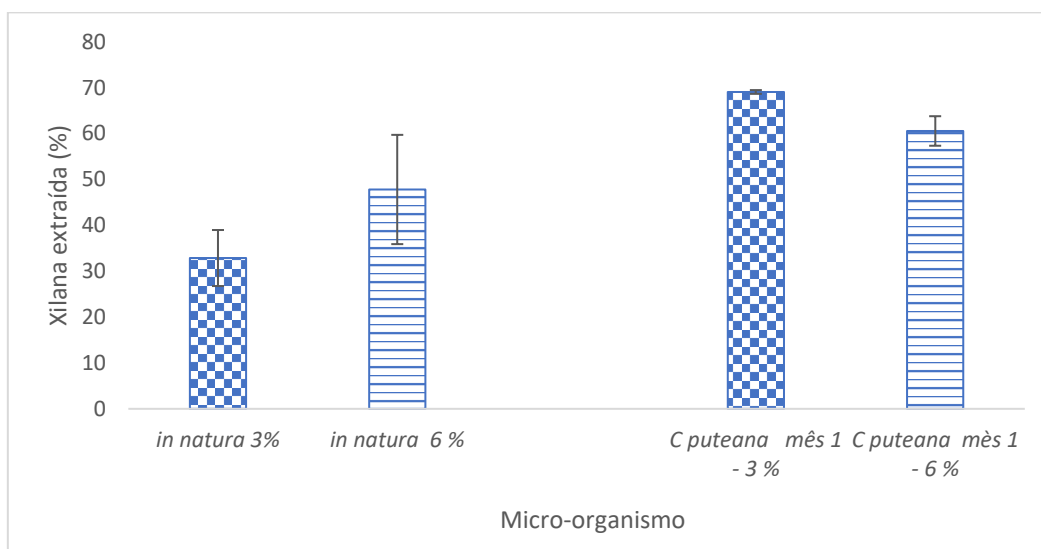


Fonte: elaborado pelo autor.

Para o bagaço que foi feito pré-tratamento com *A. fumigatus*, os resultados para a quantidade de xilana extraída teve média de 30,31 %, com valor máximo de 46,02 %. O ensaio que teve como micro-organismo *C. puteana* apresentou os melhores valores. Após o crescimento do fungo no bagaço, foi possível extrair em média 68,60 % da xilana disponível. No material referente ao quarto mês de tratamento, foi extraída 99,74 % de toda xilana. Este foi o maior valor para extração deste polissacarídeo de todos os experimentos.

O bagaço pré-tratado por *C. puteana* passou por extração de xilana utilizando o dobro de reagente (peróxido de hidrogênio 6 %) em seu primeiro mês para comparação (Figura 16). Os resultados mostram que para o bagaço *in natura*, a extração com 3 % de peróxido extraiu 32,86 % da xilana disponível, enquanto a extração utilizando 6 % de peróxido obteve 47,79 % da xilana extraída, mostrando que o dobro de reagente não extrai o dobro da xilana. No bagaço que passou pelo pré-tratamento com *C. puteana*, a extração com metade do reagente rendeu mais xilana do que no experimento feito com 6 % de peróxido.

Figura 16 – Porcentagem de xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar comparando valores entre diferentes concentrações de reagente (3 % e 6 % de peróxido de hidrogênio).



Fonte: elaborado pelo autor.

Utilizando o teste estatístico de Friedman para comparar os valores de extração entre os materiais que passaram pelo pré-tratamento microbiológico, foi utilizado o mesmo conceito do item 4.3.1, onde se $P > 0,05$, então os pré-tratamentos são estatisticamente iguais, mas se $P < 0,05$, então os pré-tratamentos são estatisticamente diferentes (Tabela 7). Neste caso, o ensaio com *C. puteana* se mostrou estatisticamente diferente dos ensaios com os demais micro-organismos, enquanto os ensaios envolvendo *A. fumigatus* e *G. trabeum*, tiveram resultados estatisticamente iguais.

A massa de xilana extraída é maior no bagaço *in natura* do que nos bagaços cultivados com os fungos. Por outro lado, foi extraída mais xilana em porcentagem utilizando o bagaço cultivado pelos fungos. A diferença de valores entre o bagaço *in natura* com o bagaço pré-tratado microbiologicamente mostra que ocorreu mudança estrutural no bagaço durante o processo de crescimento dos fungos.

Tabela 7 – Rendimento de extração da xilana no bagaço microbiologicamente pré-tratado em porcentagem utilizando peróxido de hidrogênio 3 %.

	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x			
<i>A. fumigatus</i>	0.6547	x		
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0.0253	0.0253	x	
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	-	-	-	x

Legenda: –: dados não determinados.

Fonte: elaborado pelo autor.

O aumento no rendimento de extração em porcentagem sugere que ocorreu uma redução na recalcitrância do bagaço de cana-de-açúcar. Esta diminuição na recalcitrância do material mostra que apesar dos micro-organismos degradarem o polissacarídeo de interesse, eles também modificam a estrutura da parede celular de forma a facilitar a remoção da xilana por meios químicos.

Métodos de extração utilizando água a uma temperatura de 180 °C por 20 min (VALLEJOS *et al.*, 2015) extraiu 74 % de xilana, quantidade significativa levando em consideração o tempo do processo, mas também é um método que demanda demasiada energia. Pré-tratamentos microbiológicos juntamente a tratamentos físicos podem ser uma solução para a alta performance de extração, com redução de custos e tempo.

5.4 Hidrólise enzimática do material pré-tratado e *in natura*

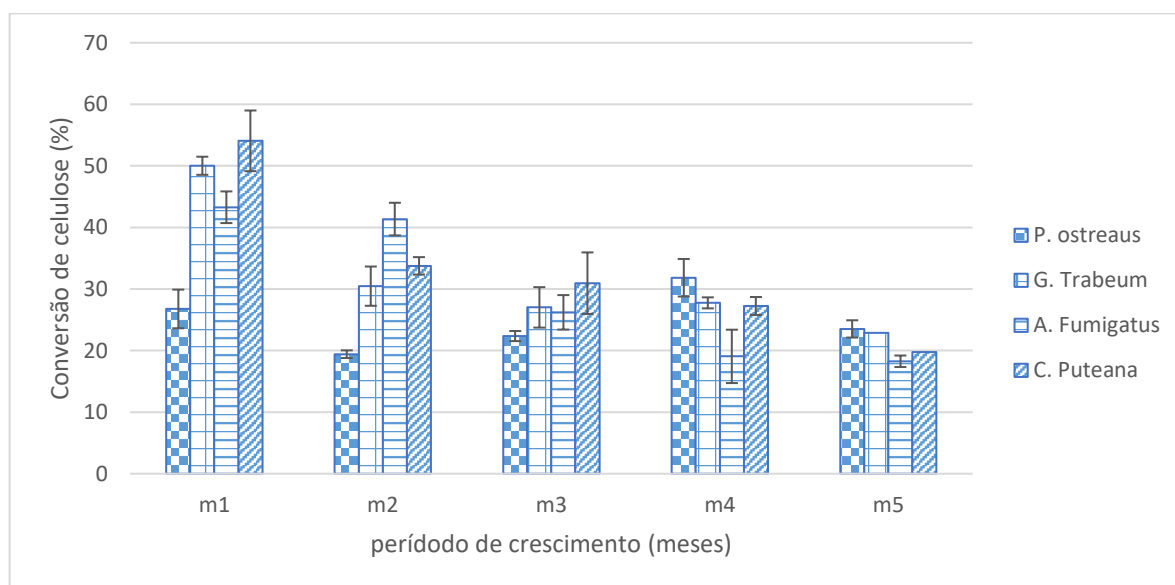
Os resultados da hidrólise enzimática mostraram que o pré-tratamento microbiológico afetou a taxa de conversão de celulose (Figura 17). Esta conversão decaiu ao longo do experimento conforme os micro-organismos foram crescendo, exceto para *Pleurotus ostreatus*, o qual variou a conversão de celulose de 26,77 % no primeiro mês aumentado para 31,83 % decaindo para 23,52 %, no quarto e quinto mês, respectivamente. De forma geral, os resultados mostram que os fungos consumiram a celulose, corroborando com os demais resultados do trabalho.

As conversões foram decrescentes para *Gloeophyllum trabeum*, *Aspergillus fumigatus* e *Coniophora puteana*. No que se diz respeito à *G. trabeum*, o primeiro mês de cultivo apresentou uma taxa de 50,02 % que decaiu para 22,86 % no quinto mês. Enquanto isso, no cultivo de *A. fumigatus*, essa taxa variou de 43,28 para 18,27 % no primeiro e quinto mês, respectivamente. Finalmente, a conversão de celulose para *C. puteana*, variou de 54,07 % no primeiro mês a 19,76 % no último mês, sendo está a maior diferença de valores em relação aos outros micro-organismos.

Pré-tratamentos microbiológicos com fungos de podridão branca são conhecidos por aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, e com isso, aumentar a eficiência na produção de açúcares fermentáveis. Estudos envolvendo fungos como *Cer. Subvermispora* (FP-105752-Sp) e *P. chrysosporium* (NRRL-6370) mostraram resultados satisfatórios com hidrólise enzimática mesmo com perda de açúcares (SAHA *et al.*, 2016). Pereira *et al* (2011), utilizou enzimas β -Glucosidase produzidas em laboratório utilizando atividade enzimática de 10 FPU/g em reação a 36 h para obter resultado de 45 % de conversão da celulose. Comparando com os experimentos

feitos neste trabalho, este valor é maior apenas quando comparado aos dados observados a partir do 2º mês de pré-tratamento microbiológico.

Figura 17 – Conversão da celulose do bagaço microbiologicamente pré-tratado em relação ao tempo de crescimento dos micro-organismos utilizando coquetel comercial (Cellic Ctec 2 - Novozymes) em meio tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, com pH 4,8, utilizando atividade enzimática de 10 FPU/g em substrato seco.



Fonte: elaborado pelo autor.

Em processos de produção de etanol lignocelulósico, enzimas digerem parte da parede celular vegetal para liberação dos açúcares de interesse. Quando a parede celular já está danificada por efeito de pré-tratamento microbiológico, a quebra por parte das enzimas é mais eficaz, liberando mais açúcares e aumentando a quantidade do produto final. A combinação de pré-tratamento microbiológico com o químico se mostrou mais eficiente do que o tratamento químico por si só: o cultivo de *E. taxodii* (coletado na Reserva Natural de Shennongjia) por 10 dias com ácido sulfúrico 0,25 % em Jacinto-de-água foi mais eficiente que o tratamento químico, apenas. A produção de etanol após este processo aumentou significativamente (MA *et al.*, 2010)

Resultados semelhantes foram obtidos com *Pleurotus ostreatus* (BP-035): quando cultivado em casca de arroz, o pré-tratamento microbiológico (18 dias de cultivo) junto ao pré-tratamento químico (peróxido de hidrogênio 2 % por 48 h) foram

mais eficazes em comparação à somente o pré-tratamento microbiológico por 60 dias. Neste caso, também houve diminuição recalcitrância do material, o que possibilitou melhorar a eficácia das conversões baseadas em enzimas de materiais lignocelulósicos (YU *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÕES

A utilização do tratamento microbiológico para a deslignificação da biomassa lignocelulósica gerou modificação no teor dos carboidratos e lignina presentes na parede celular. A extração de xilana após o pré-tratamento microbiológico relacionado ao *C. puteana* com peróxido de hidrogênio 3 % (0,71 g de xilana extraída) teve resultados semelhantes ao tratamento com 6 % (0,82g de xilana extraída) de reagente, o que mostra redução na recalcitrância da biomassa. Todos os fungos em estudo modificaram o material lignocelulósico provocando melhora na extração de xilana, exceto para o *A. fumigatus*. A extração de xilana após o tratamento com *G. trabeum* e *C. puteana* apresentou os melhores resultados, chegando a 99,74 %.

A redução na recalcitrância permitiu uma maior conversão da celulose em glicose dos materiais pré-tratados com todos os micro-organismos. O melhor período de crescimento que levou a melhor rendimento em glicose na hidrólise enzimática foi de um mês, diminuindo o rendimento de glicose com o aumento do período de crescimento dos fungos no bagaço.

O crescimento dos fungos no bagaço apresentou diminuição na porcentagem dos polissacarídeos (celulose e xilana), e conseqüentemente aumento no teor de lignina, no entanto, a quantidade de xilana extraída em porcentagem foi maior, novamente devido à diminuição da recalcitrância do material.

O pré-tratamento microbiológico provocou diminuição na recalcitrância da biomassa, resultando em um aumento na porcentagem de extração de xilana e maior digestibilidade da celulose no material pré-tratado.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. C. **Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na solubilização de hemicelulose e produção de açúcares fermentáveis**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia Aplicada)). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, SP.
- ASLAN, A. The casual relationship between biomass energy use and economic growth in the United States. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 362-366, 2016.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.
- BILGILI, F.; KOÇAK, E.; BULUT, Ü.; KUSKAYA, S. Can biomass energy be an efficient policy tool for sustainable development? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. v. 71, p. 830-845, 2016.
- BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLET, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, p. 550-583, 2013.
- BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GORGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable energy**, v. 104, p. 271-280, 2017.
- BRIENZO, M.; SILVA, E. M.; MILAGRES, A. M. F. Degradation of eucalypt waste components by *Lentinula edodes* strains detected by chemical and near-infrared spectroscopy methods. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 141, p. 37-49, 2007.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 199-204, 2009.
- BRIENZO, M.; TYHODA, L.; BENJAMIN, Y.; GORGENS, J. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, v. 32, p. 253-262, 2015.
- BUSSE-WICHER, M.; GRANTHAM, N. J.; LYCZAKOWSKI, J. J.; NIKOLOVSKI, N.; DUPREE, P. Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 74-78, 2016.
- CANILHA, L.; RODRIGUES, R. de C. L. B.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. dos S.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. da; Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. *In*: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. da (ed.). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - Techniques, applications and commercialization**, IntechOpen, 2013. p. 15-45.

CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 94-97, 2004.

CLEVELAND, T. E.; YU, J.; FEDOROVA, N.; BHATNAGAR, D.; PAYNE, G. A.; NIERMAN, W. C.; BENNETT J. W. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, v. 27(3), p. 151-157, 2009

COELHO, B. C. S. **Pré-tratamento biológico da palha de cana-de-açúcar e posterior associação ao tratamento ácido ou hidrotérmico para a obtenção de glicose**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. 83p.

CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR - Safra 2019/20 - Segundo levantamento, agosto de 2019. 2019.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

CURRELI, N.; FADDA, M. B.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A. C.; SODDU, G.; SOLLAI, F.; VACCARGIU, S.; SANJUST, E. RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process biochemistry*, v. 32, n. 8, p. 665-670, 1997.

DAS, A.; PAUL, T.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource technology*, v. 128, p. 290-296, 2013.

DAS, P.; GANESH, A.; WANGIKAR, P. Influence of pretreatment for deashing of sugarcane bagasse on pyrolysis products. *Biomass and Bioenergy*, v. 27, p. 445-457, 2004.

DE FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 18 p. 100184. 2019.

DE VASCONCELOS, J. N. Ethanol Fermentation. *In*: SANTOS, F.; CALDAS, C.; BORÉM, A. **Sugarcane**. Academic Press, 2015. p. 311-340.

DONG, H.; SNYDER, J. F.; TRAN, D. T.; LEADORE, J. L. Hydrogel, aerogel and film of cellulose nanofibrils functionalized with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p. 760-767, 2013.

EFFENDI, A.; GERHAUSER, H.; BRIDGWATER, A. V. Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 12(8), p. 2092-2116, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Ney York: W. de Gruyter, 1984, p. 613.

FERNANDES, E. S. **Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia Aplicada)). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, SP.

FERREIRA, L. M.; BLANES, L.; GRAGNANI, A.; VEIGA, D. F.; VEIGA, F. P.; NERY, G. B.; ROCHA, G. H. H. R.; GOMES, H. C.; ROCHA, M. G. OKAMOTO, R. Hemicellulose dressing versus rayon dressing in the re-epithelialization of split-thickness skin graft donor sites: a multicenter study. *Journal of tissue viability*, v. 18, n. 3, p. 88-94, 2009.

FILLEY, T. R.; CODY, G. D.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; NOSER, C.; OSTROFSKY, A. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Organic Geochemistry*, V. 33, P. 111-124, 2002.

FRY, S. C. The Structure and Functions of Xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, v. 40, n. 210, p. 1-11, 1989.

GALLETTI, A. M. R.; ANTONETTI, C. Biomass pretreatment: separation of cellulose, hemicellulose and lignin-existing technologies and perspectives. *In*: ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; DUMEIGNIL, F. **Biorefinery: From Biomass to Chemicals and Fuels.** De Gruyter, 2012. p. 101-111.

GAO, Z.; MORI, T.; KONDO, R. The pretreatment of corn stover with *Gloeophyllum trabeum* KU-41 for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*, v. 5, n. 1, p. 28, 2012.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 8, n. 34, 2005. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>>.

GIUMMARELLA, N.; LAWOKO, M. Structural basis for the formation and regulation of lignin-xylan bonds in birch. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 4, n. 10, p. 5319-5326, 2016.

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

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Model studies of ferulate– coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 21, p. 6008-6016, 2002.

HATAKKA, A.; HAMMEL, K. E. Fungal biodegradation of lignocelluloses. *In*: Hofrichter, M. (ed.). **Industrial applications.** Berlim: Springer, Heidelberg, 2011. p. 319-340. (The Mycota - A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, v. 10).

HEINZE, T.; KOSCHELLA, A.; Carboxymethyl ethers of cellulose and starch—a review. In: MACROMOLECULAR SYMPOSIA, 2005, Weinheim. **Wiley vch**, p. 13-40.

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignina biochemistry. **Journal of wood Science**, v. 52, p. 2-8, 2006.

HIMMEL, M. E.; DING, S.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.;

BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

ILEKTI, P.; MONDET, J.; TOURNILHAC, F. Use of modified cellulose derivatives as thickening agent for the organic phase of a nail varnish composition. U.S. Patent Application n. 10/883,819, 12 maio 2005.

IOELOVICH, M. Ya. Models of supramolecular structure and properties of cellulose. **Polymer Science**, Series A, v. 58, n. 6, p. 925–943, 2016.

IRBE, I.; ANDERSONS, B.; CHIRKOVA, J.; KALLAVUS, U.; ANDERSONE, I.; FAIX, O. On the changes of pinewood (*Pinus sylvestris* L.) chemical composition and ultrastructure during the attack by brown-rot fungi *Postia placenta* and *Coniophora puteana*. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 57, p. 99-106, 2006.

IRBE, I.; ELISASHVILI, V.; ASATIANI, M. D.; JANBERGA, A.; ANDERSONE, I.; ANDERSONS, B.; BIZIKS, V.; GRININS, J. Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 71-78, 2014.

ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; SCHELL, D. F.; JOHNSON, D. K. Porosity and Its Effect on the Digestibility of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 55, n. 7, p. 2575-2581, 2007.

KAČURÁKOVÁ, M.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; WILSON, R. H.; BELTON, P. S. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 35-41, 1999.

KADLA, J. F.; CHANG, H. The reaction of peroxides with lignina and lignina model compounds, In: ARGYROPOULOS, D.S. **Oxidative delignification chemistry: fundamentals and catalysis**. Washington: Ed. McGill University, American Chemical Society, 2001, p. 108-129. ACS Symposium series 785.

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**, V. 56, P. 679-689, 2013.

KATAHIRA, R.; ELDER, T. J.; BECKHAM, G. T. A brief introduction to lignin structure. **Lignin Valorization: Emerging Approaches**, v. 19, p. 1, 2018.
KEEGSTRA, K. Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 483-486, 2010.

KEREM, Z.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. **FEBS letters**, v. 446, n. 1, p. 49-54, 1999.

KIM, J.; MUN, S.; KO, H.; YUN, G.; KIM, J. Disposable chemical sensors and biosensors made on cellulose paper. **Nanotechnology**, v. 25, n. 9, p. 092001, 2014.

KIM, J.; YUN, S.; MAHADEVA, S. K.; YUN, K.; YANG, S. Y.; MANIRUZZAMAN, M. Paper Actuators Made with Cellulose and Hybrid Materials. **Sensors**, v. 10, p. 1473-1485, 2010.

KLEMM, D.; SCHMAUDER, H.; HEINZE, T. Cellulose. **Biopolymers Online: Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications**, v. 6, p. 275-287, 2005.

KUIJK, S. J. A. van; SONNENBERG, A. S. M.; BAARS, J. J. P.; HENDRIKS, W. H.; CONE, J. W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 191-202, 2015.

KUMAR, P.; BARRETT, D., M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 377–391, 2008.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1–24, 1997.

LEE, K. H.; WI, S. G.; SINGH, A. P.; KIM, Y. S. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **J Wood Sci**, v. 50, p. 281–284, 2004.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LIU, S. Chemical kinetics of alkaline peroxide brightening of mechanical pulps. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 2229-2244, 2003.

MA, F; YANG, N.; XU, C.; YU, H.; WU, J.; ZHANG, X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource technology**, v. 101, p. 9600-9604, 2010.

MAO, G.; ZOU, H.; CHEN, G.; DU, H.; ZUO, J. Past, current and future of biomass energy research: a bibliometric analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1823-1833, 2015.

MARTÍNEZ, Á. T. et al. Biodegradation of lignocellulose: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin Lignocellulosic materials. **International Microbiology**, v. 8, p. 195–204, 2005.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E. Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 2–3, p. 59–83, 2004.

MATTHEWS, S. Structural changes of rice straw pre-treated with *Paenibacillus* and *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Agricultural and Food Research**, v. 5 (4), 2016.

MELANDRI, D.; ANGELIS, A. de; ORIOLI, R.; PONZIELLI, G.; LUALDI, P.; GIARRATANA, N.; REINER, V. Use of a new hemicellulose dressing (Veloderm) for the treatment of split-thickness skin graft donor sites: A within-patient controlled study. **Burns**, v. 32, p. 964-972, 2006.

MELATI, R. B.; SHIMIZU, F. L.; OLIVEIRA, G.; PAGNOCCA, F. C.; SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; BRIENZO, M. Key Factors Affecting the Recalcitrance and Conversion Process of Biomass. **BioEnergy Research**, v. 12, p. 1-20, 2019.

MESTER, T.; VARELA, E.; TIEN, M. Wood Degradation by Brown-Rot and White-Rot Fungi. In: KÜCK, U. (ed.). **Genetics and Biotechnology**. Berlin: Springer, Heidelberg, 2004, p. 355-368. (The Mycota - A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, v. 2).

MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. **Ecology of pesticides**. New York: John Wiley, 1978.

MIZUHASHI, H.; KAMIJO, M.; YOSHIDA, H.; TAMAKI, H. Investigation of Comfort of Uniform Shirt Made of Cellulose Considering Environmental Load. In: SAEED, K.; HOMENDA, W. **IFIP International Conference on Computer Information Systems and Industrial Management**. Varsóvia: Springer, Cham, 2015, p. 527-538.

MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do; MELO, D. C. de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **R. Árvore**, Viçosa - MG, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

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

MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913–1923, 2006.

MYERS, M. B.; HOOD, J. J. Pellets and briquets from compacted biomass. U.S. Patent Application n. 12/786,774, 2 dez. 2010.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28-41, 2018.

NANDA, S.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 925–941, 2015.

NOVO, L. P.; GURGEL, L. V. A.; MARABEZEI, K.; CURVELO, A. A. S. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol–water mixtures to produce pulps for saccharification. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10040-10046, 2011.

PAMIDIPATI, S.; AHMED, A. Cellulase stimulation during biodegradation of lignocellulosic residues at increased biomass loading. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 4, p. 261-267, 2019.

PAPADOPOULOS, A. N.; HILL, C. A. S. The biological effectiveness of wood modified with linear chain carboxylic acid anhydrides against *Coniophora puteana*. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v. 60, n. 5, p. 329-332, 2002.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. de. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 107–112, 2001.

PETZOLD-WELCKE, K.; SCHWIKAL, K.; DAUS, S.; HEINZE, T. Xylan derivatives and their application potential – Mini-review of own results. **Carbohydrate polymers**, v. 100, p. 80-88, 2012.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J. M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S. A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29–60, 2004.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330–340, 2017.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

RILEY, R.; SALAMOVA, A. A.; BROWN, D. W.; NAGYC, L. G.; FLOUDAS, D.; HELD, B. W.; LEVASSEUR, A.; LOMBARD, V.; MORIN, E.; OTILLAR, R.;

LINDQUIST, E. A.; SUN, H.; LABUTTI, K. M.; SCHMUTZ, J.; JABBOUR, D.; LUO, H.; BAKER, S. E.; PISABARROK, A. G.; WALTON, J. D.; BLANCHETTE, R. A.; HENRISSAT, B.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; HIBBETT, D. S.; GRIGORIEV, I. V. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *PNAS*, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 30, p. 279–291, 2003.

SAHA, B. C.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 109, p. 29-35, 2016.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, S. X. dos. **Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da estação ecológica do Noroeste Paulista–São José do Rio Preto/Mirassol, SP.** 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada). Tese de Doutorado. UNESP, Rio Claro, SP. 222p.

SAVOVA, D.; APAK, E.; EKINCI, E.; YARDIM, F.; PETROV, N.; BUDINOVA, T.; RAZVIGOROVA, M.; MINKOVA, V. Biomass conversion to carbon adsorbents and gas. *Biomass and Bioenergy*, v. 21, p. 133–142, 2001.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and biomass valorization*, v. 10, n. 2, p. 235-251, 2019.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J., **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**: second edition. New York: Artmed Editora, 1988

SILVA, A. E. da; MARCELINO, H. R.; GOMES, M. C. S.; OLIVEIRA, E. E.; NAGASHIMA, T. Jr.; EGITO, E. S. T. Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use. *Products and Applications of Biopolymers*, p. 61-84, 2012.

SILVA, C. H. C.; PULS, J.; DE SOUSA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 114-119, 1999.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 76-82, 2016.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 195-204, 2004.

SZAKACS, G.; TENGEDY, R. P. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 13, p. 487-490, 1997.

TANIGUCHI, M. et al. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637–643, 2005.

TARKOW, H.; FEIST, W. C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. **Advances in Chemistry Series**, n. 95, p. 197, 1969.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses: part I. In: **ADVANCES IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY**. Academic Press, 1964. p. 247-302.

TOKLU, E. Biomass energy potential and utilization in Turkey. **Renewable Energy**, v. 107, p. 235-244, 2017.

TROJANOWSKI, L. Biological degradation of lignin. **Int Biodeterior. Biodegr.**, v. 48, p. 213-218, 2001.

TRONCHET, M.; BALAGUÉ, C.; KROJ, T.; JOUANIN, L.; ROBY, D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 83–92, 2010.

VALLEJOS, M. E.; FELISSIA, F. E.; KRUYENISKI, J.; AREA, M. C. Kinetic study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 1-6, 2015.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895-905, 2010.

WAHAB, M. A.; HABOUZIT, F.; BERNET, N.; STEYER, J.; JEDIDI, N.; ESCUDIÉ, R. Sequential operation of a hybrid anaerobic reactor using a lignocellulosic biomass as biofilm support. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 150–155, 2014.

WEIL, J.; WESTGATE, P.; KOHLMANN, K.; LADISCH, M. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p. 1002-1004, 1994.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemical biotechnology**, v. 157, p. 174-209, 2009

WUBAH, D.; AKIN, D.; BORNEMAN, W. Biology, Fiber-degradation and Enzymology of Anaerobic Zoosporic Fungi. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 19, p. 99-115, 1993.

WYMAN, C. E. Alternative Fuels from Biomass and Their Impact on Carbon Dioxide Accumulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45/46, p. 897-915, 1994.

XIMENES, E. A.; FELIX, C. R.; ULHOA, C. J. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucosidase. **Current Microbiology**, v. 32, p. 119-123, 1996.

XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. *In*: SUN, R. **Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose**, Elsevier, 2010, p. 9-47.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource technology**, v. 100, p. 903-908, 2009.

ZAR, J. H., **Biostatistical Analysis**: Fourth edition. New Jersey: Interactive Composition Corporation, 1999.

ZENG, J.; SINGH, D.; CHEN, S. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. **Bioresource technology**, v. 102, p. 3206-3214, 2011.

ZENG, J.; SINGH, D.; GAO, D.; CHEN, S. Effects of lignin modification on wheat straw cell wall deconstruction by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 161, 2014.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014.