



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES JEQUITINHONHA E MUCURI  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS**



**PATRISIA DE OLIVEIRA RODRIGUES**

*Ação sinérgica de celulasas e hemicelulasas fúngicas na hidrólise  
do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino*

**UBERLÂNDIA**

**2016**

**PATRISIA DE OLIVEIRA RODRIGUES**

**Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise  
do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Área de concentração: Biomassas energéticas: ciência e tecnologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Milla Alves Baffi

**UBERLÂNDIA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R696a      Rodrigues, Patrícia de Oliveira, 1976-  
2016      Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise  
do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino / Patrícia de  
Oliveira Rodrigues. - 2016.

77 f. : il.

Orientadora: Milla Alves Baffi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Pós-  
Graduação em Biocombustíveis.

Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis - Teses. 2. *Aspergillus* - Teses. 3. Hidrólise -  
Teses. 4. Bagaço de cana - Teses. I. Baffi, Milla Alves. II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Biocombustíveis. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 04/PPBIC.

DATA: 17/02/2016

DISCENTE: Patrícia de Oliveira Rodrigues

MATRÍCULA: 11412PGB004

TÍTULO DO TRABALHO: Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino.


ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis


LINHA DE PESQUISA: Biomassas energéticas - Ciência e Tecnologia

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioprodutos químicos de valor agregado.

Às quatorze horas do dia dezessete fevereiro do ano dois mil e dezesseis, no Auditório do Bloco 4k, no Campus Umuarama, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Leandro Vinícius Alves Gurgel, da Universidade Federal de Ouro Preto, Douglas Queiroz Santos, da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, e Milla Alves Baffi, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel  
UFOP

  
Prof. Dr. Douglas Queiroz Santos  
ESTES-UFU

  
Orientador(a): Profa. Dra. Milla Alves Baffi – ICIAG / UFU

*Dedico esse trabalho ao meu pai Walter e minha  
mãe Lindomar por ter mostrado a mim e aos  
meus irmãos a importância de estudar.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, seu filho Jesus Cristo e à Virgem Maria por terem me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, que com toda dificuldade sempre apoiaram a mim e a meus irmãos nos estudos.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Milla Alves Baffi pela paciência em me orientar e por acreditar na minha capacidade em realizar esse trabalho.

Agradeço também ao Prof. Dr. Douglas Queiroz Santos que me incentivou a fazer a seleção para o Mestrado em Biocombustíveis.

Ao Prof. Dr. Daniel Pasquini pelo auxílio durante a execução do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Um agradecimento especial a minha primeira orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Celine de Melo que me ensinou a dar os primeiros passos na pesquisa, com trabalhos realizados na Ecologia.

Aos colegas de laboratório que contribuíram direta e indiretamente com o trabalho. Em especial, à Mariana Alves Henrique e Bruna Lannes Bernardes pelo apoio na pesquisa.

Agradeço às técnicas do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Beatriz e Júlia pelo carinho e paciência.

Agradeço também à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso e Janaína Fischer que gentilmente cederam alguns equipamentos para a realização desse trabalho.

À Josiani de Cássia Pereira, aluna de doutorado da UNESP de São José do Rio Preto pela contribuição na pesquisa.

Um agradecimento especial aos amigos do curso técnico Adeon, Bruno, Silvano e em especial à Gabriela pelas conversas.

Às minhas queridas amigas de graduação que tanto contribuíram para que eu chegasse aqui: M<sup>a</sup> Giselle Alves Bastos, M<sup>a</sup> Mariana Ribeiro Borges e M<sup>a</sup> Renata Ferreira de Resende.

Aos amigos Dr<sup>a</sup> Roseane Máximo Silva, Dr<sup>a</sup> Lilian Mara Silva e Thiago Rende, companheiros de estudos há mais de 12 anos, com quem eu renovava minhas esperanças a cada reprovação no vestibular. Nunca desistimos e, por isso, temos tido grandes conquistas.

Por último, quero aqui deixar meu muito obrigado à Eleusa Cristina de Brito por tudo que sempre fez e fará por mim. Uma irmã que Deus me deu a honra de conhecer.

A todos você o meu carinho e agradecimento!

*“Nada é impossível para aquele que persiste.”*

*Alexandre, o Grande.*

## RESUMO

A hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando enzimas microbianas tem sido alvo de pesquisas no Brasil e no mundo na busca de elevados rendimentos em açúcares fermentescíveis. Neste trabalho, avaliou-se a eficiência sinérgica de extratos enzimáticos brutos produzidos por linhagens fúngicas das espécies *Aspergillus fumigatus* (SCBM6) e *Aspergillus niger* (SCBM1) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar previamente submetido ao pré-tratamento alcalino. Os extratos enzimáticos produzidos por Fermentação em Estado Sólido (FES) apresentaram altas concentrações de três enzimas fundamentais no processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica:  $\beta$ -glicosidase (linhagem SCBM6 com 78,47 U/g e SCBM1 com 73,0 U/g),  $\beta$ -xilosidase (produzida apenas por SCBM1 com 78,0 U/g) e xilanase (linhagens SCBM6 e SCBM1 com 1774,50 e 3289,58 U/g, respectivamente). O pré-tratamento do bagaço de cana com hidróxido de sódio 2 % foi eficaz na remoção da lignina, reduzindo de 26,14 % no bagaço bruto (BB) para 14,9 % no bagaço tratado (BT), na preservação da fração celulósica (54,36 % em BB e 75,04 % em BT) e aumentou a porosidade das fibras. O bagaço pré-tratado (BT) foi submetido a 30 diferentes condições de hidrólise utilizando os extratos enzimáticos produzidos por *A. fumigatus* SCBM6 (EAF) e *A. niger* SCBM1 (EAN). As condições de hidrólises foram delineadas através da metodologia de superfície de resposta, variando tempo, temperatura, concentração de substrato e razão de extratos brutos nos coquetéis enzimáticos. O maior rendimento (28,66 %) em açúcares redutores totais (ART) foi obtido após hidrólise realizada por 12 horas a 47 °C, com 1U/g de  $\beta$ -glicosidase de cada extrato, 2,2 % de bagaço e razão de extratos enzimáticos EAF/EAN de 25/75%. Na quantificação de monossacarídeos liberados nos hidrolisados, os valores máximos obtidos foram: 135,59 mg de xilose /g de hemicelulose, 58,01 mg de arabinose /g de hemicelulose e 20,18 mg de glicose /g de celulose. Após hidrólise utilizando extratos enzimáticos concentrados (10U/g de  $\beta$ -glicosidase de cada extrato), as concentrações das pentoses liberadas aumentaram consideravelmente (xilose 694,45 mg/g e arabinose 4715,01 mg/g de hemicelulose).

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, hidrólise enzimática, bagaço de cana, pré-tratamento alcalino, etanol 2G.



## ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes using microbial enzymes has been the target of research in Brazil and in the world with the aim to obtain high yields in fermentable sugars. In this work, the synergistic efficiency of crude enzymatic extracts produced by *Aspergillus fumigatus* (SCBM6) and *Aspergillus niger* (SCBM1) fungal strains was evaluated in the hydrolysis of sugarcane bagasse previously subjected to alkaline pre-treatment. Extracts produced by Solid State fermentation (SSF) showed high concentrations of three major enzymes in saccharification processes of lignocellulosic biomass:  $\beta$ -glucosidase (SCBM6 strain with 78.47 U/g and SCBM1 with 73.0 U/g),  $\beta$ -xylosidase (produced only by SCBM1 strain: 78.0 U/g) and xylanase (SCBM6 and SCBM1 with 1774.50 and 3289.58 U/g, respectively). The alkaline pretreatment of sugarcane bagasse with 2% sodium hydroxide was successful in the lignin removal, with a reduction from 26.14 at *in natura* bagasse (BB) to 14.9% in treated bagasse (BT), in the preservation of the cellulose fraction (from 54.36% in BB to 75.04% in BT) and in the increased porosity of the fibers. The pretreated sugarcane bagasse (BT) was submitted to 30 different conditions of hydrolysis using crude enzymatic extracts produced by *A. fumigatus* SCBM6 (designated EAF) and *A. niger* SCBM1 (EAN). The hydrolysis conditions were delineated by Surface Response methodology, varying the time, temperature, substrate concentration and ratio of extracts in the enzymatic cocktails. The maximum yield (28.66%) of total reducing sugars (TRS) was obtained after hydrolysis carried out during 12 hours, at 47°C, with 1U/g of  $\beta$ -glucosidase of each extract, 2.2% bagasse and ratio of EAN/EAF extracts of 25/75%. The quantification of the released monossacharides showed 135.59 mg xylose / g hemicellulose, 58.01 mg arabinose / g hemicellulose and 20.18 mg glucose / g cellulose. After hydrolysis using concentrated enzymatic extracts (10U/g of  $\beta$ -glucosidase of each extract), the concentration of the released pentoses increased considerably (xylose 694.45 mg/g and arabinose 4715.01 mg/g hemicellulose).

Key-words: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, enzymatic hydrolysis, sugarcane bagasse, alkaline pretreatment, second generation etanol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Efeito do pré-tratamento nas fibras de resíduos lignocelulósicos.....	17
<b>Figura 2</b> – A: Polímero de celulose com as ligações glicosídicas $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) entre resíduos de $\beta$ -D-glicose e B: Representação das regiões cristalina e amorfa. ....	19
<b>Figura 3</b> – Ligações de hidrogênio nas cadeias da celulose .....	20
<b>Figura 4</b> – Unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses. ....	21
<b>Figura 5</b> – Pontos de atuação de enzimas na cadeia de xilana. Ac - grupo acetil; Arab - L-arabinofuranose; MeGIA - ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil - D-xilose. ....	22
<b>Figura 6</b> – Estrutura dos álcoois precursores da lignina: a) – álcool p-cumarílico; b) – álcool coniferílico; c) – álcool sinapílico. ....	23
<b>Figura 7</b> – Estrutura representativa da lignina proposta por Adler em 1977.....	23
<b>Figura 8</b> – Esquema geral da desestruturação do complexo lignocelulósico. ....	24
<b>Figura 9</b> – Representação simplificada da ação do complexo celulolítico.....	27
<b>Figura 10</b> – Pré-inóculos de <i>A. fumigatus</i> (SCBM6) e <i>A. niger</i> (SCBM1). ....	32
<b>Figura 11</b> – Inóculos de <i>A. fumigatus</i> (SCBM6) e <i>A. niger</i> (SCBM1) para crescimento por FES. ....	33
<b>Figura 12</b> – Produção de enzimas por FES pela linhagem SCBM6 de <i>A. fumigatus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 g/g). A: $\beta$ -glicosidase e B: xilanase.....	45
<b>Figura 13</b> – Produção de enzimas por FES pela linhagem SCBM1 de <i>A. niger</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. A: $\beta$ -glicosidase, B: $\beta$ -xilosidase e C: xilanase...45	45
<b>Figura 14</b> – Eletromicrografia de varredura do bagaço de cana-de-açúcar bruto (A e B) e tratado (C e D). A e C: aumento de 200x, B e D aumento de 1000x. ....	47
<b>Figura 15</b> – Difratoograma obtido das amostras de bagaço bruto (BB) e bagaço tratado (BT). ....	50
<b>Figura 16</b> – Análise termogravimétrica no bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT). A – termogramas de BB e BT; B – Picos de degradação máxima em BB; C – Picos de degradação máxima em BT. ....	52
<b>Figura 17</b> – Superfície de resposta para rendimento de xilose (%) obtido a partir da relação entre as variáveis: A: temperatura x tempo; B: concentração de bagaço x tempo; C: razão extrato EAF/EAN x tempo; D: concentração de bagaço x temperatura; E: razão de extrato EAF/EAN x temperatura; F: razão de extrato EAF/EAN x concentração de bagaço. ....	59

<b>Figura 18</b> – Superfície de resposta do rendimento de glicose (%) obtido a partir da relação entre as variáveis: A: temperatura x tempo; B: concentração bagaço x tempo; C: razão de extrato EAF/EAN x tempo; D: concentração bagaço x temperatura; E: razão de extrato EAF/EAN x temperatura; F: razão de extrato EAF/EAN x concentração de bagaço. ....	60
<b>Figura 19</b> – pH ótimo para a enzima $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN e EAF (extratos enzimáticos brutos produzidos por <i>A. niger</i> e <i>A. fumigatus</i> , respectivamente).....	61
<b>Figura 20</b> – Temperatura ótima para enzima $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN ( <i>A. niger</i> ) e EAF ( <i>A. fumigatus</i> ). ....	62
<b>Figura 21</b> – pH de estabilidade da enzima $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN ( <i>A. niger</i> ) e EAF ( <i>A. fumigatus</i> ) .....	63
<b>Figura 22</b> – Termoestabilidade da enzima $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN ( <i>A. niger</i> ) e EAF ( <i>A. fumigatus</i> ) após 1 hora de incubação.....	63
<b>Figura 23</b> – Avaliação da atividade residual da $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN ( <i>A. niger</i> ) e EAF ( <i>A. fumigatus</i> ), na temperatura de 50 °C. ....	64
<b>Figura 24</b> – Monossacarídeos liberados após hidrólises realizadas com extrato de enzima comercial (ExC) (Celic Ctec 3) e extrato enzimático bruto concentrado (ExBC). ....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores aplicados em cada nível das variáveis analisadas no processo de hidrólise .....	41
<b>Tabela 2</b> – Composição química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT).....	48
<b>Tabela 3</b> – Açúcares redutores totais (ART) após hidrólises enzimáticas em cada um dos experimentos realizados por Planejamento de Composto Central (PPC) (2 <sup>4</sup> ).. .....	53
<b>Tabela 4</b> – Dissacarídeo e monossacarídeos liberados nas hidrólises de cada um dos experimentos realizados por Planejamento de Composto Central (PPC).....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcares Redutores Totais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PTA	Pré-tratamento Alcalino
EC 3.2.1.4	Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase
EC 3.2.1.91	1,4- $\beta$ -Celobiohidrolase
EC 3.2.1.21	$\beta$ -Glicosidase
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- $\beta$ -xilanase
EC 3.2.1.37	Xilana 1,4- $\beta$ -xilosidase
SCBM	Sugarcane Bagasse Mesophilic Shain
BB	Bagaço Bruto
BT	Bagaço Tratado
DNS	Ácido-dinitrosalissílico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	High Efficiency Liquid Chromatography
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
Ic	Índice de Cristalinidade
DRX	Difração de Raio-X
TGA	Análise Termogravimétrica
FES	Fermentação em Estado Sólido
EAF	Extrato enzimático bruto produzido por <i>Aspergillus fumigatus</i>
EAN	Extrato enzimático bruto produzido por <i>Aspergillus niger</i>
PNPG	$\rho$ -nitrofenil $\beta$ -D-glicopiranosídeo
$\rho$ NP	$\rho$ -Nitrofenol
PNPX	$\rho$ -Nitrofenil $\beta$ -D-xilopiranosídeo
PPC	Planejamento de Composto Central

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS</b> .....	16
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1 Resíduos Lignocelulósicos .....	18
2.2 Celulose, hemiceluloses e lignina .....	18
2.3 Pré-tratamentos .....	24
2.3.1 Pré-tratamento alcalino .....	25
2.4 Microrganismos produtores de enzimas .....	26
2.5 Enzimas hidrolíticas .....	27
2.5.1 Celulases e Hemicelulases .....	27
2.6 Hidrólise.....	28
2.6.1 Hidrólise enzimática.....	29
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	31
3.1 Objetivos específicos .....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	32
4.1.1 Microrganismos.....	32
4.1.2 Fermentação em Estado Sólido (FES) .....	33
4.1.3 Extração Enzimática.....	33
4.1.4 Dosagens Enzimáticas: $\beta$ -glicosidase, $\beta$ -xilosidase e xilanase .....	34
4.2 Pré-tratamento Alcalino (PTA).....	34
4.3 Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.4 Caracterização química do bagaço de cana bruto (BB) e tratado (BT) .....	35
4.4.1 Teor de lignina Klason insolúvel .....	35
4.4.2 Teor de lignina Klason solúvel.....	36
4.4.3 Teor de umidade.....	37
4.4.4 Teor de cinzas.....	37
4.4.5 Obtenção da holocelulose.....	37
4.4.6 Teor de $\alpha$ -celulose .....	38
4.4.7 Teor de hemiceluloses .....	39

4.4.8	Análise termogravimétrica (TGA)	39
4.4.9	Determinação da cristalinidade	39
4.4.10	Determinação de extrativos	40
4.5	Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado	40
4.6	Quantificação de açúcares após as hidrólises	41
4.7	Caracterização da $\beta$ -glicosidase	42
4.8	Concentração dos extratos enzimáticos e novas hidrólises com extrato enzimático concentrado e enzima comercial	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1	Produção de enzimas por FES	44
5.2	Caracterização do bagaço antes e após o pré-tratamento alcalino	46
5.2.1	Análise microscópica das fibras	46
5.2.2	Caracterização química	47
5.2.3	Teor de extrativos	49
5.2.4	Avaliação da cristalinidade	50
5.2.5	Análise termogravimétrica (TGA)	50
5.3	Hidrólise enzimática	53
5.3.1	Rendimento em Açúcares redutores totais (ART)	53
5.3.2	Rendimento em monossacarídeos e dissacarídeos	55
5.3.3	Avaliação do rendimento em xilose e glicose por Superfície de Resposta	57
5.4	Influência do pH e temperatura na atividade da $\beta$ -glicosidase	61
5.5	Hidrólises com enzima comercial e extratos enzimáticos concentrados	64
	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

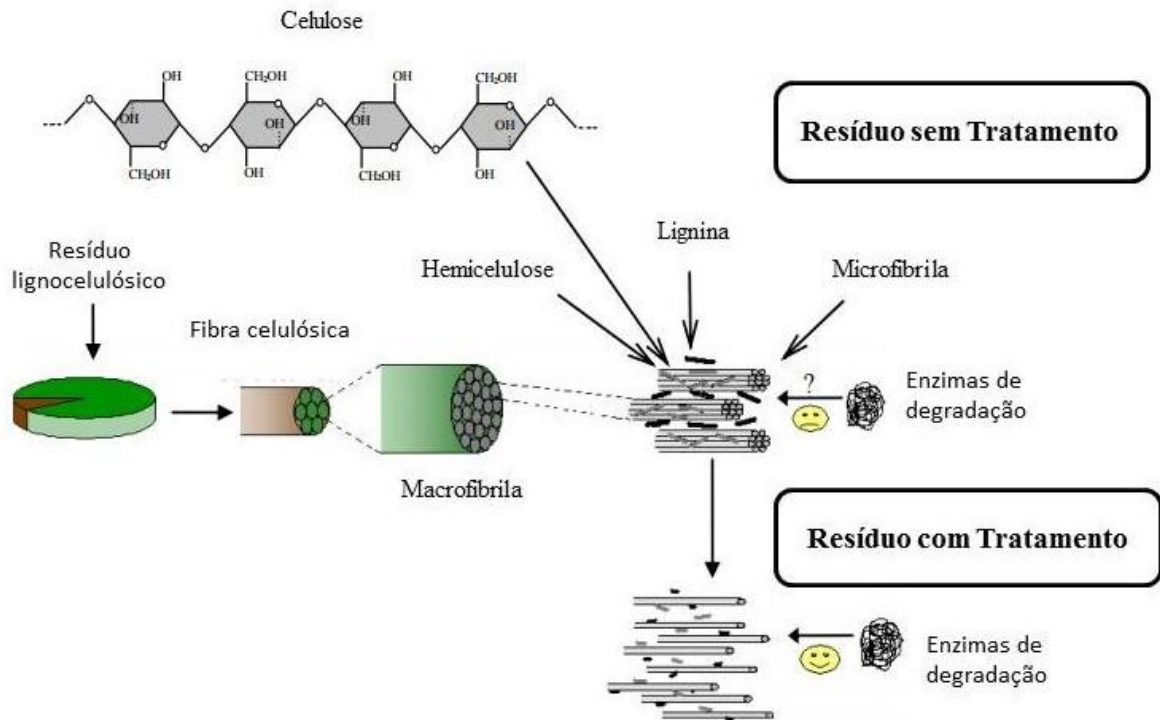
Questões ambientais severas relacionadas ao uso indiscriminado de combustíveis fósseis, à alta instabilidade no mercado do petróleo e às dúvidas em relação ao volume das reservas têm contribuído para um movimento crescente pela busca de fontes alternativas na geração de energia (MAPA/CONAB, 2008). Nesse contexto, os resíduos da agroindústria brasileira constituem uma biomassa bastante abundante, com um enorme potencial para utilização na produção de biocombustíveis. Esses resíduos, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar, podem ser reaproveitados e contribuir com a nossa matriz energética e com a diminuição de problemas ambientais, tais como o desmatamento florestal, a utilização de novas áreas de plantio e o lançamento de resíduos no ambiente (SANTOS et al., 2011).

Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento mostram que a oferta de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil, entre o 2º trimestre de 2013 e o 2º trimestre do ano de 2014, foi de 186 milhões de toneladas, sendo que deste valor, aproximadamente 50 % é utilizado para a queima para o processo de geração do etanol 1G (MAPA, 2014). O bagaço de cana é um resíduo lignocelulósico composto por celulose, hemiceluloses e lignina, cuja fração celulósica pode ser convertida em açúcares para utilização na produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico ou etanol 2G). Porém, conformação destes componentes, na parede celular do vegetal, torna essa estrutura bastante rígida e complexa, necessitando de tratamento prévio (SANTOS et al., 2012).

Para o aproveitamento do bagaço na produção de álcool combustível é necessária a despolimerização das fibras e liberação de açúcares na forma de monossacarídeos, o que pode ser realizado através de três etapas: pré-tratamento (químico, físico ou biológico), hidrólises (sacarificações) enzimáticas ou químicas dos polissacarídeos contidos nas fibras em açúcares e fermentação a etanol (RABELO, 2010; KARP et al., 2013). A primeira etapa envolvendo o pré-tratamento objetiva reduzir a associação protetora da lignina, que representa o maior obstáculo na utilização dessa biomassa, romper a estrutura cristalina da celulose e diminuir a recalcitrância da parede celular através do aumento da porosidade, facilitando assim, a degradação enzimática no processo posterior de hidrólise (Figura 1) (CHANDRA et al., 2012; KARP et al., 2013).



Figura 1: Efeito do pré-tratamento nas fibras de resíduos lignocelulósicos.



Fonte: adaptado de Taherzadeh e Karimi, 2008.

Nos últimos anos, a busca pela hidrólise efetiva de resíduos lignocelulósicos se tornou alvo de inúmeras pesquisas no Brasil e no mundo. Estudos envolvendo catálises enzimáticas têm sido desenvolvidos intensamente na busca de processos hidrolíticos com elevado rendimento em açúcares fermentescíveis e na baixa formação de produtos (CANILHA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013). Por outro lado, a utilização de enzimas nas hidrólises possui um custo elevado quando se refere ao emprego de enzimas comerciais. Para solucionar esse desafio, é importante buscar microrganismos com alto potencial de produção de enzimas fibrolíticas eficientes no processo de hidrólise e desenvolver um processo fermentativo viável economicamente (BON; FERRARA, 2007; MORETTI et al., 2012). Essas enzimas lignocelulolíticas são produzidas principalmente por fungos filamentosos e vários estudos têm sido realizados para selecionar linhagens fúngicas com uma alta taxa de produção enzimática, em especial, celulasas e hemicelulasas, que possam ser usadas em processos de sacarificação (MORETTI et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; BOONYUEN et al., 2014).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Resíduos Lignocelulósicos*

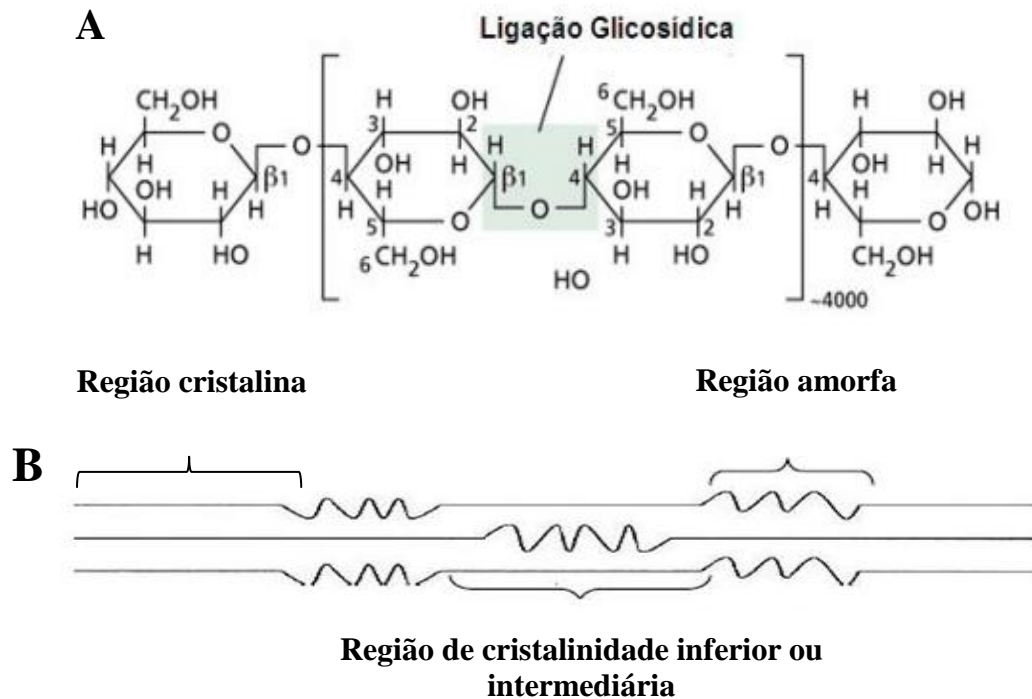
Diferentes tipos de biomassas, tanto para coprocessamentos, quanto para gerar energia, vem sendo utilizadas em todo o mundo. Novas pesquisas têm sido feitas com o objetivo de aproveitar melhor essas matérias primas como fontes renováveis de energia, bem como produtos comerciais de bioconversão e, conseqüentemente, reduzir também impactos ambientais.

No Brasil, o número de resíduos gerados pela agroindústria é grande, com destaque para o bagaço de cana-de-açúcar. Esse material é um resíduo vegetal composto por celulose, hemiceluloses e lignina (TAKAHASHI et al., 2014). Estas macromoléculas são unidas entre si principalmente por interações intermoleculares e também por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos e que correspondem a 97 - 99 % de toda massa seca dos materiais conhecidos como biomassa lignocelulósica (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

### 2.2 *Celulose, hemiceluloses e lignina*

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza, sendo o principal componente da parede celular dos vegetais e encontra-se sob uma forma fibrosa (SOUZA; SANTOS, 2002; CHANDRA et al., 2012). A celulose representa de 23 a 53 % da composição química dos vegetais e aproximadamente 40 – 50 % no bagaço de cana-de-açúcar (WANDERLEY et al., 2013; MOTAUNG e ANANDJIWALA, 2015; ROCHA et al., 2015). Este polímero é um homopolíssacarídeo linear composto basicamente por subunidades  $\beta$ -D-glicose, ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com uma unidade básica de celobiose que se repete (Figura 2A) (ARAÚJO et al., 2013). Esta macromolécula apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas e regiões menos ordenadas (de ordem de cristalinidade intermediária ou inferior) ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FARINAS, 2011) (Figura 2B).

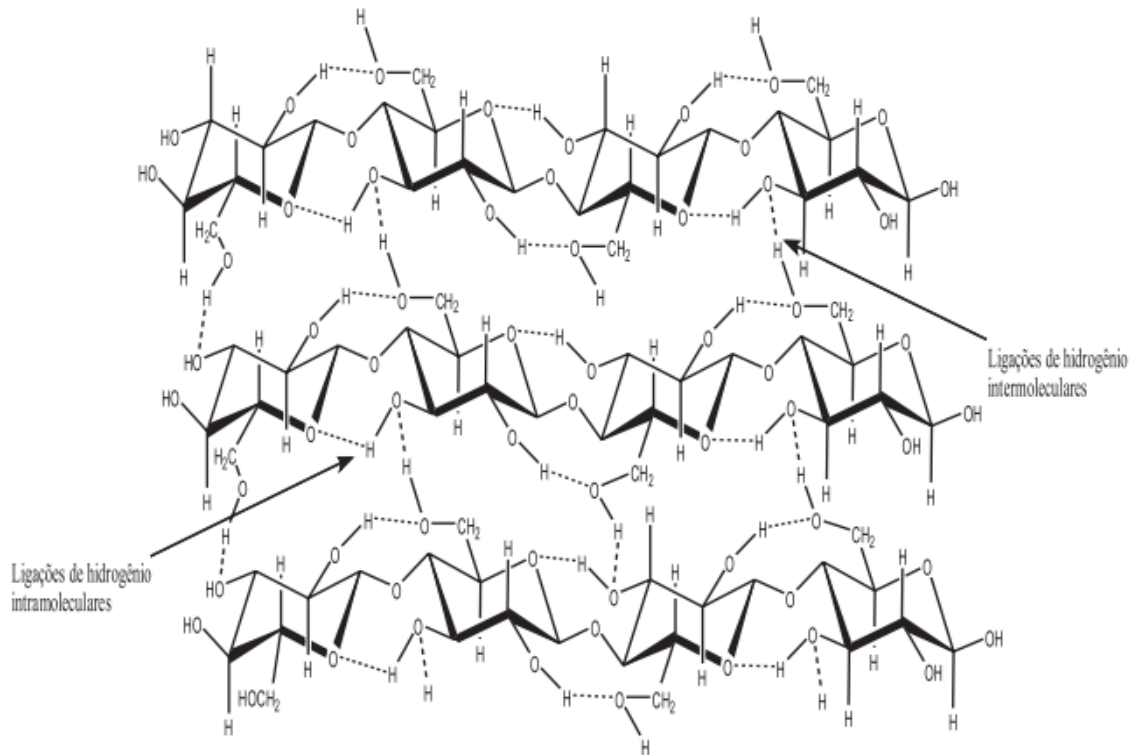
Figura 2: A: Polímero de celulose com as ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre resíduos de  $\beta$ -D-glicose e B: Representação das regiões cristalina e amorfa.



Fonte: A: Farinas, 2011; B: Moretti, 2012.

As cadeias de celulose se relacionam por interações intermoleculares de hidrogênio entre o oxigênio do anel e o grupamento hidroxila na posição 3 da molécula seguinte, entre as hidroxilas dos carbonos 2 e 6 (ligações intramoleculares) e entre as hidroxilas dos carbonos 3 e 6 (intermoleculares), conformação esta que permite que longas cadeias lineares, sejam formadas (Figura 3) (BAFFI, 2014). As microfibrilas da celulose estão associadas na forma de pacotes e estas fibrilas são ligadas umas às outras pelas hemiceluloses (CHANDRA et al., 2012).

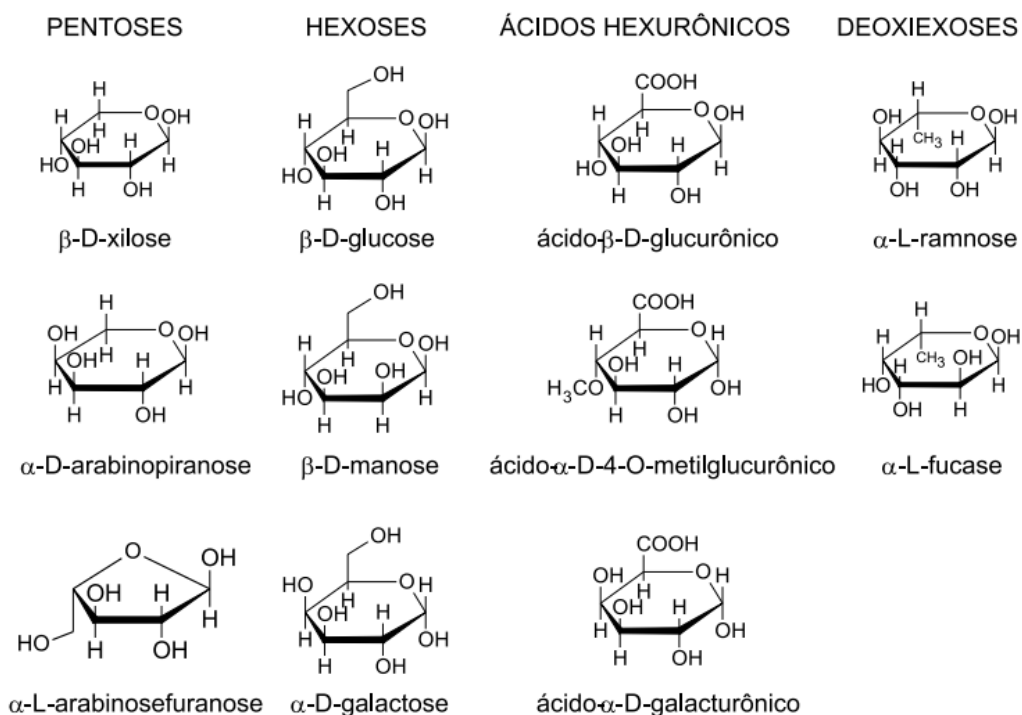
Figura 3: Ligações de hidrogênio nas cadeias da celulose.



Fonte: Santos et al., 2012.

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos, formados por vários açúcares, como: pentoses ( $\beta$ -D-xilose;  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose;  $\beta$ -D-glicose;  $\alpha$ -D-galactose) e ácidos (4-O-ácido metil glucurônico;  $\alpha$ -D-galacturônico) (Figura 3) (BALAT et al., 2008; MORAIS et al., 2010). As mais relevantes são as xilanas e glucomanas, sendo as xilanas as mais abundantes (GÍRIO et al., 2010). Em resíduos lignocelulósicos, a quantidade de hemiceluloses encontrada nos tecidos vegetais pode variar em função da espécie, do estágio de crescimento e das condições ambientais (BRIENZO, 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, esse valor pode variar entre 19 a 24% (SANTOS et al., 2012). Ao contrário da celulose que possui regiões cristalinas e amorfas, as hemiceluloses são formadas apenas por regiões amorfas (SANTOS et al., 2012). Uma de suas funções é ligar as fibrilas de celulose a lignina, envolvendo a celulose e formando uma barreira física natural, conferindo uma proteção contra ataques enzimáticos (PHILIPPINI, 2012).

Figura 4: Unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses.

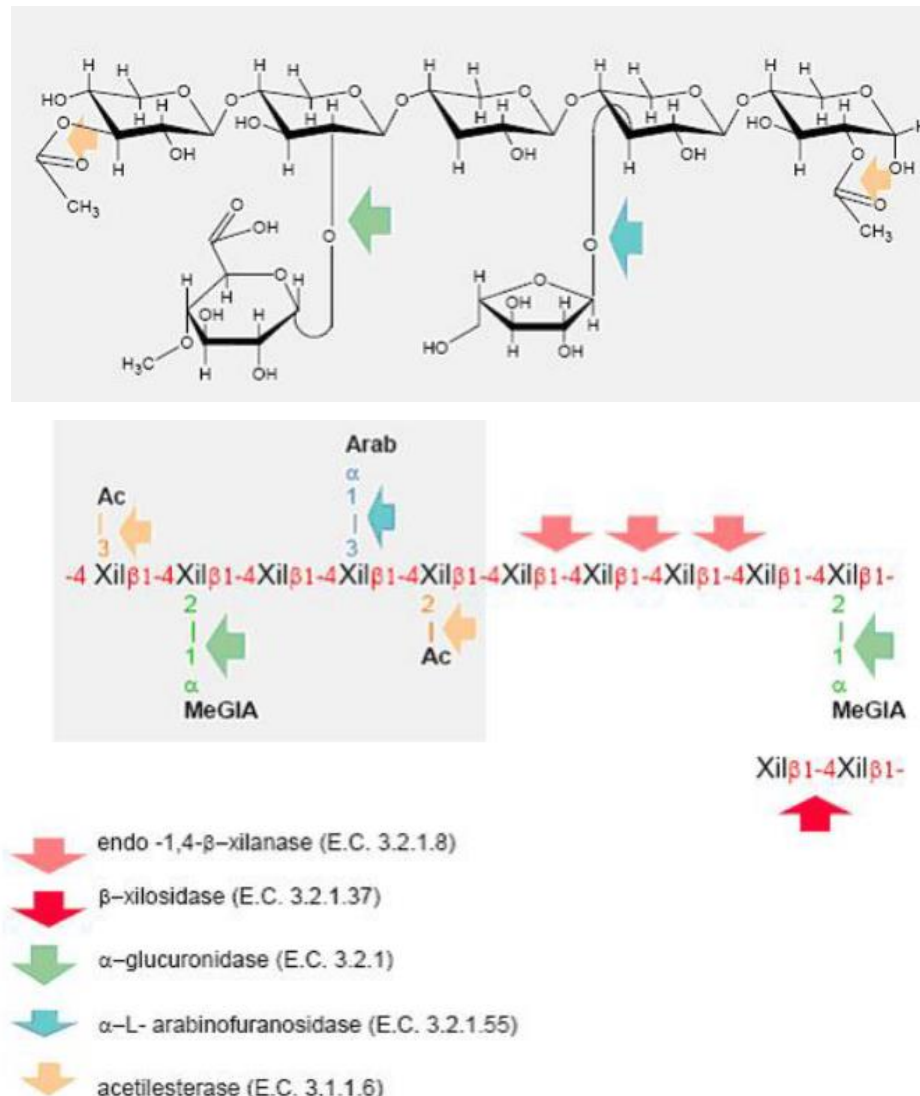


Fonte: Morais et al., 2005.

A xilana é a principal hemicelulose encontrada no bagaço de cana-de-açúcar e o segundo polissacarídeo encontrado em maior quantidade na natureza (COLLINS et al., 2005). A complexa estrutura da xilana necessita de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica para sua hidrólise completa (SUBRAMANUYAN; PREMA, 2002). As enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas entre aquelas que degradam a cadeia principal (endo- $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ - xilosidase) e aquelas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase) (Figura 5) (BIELY, 1985).

As hemiceluloses interagem diretamente com a lignina e essa interação leva a uma maior rigidez da parede celular vegetal. A lignina é uma macromolécula formada de unidades fenilpropanóides muito resistentes à degradação, o que lhe confere um papel na manutenção da integridade física da parede celular (DAMASCENO et al., 2010). Esta molécula de alta massa molar representa de 10 a 25 % da massa total do material lignocelulósico e sua formação tem origem a partir de três precursores básicos (Figura 6) (RABELO, 2007).

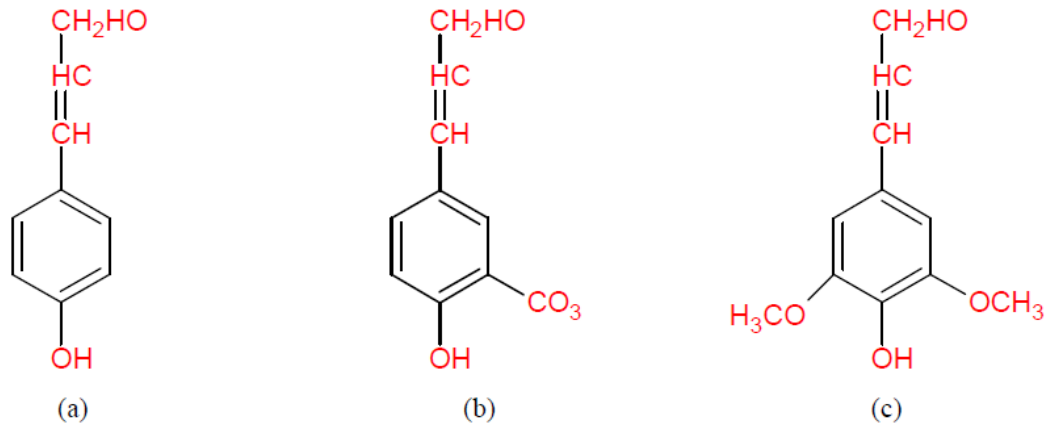
Figura 5: Pontos de atuação de enzimas na cadeia de xilana. Ac - grupo acetil; Arab - L-arabinofuranose; MeGIA - ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil - D-xilose.



Fonte: Biely, 1985.

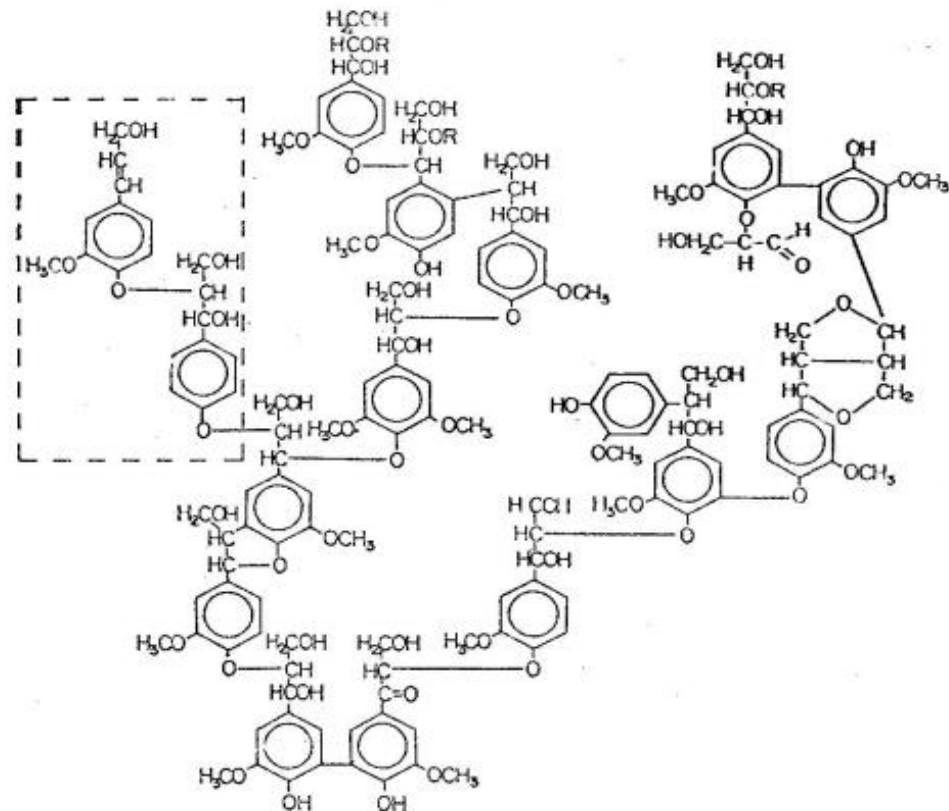
Com uma estrutura macromolecular aromática (Figura 7), a lignina atua como um agente de ligações cruzadas entre as células, o que torna essa estrutura resistente à expansão e compressão (SOUZA, 2006). Por ter esse caráter de rigidez, ela afeta diretamente a sacarificação dos resíduos lignocelulósicos. Além disso, a lignina adsorve de maneira irreversível as enzimas hidrolíticas, bloqueando o ataque à celulose (PALONEN et al., 2004).

Figura 6: Estrutura dos alcoóis precursores da lignina: a) – álcool p-cumarílico; b) – álcool coniferílico; c) – álcool sinapílico.



Fonte: Rabelo 2007.

Figura 7: Estrutura representativa da lignina proposta por Adler em 1977.



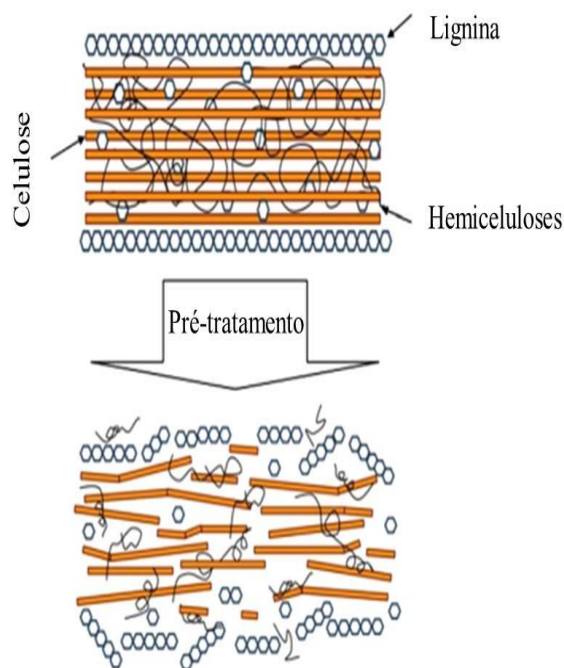
Fonte: Pereira, 2014.

### 2.3 Pré-tratamentos

A possibilidade de bioconversão do bagaço de cana em produtos de valor agregado, como o etanol de segunda geração (etanol 2G), pode ser limitada pela complexa associação lignina-hemiceluloses-celulose, o que torna as fibras resistentes à degradação (ROCHA et al., 2015). Dessa forma, a etapa do pré-tratamento auxilia na redução da recalcitrância do material lignocelulósico, aumentando sua digestibilidade, possibilitando que enzimas microbianas tenham um maior acesso à celulose, e assim, facilitando a conversão de carboidratos em açúcar fermentescíveis (Figura 8) (KUMAR et al., 2009).

A remoção da lignina da biomassa vegetal pode ser realizada utilizando diferentes tipos de pré-tratamentos tais como: físico-mecânicos, biológicos e químicos ou a associação destes, tendo a função de desestruturar a biomassa e tornar a celulose mais acessível (MESA et al., 2011; ROCHA et al., 2015). Os métodos de pré-tratamento mais comuns incluem a moagem da biomassa, seguida por explosão de fibras a vapor ou o tratamento da biomassa com ácidos/bases diluídos ou concentrados (WANDERLEY et al., 2013; CESÁRIO et al., 2014; RAMOS et al., 2015).

Figura 8: Esquema geral da desestruturação do complexo lignocelulósico.



Fonte: adaptado de Mood et al., 2013.



O pré-tratamento físico-mecânico consiste na trituração ou moagem e peneiração da fibra para que esta seja reduzida a pequenas partículas, com a vantagem de aumentar a área de superfície do material e assim, reduzir a cristalinidade da celulose (OGEGA; PETRI, 2010). Na explosão a vapor a biomassa é tratada com vapor de alta pressão saturado. Após um período, essa pressão é subitamente reduzida fazendo com que o material lignocelulósico passe por uma descompressão explosiva, tendo como resultado principal a degradação das hemiceluloses (KUMAR et al., 2009).

O pré-tratamento biológico é realizado por microrganismos (fungos e bactérias) capazes de deslignificar e reduzir a massa molar da lignina, além de provocar uma hidrólise parcial das hemiceluloses (CHANDRA et al., 2012). As vantagens desse processo são: baixo gasto energético e pode ser realizado à temperatura ambiente. Porém, a porcentagem de lignina/hemicelulose extraída é muito baixa e os microrganismos consomem um pouco dos carboidratos disponíveis, levando a um menor rendimento em açúcares (OGEDA; PETRI, 2010; CHANDRA et al, 2012).

Atualmente, entre os tipos de pré-tratamentos químicos, os ácidos, em particular utilizando ácido sulfúrico, são os mais empregados, no qual os polissacarídeos (principalmente hemiceluloses) são hidrolisadas a monossacarídeos, aumentando a acessibilidade à celulose para uma efetiva hidrólise enzimática (MOOD et al., 2013). No entanto, sua toxicidade, a corrosão de equipamentos, a formação de inibidores como o 5-hidroxi metilfurfural (HMF) e a degradação de monossacarídeos como a glicose são alguns dos problemas que podem inviabilizar a aplicação desse método (ALMEIDA et al., 2007; PEDERSEN et al., 2010). A explosão a vapor é também muito utilizada em associação com outros tratamentos. Este método é rápido e envolve a separação dos componentes estruturais da biomassa pelo vapor quente devido à descompressão e evaporação da umidade, leva à ruptura da estrutura física da biomassa, levando também à auto-hidrólise de ligações glicosídicas (MOOD et al., 2013).

### ***2.3.1 Pré-tratamento alcalino***

O pré-tratamento alcalino (PTA), assim como os outros tratamentos, também atua no processo de deslignificação de resíduos lignocelulósicos e na redução da cristalinidade da celulose (OLIVEIRA et al., 2014). A vantagem desse método em relação aos outros é a remoção de grupos acetil e ácido urônico da cadeia da xilana, aumentando assim, a susceptibilidade do substrato ao ataque enzimático. Além disso, este método pode ser operado

em temperaturas menores, sem requerer reatores complexos (MOOD et al., 2013) e os reagentes alcalinos não causam corrosão dos equipamentos como os ácidos (MODENBACH; NOKES, 2012). Outra vantagem é a redução do grau de polimerização e aumento da porosidade do material (CHANDRA, 2012). Como desvantagem, o tratamento alcalino tem o custo do reagente, por ser necessário em elevada quantidade, o que exige uma etapa de recuperação (PALLAPOLUA et al., 2011). Porém, um estudo recente mostrou que o hidróxido de sódio (NaOH) pode ser reciclado e reutilizado em novos pré-tratamentos, o que pode contribuir para que o processo se torne mais econômico (ROCHA et al., 2014).

#### **2.4 *Microrganismos produtores de enzimas***

Alguns microrganismos podem crescer em diversos tipos de substratos vegetais, dependendo das condições ambientais e nutricionais (AIDOO et al., 1982). Dentre eles, os fungos filamentosos ganham destaque por serem mais adaptados ao crescimento em substratos sólidos devido à formação de hifas, o que favorece a sua rápida colonização (DURAND, 2003). Esses microrganismos são ainda de grande interesse devido à sua capacidade de secretar enzimas extracelulares que degradam a biomassa (GOMES et al., 1998; BANSAL et al., 2012; BAFFI, 2014). Um exemplo são as espécies do gênero *Aspergillus* que são conhecidos como um dos principais produtores de exoenzimas que catalisam a hidrólise da celulose e hemiceluloses (SANTOS et al., 2015).

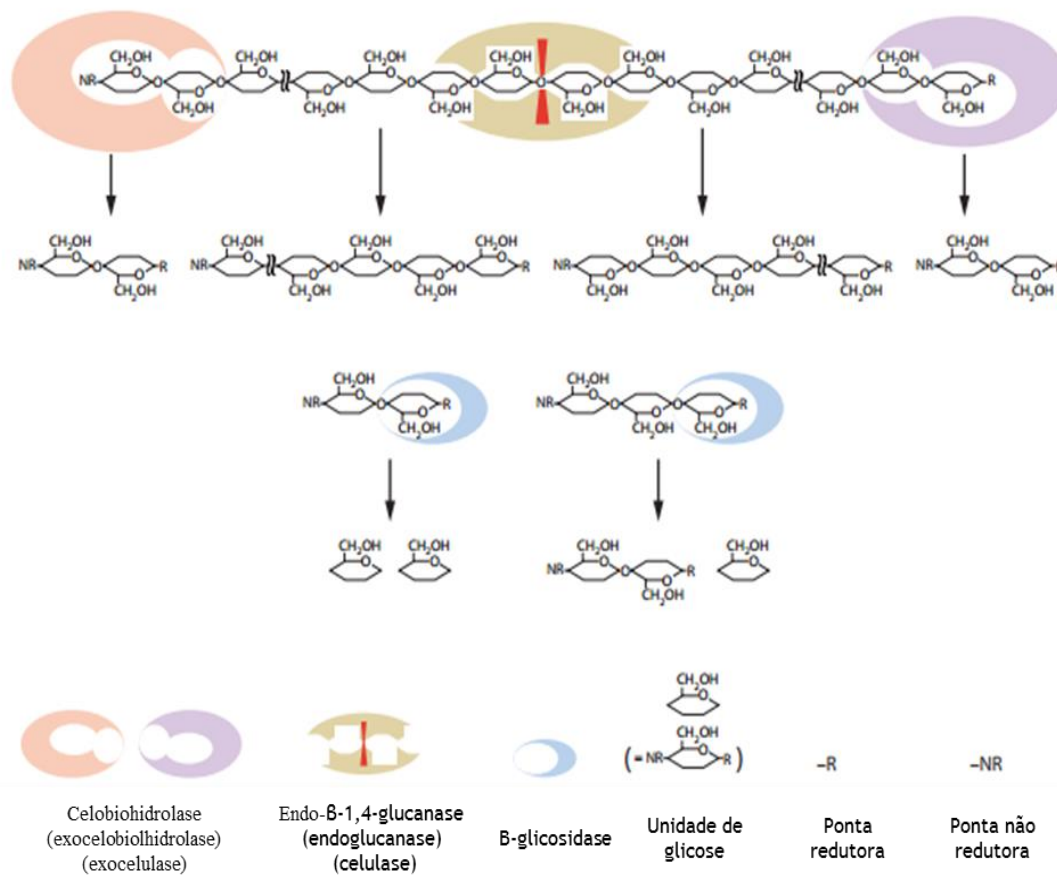
Dentro desse grupo, a espécie *A. fumigatus* tem sido descrita na literatura como boa produtora de celulasas e hemicelulasas que podem ser úteis em processos de sacarificação de resíduos (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Esta espécie também apresenta um ótimo crescimento em substratos sólidos, como o bagaço de cana-de-açúcar (MORETTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Da mesma forma, linhagens de *A. niger* foram relatadas como boas produtoras dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, principalmente,  $\beta$ -glicosidasas e xilanases. Por esse motivo, esta espécie também tem sido empregada em estudos de hidrólise de materiais lignocelulósicos (RODRIGO-ZÚÑIGA et al., 2011; AGUIAR et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

## 2.5 Enzimas hidrolíticas

### 2.5.1 Celulasas e Hemicelulasas

Para degradar a parede celular vegetal, os microrganismos precisam produzir um coquetel de enzimas capazes de despolimerizar a biomassa, como celulasas e hemicelulasas. Dentre elas, as celulasas são classificadas conforme a sua área de atuação no substrato celulósico e são divididas em três grupos: endoglucanases (EC 3.2.1.4) que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) que atuam na região externa (terminais redutores e não redutores) da celulose para a liberação da celobiose e as  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) que hidrolisam moléculas de celobiose em glicose a partir das extremidades redutoras (Figura 9) (WATANABE; TOKUDA, 2010).

Figura 9: Representação simplificada da ação do complexo celulolítico.



(Fonte: adaptado: WATANABE; TOKUDA, 2010).

As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise, atuando aleatoriamente na quebra das ligações internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos com diversos graus de polimerização e formando novas terminações ou extremidades livres (redutores e não redutores). As exoglucanases ou celobiohidrolases atuam nas regiões terminais da fibra (terminações redutoras), liberando dímeros de glicose (celbiose). As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celbiose liberando unidades monoméricas de glicose (OGEDA e PETRI, 2010). A atuação em conjunto dessas enzimas (ação sinérgica) na hidrólise das fibras vegetais apresenta um maior rendimento em glicose, do que quando atuam de forma isolada.

Já as hemicelulases são enzimas importantes na degradação das hemiceluloses permitindo que as fibras de celulose se tornem mais acessíveis. Os estudos atuais têm se concentrado principalmente em enzimas que degradam as xilanas (GÍRIO et al., 2010). Devido à alta complexidade estrutural das hemiceluloses, várias enzimas são requeridas para a sua completa degradação (FARINAS, 2011). Dentre elas, algumas como  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glucuronidase,  $\alpha$ -D-galactosidase e acetil-xilano-esterase atuam nas cadeias laterais. Após a liberação, das cadeias laterais, a cadeia principal composta por xilana pode ser clivada por xilanases e  $\beta$ -xilosidases (Figura 5) (RYABOVA et al., 2009).

As xilanases (endo-1,4- $\beta$ -xilanase ou 1,4- $\beta$ -D-xilanohidrolase; EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidases (1,4- $\beta$ -D-xilanohidrolase; EC 3.2.1.37) são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana (GÍRIO et al., 2010). A endo-1,4- $\beta$ -xilanase despolimeriza a xilana pela hidrólise aleatória, enquanto a  $\beta$ -xilosidase hidrolisa pequenos oligossacarídeos em xilose livre. Dessa forma, a ação conjunta de celulasas e hemicelulases torna a hidrólise de resíduos lignocelulósicos mais eficaz com maior rendimento em monossacarídeos livres.

## **2.6 Hidrólise**

A hidrólise (também conhecida como sacarificação) é um processo de quebra ou degradação das cadeias poliméricas da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (monossacarídeos) e pode ser realizada através do uso de ácidos ou enzimas (JARDINE et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013).

A sacarificação ácida ocorre em duas etapas devido à composição do substrato apresentar celulose e hemiceluloses (JARDINE et al., 2009). A primeira etapa refere-se à hidrólise das hemiceluloses e a segunda a hidrólise da fração celulósica que requer altas temperaturas (DIPARDO, 2000). Esta técnica envolve catalisadores ácidos com conversão

rápida sendo necessário um controle da reação, para evitar a formação de produtos indesejáveis e inibidores do processo de fermentação (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, fenol, formaldeído e outros), oriundos da degradação dos açúcares liberados das hemiceluloses e também da lignina (BRETHAUER; WYMAN 2010; RABELO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013).

### **2.6.1 Hidrólise enzimática**

Utilizada para aumentar a eficiência no reaproveitamento da biomassa, a hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas de pH e temperatura e sem a formação de subprodutos, pois o catalisador é biológico (ARAÚJO et al., 2013). Além disso, as enzimas possuem especificidades, o produto final não é degradado, não exige investimentos elevados em equipamentos, o custo é moderado e não há formação de inibidores (RABELO et al., 2011). Por estas razões, esta rota tecnológica oferece vantagens sobre as outras em processos de bioconversão.

A hidrólise da celulose é realizada pela ação de celulasas altamente específicas e como resultado da ação dessas enzimas, obtém-se celobiose e glicose (FERREIRA, 2015). A celobiose é um inibidor de celulasas mais forte do que a glicose, sendo interessante que ela seja rapidamente transformada em glicose pelas  $\beta$ -glicosidasases (FERREIRA, 2015).

Atualmente, grande parte da hidrólise enzimática é realizada com enzimas comerciais. Porém, o alto custo dessas enzimas e os baixos rendimentos ocasionaram um gargalo industrial na sua aplicação para a produção de açúcares fermentescíveis (SIQUEIRA et al., 2010; ANG et al., 2013). Assim, a disponibilidade de celulasas de baixo custo, bem como a utilização de substratos mais baratos na sua produção, como o bagaço de cana-de-açúcar, podem tornar o processo menos dispendioso e aumentar o rendimento do produto final (ZHENG et al., 2013). Além disso, a capacidade de alguns microrganismos em crescer em substratos lignocelulósicos e produzir celulasas e hemicelulasas pode contribuir adicionalmente para bioconversões economicamente viáveis (BANSAL et al., 2012).

Recentemente, pesquisas voltadas para aperfeiçoar a hidrólise enzimática têm sido realizadas com coquetéis enzimáticos de extratos fúngicos brutos que contenham atividades mistas celulolíticas e xilanolíticas (MORETTI et al., 2014; SANTOS et al., 2015; BUSSAMRA, et al., 2015). Dessa forma, para a obtenção de bons resultados após a sacarificação, é importante o uso de uma mistura enzimática eficiente com amplo espectro de ação que maximize a conversão do substrato (celulose e hemiceluloses) em monossacarídeos,

com um baixo consumo de energia, sem o uso de produtos químicos perigosos e com um custo mínimo de produção (ZHOU et al., 2009).

### 3 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, analisou-se a eficiência sinérgica de extratos enzimáticos brutos produzidos pelos fungos *Aspergillus fumigatus* (linhagem SCBM6) e *Aspergillus niger* (linhagem SCBM1) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar previamente submetido a pré-tratamento alcalino.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Realizar o pré-tratamento alcalino (PTA) do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de sódio (2% m/v);
- Realizar a caracterização química do bagaço antes (BB) e após o pré-tratamento (BT);
- Otimizar a hidrólise do bagaço pré-tratado usando superfície de resposta, variando-se as condições: concentração de extratos enzimáticos, a concentração de bagaço, o tempo de hidrólise, a temperatura de hidrólise e a proporção entre extratos fúngicos brutos combinados das linhagens *A. fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1;
- Quantificar os açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido-dinitrosalicílico (DNS);
- Detectar e quantificar os monossacarídeos e dissacarídeos liberados por cromatografia de troca iônica;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES)

#### 4.1.1 Microrganismos

As linhagens SCBM6 de *Aspergillus fumigatus* (termofílico, com crescimento ótimo a 45 °C) e SCBM1 *Aspergillus niger* (mesofílico, com crescimento ótimo a 30 °C) foram cultivadas por fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas fibrolíticas. Essas linhagens foram previamente isoladas de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar (obtidas na Usina Alvorada, Araporã, MG). Posteriormente, os isolados foram identificados em nível de espécie por seqüenciamento gênico (SANTOS et al., 2015) e armazenados em água deionizada estéril à temperatura ambiente, no laboratório de Microbiologia Ambiental, Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC-UFU).

Para o preparo do pré-inóculo, as linhagens fúngicas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio inclinado ágar Sabouraud estéril por 72 horas a 30 °C (SCBM1) e 45 °C (SCBM6) (Figura 10). Este procedimento foi realizado em duplicata. Após 72 horas, 20 mL de solução salina estéril foram adicionados aos frascos e as superfícies dos meios foram raspadas para a obtenção de esporos em suspensão. O número de esporos foi calculado por contagem em Câmara de Neubauer no microscópio ótico e um volume equivalente a  $10^7$  esporos por grama de substrato foi utilizado para inocular as amostras nos frascos de fermentação para crescimento e produção de enzimas.

Figura 10: Pré-inóculos de *A. fumigatus* (SCBM6) e *A. niger* (SCBM1).



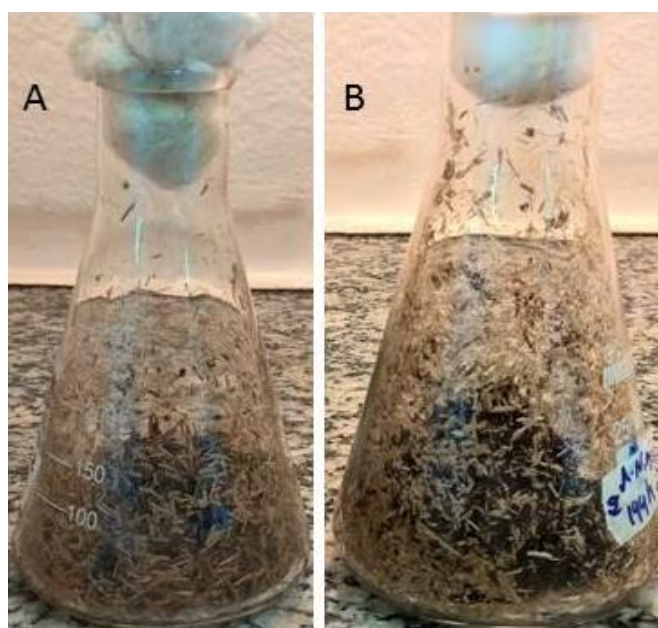
Fonte: A autora.



#### 4.1.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

As fermentações para a produção de enzimas hidrolíticas foram conduzidas em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 2,5 gramas de bagaço de cana-de-açúcar e 2,5 gramas de farelo de trigo (1:1 g/g) e acrescidos de 5 mL de solução nutriente estéril contendo: 0,35 % de sulfato de amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0,3% de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,05 % de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 0,05 % de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (MORETTI et al., 2012). Os frascos foram vedados e autoclavados. Cada frasco foi inoculado com um volume de pré-inóculo equivalente a 10<sup>7</sup> esporos / grama de substrato e completado com solução nutriente até o volume final de 20 mL (MORETTI et al., 2012). O processo de fermentação ocorreu por sete dias, a 45 °C para a linhagem *A. fumigatus* SCBM6 e a 30 °C para *A. niger* SCBM1 (Figura 11). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

Figura 11: Inóculos de *A. fumigatus* (SCBM6) e *A. niger* (SCBM1) para crescimento por FES.



Fonte: A autora.

#### 4.1.3 Extração Enzimática

Para a linhagem termofílica SCBM6, dois frascos foram retirados a cada 24 horas para a obtenção do extrato enzimático bruto. Para a linhagem mesofílica SCBM1, os frascos foram retirados a cada 48 horas. Para tanto, 50 mL de água destilada foram adicionados aos frascos e

agitados manualmente. Em seguida, os frascos foram submetidos à agitação orbital a 150 rpm por 1 hora. Após esta etapa, o material foi filtrado e centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm e novamente filtrado em papel filtro. Os extratos brutos obtidos foram aliquoteados e armazenados a -20 °C. O extrato enzimático produzido pela linhagem SCBM6 de *A. fumigatus* foi denominado EAF e o extrato obtido a partir do crescimento de *A. niger* SCBM1 foi identificado como EAN.

#### **4.1.4 Dosagens Enzimáticas: $\beta$ -glicosidase, $\beta$ -xilosidase e xilanase**

Após a FES, a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase produzida pelos fungos foi quantificada a 50 e a 60 °C (EAN e EAF, respectivamente), utilizando uma mistura de reação contendo 50  $\mu$ L de extrato enzimático bruto, 250  $\mu$ L de solução tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0 e 250  $\mu$ L de  $p$ -nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG) como substrato. Após 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 2 mol L<sup>-1</sup>. A concentração de  $p$ -nitrofenol ( $p$ NP) liberado foi determinada por espectrofotometria a 410 nm. A atividade da enzima  $\beta$ -xilosidase foi dosada pelo mesmo procedimento para  $\beta$ -glicosidase, porém, utilizando-se  $p$ -nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PNPX) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de  $p$ NP por minuto de reação, a partir da curva padrão de  $p$ NP (BAFFI et al., 2011). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

A quantificação da atividade enzimática da xilanase foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), com 10  $\mu$ L do extrato enzimático, 90  $\mu$ L de xilana 1 % em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, por 10 minutos a 60 °C (EAF) e a 50 °C (EAF). A reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu$ L de DNS (MILLER, 1959, com pequenas modificações). O volume final foi fervido por 10 minutos e acrescido de 800  $\mu$ L de água destilada. A quantidade de xilose liberada foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de xilose por minuto de reação, a partir da curva padrão de xilose. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

#### **4.2 Pré-tratamento Alcalino (PTA)**

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram adquiridas da Usina Vale do Tijuco (Companhia Mineira de Açúcar e Álcool), localizada no município de Uberaba, MG. O

bagaço foi previamente lavado em água corrente para a retirada de impurezas e, em seguida, em água destilada. Posteriormente, o resíduo foi seco em estufa a 50 °C por 24 horas e triturado em liquidificador.

Para o pré-tratamento, uma amostra de 100 gramas de bagaço foi pesada e submetida sob refluxo em extrator Soxhlet, com 2,5 L de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 2 % e a reação foi mantida por 4 horas a 121 °C (HENRIQUE et al., 2013). Após esse período, o resíduo foi novamente triturado, utilizando um liquidificador comum e lavado com água destilada, até que o filtrado apresentasse pH igual a 7,0. A amostra foi então seca em estufa por 12 horas a 50 °C. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de aproximadamente 700 gramas de bagaço pré-tratado (BT).

#### ***4.3 Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)***

As amostras de bagaço antes (bagaço bruto - BB) e após o pré-tratamento alcalino (bagaço pré-tratado - BT) foram fixadas em fita de carbono em suporte de alumínio e cobertas com ouro. As fotomicrografias de MEV foram obtidas em microscópio de baixo vácuo da marca Hitachi, modelo TM3000.

#### ***4.4 Caracterização química do bagaço de cana bruto (BB) e tratado (BT)***

##### ***4.4.1 Teor de lignina Klason insolúvel***

O teor de lignina Klason insolúvel foi determinado de acordo com a norma TAPPI T13M-54. Para a quantificação, adicionou-se aproximadamente 1 grama de bagaço seco em almofariz e 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 72 % (m/m) (d=1,6389 g mL<sup>-1</sup>) para maceração, seguido de repouso por 2 horas à temperatura ambiente.

A mistura foi então transferida para um balão e diluída com 575 mL de água destilada para a concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 3 % (m/m) e aquecida em refluxo por 4 horas a 121 °C. Após o resfriamento por 1 hora, a solução foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 4. O resíduo presente no funil foi seco a 105 °C por 12 horas, resfriado em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesado. O filtrado foi reservado para estimar a lignina Klason solúvel. O conteúdo de lignina insolúvel foi então calculado como a porcentagem da massa de lignina insolúvel em relação à massa inicial da amostra seca (equação 1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\%L_{ki} = \frac{M_k - M_c}{M_A} * 100 \quad \text{equação 1}$$

$L_{ki}$  → Lignina Klason insolúvel

$M_k$  → Massa da lignina insolúvel seca

$M_c$  → Massa da cinza

$M_A$  → Massa do bagaço

#### 4.4.2 Teor de lignina Klason solúvel

A quantidade de lignina solúvel em meio ácido foi quantificada por espectroscopia na região do ultravioleta (UV). O filtrado obtido na etapa anterior foi diluído com água destilada até a concentração final de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A absorvância do filtrado foi medida nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. Os valores de absorvância refletem a necessidade de se fazer uma correção para os compostos de furfural gerados durante a hidrólise, que podem interferir na medição da lignina solúvel. A absorvância em 280 nm é, na verdade, uma correção para os compostos de furfural, enquanto que a absorvância em 215 nm é uma medida da concentração de lignina solúvel. A concentração de lignina Klason solúvel ( $\text{g L}^{-1}$ ) foi calculada pela equação 2:

$$C (\text{g L}^{-1}) = [(4,53 A_{215}) - A_{280}] 300 \quad \text{equação 2}$$

$C (\text{g L}^{-1})$  → concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido

$A_{215}$  → valor da absorvância a 215nm

$A_{280}$  → valor da absorvância a 280nm

Portanto, essa equação é resultante da resolução simultânea das equações a seguir:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \quad \text{equação 3}$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L \quad \text{equação 4}$$

$A_{280}$  → valor da absorvância a 280nm

$A_{215}$  → valor da absorvância a 215nm

$C_D$  → concentração dos carboidratos ( $\text{g L}^{-1}$ )

$C_L$  → concentração da lignina solúvel ( $\text{g L}^{-1}$ )

#### **4.4.3 Teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado de acordo com a norma TAPPI T264 OM-88. Cerca de  $2 \pm 0,01$  gramas de bagaço foram adicionadas em cadinho e o conjunto foi acondicionado em estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Em seguida, o mesmo material foi colocado na estufa, nas mesmas condições, por 1 hora. Novamente, o material foi resfriado em dessecador e pesado. Este procedimento foi repetido até atingir uma massa constante, ou seja, até que pesagens sucessivas não diferissem por mais de 0,002 grama.

O teor de umidade, tanto para o bagaço tratado (BT) quanto para o bruto (BB), foi determinado a partir da diferença do percentual entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra após o processo de secagem. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **4.4.4 Teor de cinzas**

O teor de cinzas foi avaliado conforme a norma TAPPI T211 OM-93. Cerca de 1 grama de bagaço de cana tratado (BT) ou bruto (BB) foi adicionado em mufla à temperatura de  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas. Posteriormente, o sistema (cadinho e amostra calcinada) foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. O teor de cinzas foi determinado considerando a percentagem de massa do resíduo (após calcinação) com relação à massa inicial de amostra seca.

#### **4.4.5 Obtenção da holocelulose**

O termo holocelulose é geralmente usado para designar os carboidratos totais presentes em uma célula vegetal (MORAIS et al., 2010). A holocelulose é o produto resultante da extração da lignina e é constituída por celulose e hemiceluloses. O método utilizado para obtenção da holocelulose foi o do clorito ácido (BROWNING, 1967). Esta técnica se baseia na reação entre a lignina, o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), produtos formados em reações redox de clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ), em meio ácido segundo a equação abaixo:



Inicialmente, adicionou-se 5 gramas de bagaço em um erlenmeyer com 250 mL de água destilada. O frasco foi colocado em banho-maria a 75 °C e a ele foram adicionados 2,0 mL de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) e 3,0 gramas de clorito de sódio (NaClO<sub>2</sub>). O recipiente foi tampado para não ocorrer a perda do gás produzido na reação.

Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de CH<sub>3</sub>COOH e 3,0 gramas de NaClO<sub>2</sub>. Esse processo foi repetido por duas vezes. A mistura foi então resfriada em banho de gelo e filtrada em funil de vidro sinterizado nº 1. Posteriormente, foi lavada com água destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água utilizada na lavagem. Em seguida, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para quantificar o rendimento em holocelulose.

#### **4.4.6 Teor de $\alpha$ -celulose**

A celulose distingue-se analiticamente das hemiceluloses pela sua insolubilidade em soluções alcalinas aquosas. A extração sucessiva da holocelulose (obtida pelo método do clorito ácido) com hidróxido de potássio (KOH) 5 e 24 % resulta em valores que somados, representam a fração de hemiceluloses. Logo, o resíduo fibroso após as duas extrações é designado  $\alpha$ -celulose (BROWNING, 1967). Desta forma, 3,0 gramas de holocelulose seca foram adicionadas em 10 mL de solução de KOH 5 %. O frasco foi vedado e mantido em agitação constante por 2 horas.

O preparado foi então filtrado em funil de vidro sintetizado nº 1, lavado com 50 mL de solução de KOH 5 % e em seguida, com 100 mL de água destilada. O mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH 24 %. Após este procedimento, o resíduo fibroso retido no funil foi lavado com 25 mL de solução KOH 24 %, 50 mL de água destilada, 25 mL de CH<sub>3</sub>COOH 10 % e 100 mL de água destilada, respectivamente.

Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de KOH, o resíduo fibroso foi novamente lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 ± 3 °C por 6 horas, e pesado. O conteúdo de  $\alpha$ -celulose foi então determinado como a porcentagem da massa de resíduo em relação à massa inicial de amostra seca, levando em consideração o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

#### 4.4.7 Teor de hemiceluloses

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a porcentagem da diferença entre os teores de holocelulose e  $\alpha$ -celulose em relação à massa inicial de amostra seca, considerando o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

#### 4.4.8 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do bagaço bruto (BB) e tratado (BT) foi determinada, utilizando-se um analisador térmico (Shimadzu DTG-60H). Amostras de BB e BT foram pesadas (entre 5 e 7 mg) e aquecidas de 25 a 600 °C a uma razão de aquecimento de 10 °C / min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL / min.

#### 4.4.9 Determinação da cristalinidade

O índice de cristalinidade ( $I_c$ ) nas amostras de bagaço bruto (BB) e tratado (BT) foi avaliado por difração de raio-X (DRX), de acordo com o método Segal (SEGAL et al. 1959). Este método consiste em realizar a medida do pico da maior e menor intensidade de difração, conforme equação 6:

$$I_c = (I_{002} - I_{am} / I_{002}) \times 100 \quad \text{equação 6}$$

Onde:

$I_{002}$  = intensidade de difração máxima em unidades arbitrárias do plano 002, representando as regiões cristalinas e amorfas.

$I_{am}$  = intensidade de difração em difração em  $2\theta = 18^\circ$ , representada apenas pela parte amorfa.

Para este procedimento, as amostras foram secas a 50 °C durante 12 horas em estufa. Em seguida, as amostras foram analisadas em difratômetro Shimadzu LabX XRD-6000, com potência de 40 KV / 30 mA e  $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1,5406 \text{ \AA}$ , com intervalo de  $2\theta$  de 5 a 40 °, velocidade de varredura de 2 ° / min e resolução de 0,02 °. Na determinação do Índice de cristalinidade ( $I_c$ ), o método de raio-X foi utilizado como parâmetro simples de comparação entre duas amostras. Os dados foram normalizados para a melhor visualização das curvas.

#### **4.4.10 Determinação de extrativos**

Aproximadamente 5 gramas de bagaço bruto (BB) e tratado (BT) foram pesados e colocados separadamente em cartucho de papel de filtro e submetidos a uma extração em um extrator Soxhlet. Para a determinação do teor de extrativos apolares, utilizou-se 125 mL de uma mistura de hexano/etanol (1:1 v/v) por um período de 50 horas, conforme norma TAPPI T204 cm - 97, com pequenas modificações. Após esse período, o resíduo foi seco em estufa a 105 °C por 12 horas. O mesmo procedimento foi realizado para determinar o teor de extrativos solúveis em água, utilizando 250 mL de água destilada. O conteúdo de extrativos solúveis foi determinado através da diferença de massa da amostra seca antes e após o processo de extração, conforme equação a seguir:

$$\text{Teor de extrativos (\%)} = (m_a - m_b / m_b) \times 100 \quad \text{equação 7}$$

Onde:

$m_a$  = massa (g) da amostra antes da extração

$m_b$  = massa (g) de amostra seca após a extração

#### **4.5 Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado**

A hidrólise enzimática foi otimizada por metodologia de Superfície de Resposta a fim de se obter um melhor rendimento de açúcares fermentescíveis no final do processo. Esta técnica se baseia na construção de modelos matemáticos empíricos que, geralmente, empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dar condições de explorar, modelar e deslocar o sistema até a sua otimização (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Para o aprimoramento das condições experimentais que possibilitassem o aumento no rendimento em açúcares fermentescíveis, foi aplicado um planejamento experimental  $2^4$ , reduzindo o número de ensaios realizados. As variáveis tempo, temperatura, concentração de substrato e porcentagem de extrato enzimático bruto foram analisadas, sendo determinados os valores de máximo e mínimo para as mesmas (Tabela 1). Na variável “porcentagem de extrato enzimático bruto”, diferentes proporções de EAF e EAN foram avaliadas, de modo que a ação sinérgica de ambos os extratos fosse investigada. Para a construção da matriz, utilizou-se o programa Statistica 7.0.



Tabela 1 – Valores aplicados em cada nível das variáveis analisadas no processo de hidrólise.

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Tempo (horas)	3,37	12	24	36	44,63
Temperatura (°C)	41,25	47	55	63	68,75
Concentração de bagaço (%)	0,19	2,2	5	7,8	9,81
Razão de extrato enzimático bruto (%)	7	25	50	75	93

As hidrólises foram realizadas em frascos de 125 mL do tipo erlenmeyer com rolhas de borracha, contendo 20 mL de uma mistura de 5 mL de tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0), bagaço pré-tratado seco, extratos enzimáticos brutos e água destilada. Os valores de atividades enzimáticas contidas nos extratos foram determinados após a FES. Os experimentos foram incubados em diferentes temperaturas e sob agitação de 150 rpm.

A quantidade de cada extrato bruto adicionado em cada hidrólise foi determinada considerando a porcentagem de celulose presente na amostra de bagaço seco após o pré-tratamento alcalino e a porcentagem em gramas de bagaço que foi utilizada em cada hidrólise. Cada hidrólise foi conduzida com  $1 \text{ U g}^{-1}$  de  $\beta$ -glicosidase de cada extrato enzimático bruto.

#### ***4.6 Quantificação de açúcares após as hidrólises***

Os hidrolisados foram filtrados e utilizados para análises quantitativas de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS a partir de uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959, com pequenas modificações). Os monossacarídeos e dissacarídeos liberados (glicose, xilose, arabinose e celobiose) foram quantificados por cromatografia de troca iônica.

Para a quantificação dos monossacarídeos (xilose e glicose) e da celobiose (dissacarídeo) nos hidrolisados utilizou-se um cromatógrafo de íons (Termo Dionex ICS 5000 HPAEC-PAD), com coluna CarboPac PA1 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (MORETTI et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Os diluentes foram preparados com água ultra pura ( $18 \text{ M } \Omega$ ) e desgaseificada com nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) e o fluxo usado foi de  $1 \text{ mL / minuto}$  com solvente A (água ultra pura), solvente B ( $500 \text{ mM / L}$  de NaOH), com eluição isocrática com 48 % de B, 95 % de A, por 25 minutos (PEREIRA et al., 2015). Padrões de glicose, xilose e celobiose foram usados para as

análises. As quantificações dos açúcares por cromatografia de troca iônica foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Roberto da Silva.

#### ***4.7 Caracterização da $\beta$ -glicosidase***

As condições ótimas para a atividade máxima da  $\beta$ -glicosidase nos extratos enzimáticos EAF e EAN foram determinadas a fim de garantir a estabilidade sob as condições experimentais de hidrólise. Assim, pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade foram estudados examinando uma faixa de diferentes pHs e temperaturas.

A determinação do pH ótimo sobre a atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase foi realizada incubando-se 50  $\mu$ L de enzima bruta em 250  $\mu$ L do substrato *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG), em diferentes valores de pH, variando os valores de pH entre 3,5 e 8,0. Os tampões utilizados foram: tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (3,5 a 7,0) e tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (7,5 e 8,0). A atividade enzimática foi quantificada a 40 °C e paralisada com carbonato de sódio 2 mol L<sup>-1</sup> após 10 minutos (Baffi et al., 2011).

O efeito da temperatura ótima sobre a  $\beta$ -glicosidase presente em cada extrato foi avaliado incubando-se 50  $\mu$ L de extrato bruto, nas mesmas condições para a determinação da atividade, em diferentes temperaturas, variando entre 30 e 80 °C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> no pH ótimo (Baffi et al., 2011).

A estabilidade referente à variação da escala de pH, foi analisada através da incubação dos extratos durante 24 horas à temperatura ambiente em tampão, variando o pH de 3,5 a 8,0, com os mesmos tampões já descritos. A atividade de  $\beta$ -glicosidase remanescente foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura (Baffi et al., 2011).

A termoestabilidade da  $\beta$ -glicosidase em cada extrato também foi investigada. O extrato bruto foi incubado em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, no pH ótimo de cada enzima, durante 1 hora em diferentes temperaturas de 30 a 80 °C. Em seguida, fixou-se uma temperatura ótima para ambos os extratos e avaliou-se a termoestabilidade variando o tempo (2, 4, 8 e 12 horas de incubação). Posteriormente, a atividade enzimática residual foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. Os ensaios foram realizados em duplicata (Baffi et al., 2011).

#### ***4.8 Novas hidrólises com extrato enzimático concentrado e enzima comercial***

Os extratos enzimáticos brutos foram concentrados com 65% de saturação de etanol gelado (-18 °C) sob leve agitação. O etanol foi lentamente adicionado ao extrato enzimático previamente refrigerado a 5 °C. A solução foi mantida por 24 horas em banho de gelo e o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 g / 20 min) a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH ótimo. Após a concentração do extrato, foi realizada uma nova dosagem enzimática.

Duas novas hidrólises foram realizadas: uma com extratos enzimáticos concentrados e a outra com enzima comercial, ambas contendo 10U de β-glicosidase por grama de bagaço. A enzima comercial CELIC CTEC 3 (Novozymes), rica em celulasas, xilanases e enzimas acessórias (LI et al., 2013), foi diluída 50.000 vezes para atingir a concentração de β-glicosidase de 10U por grama de bagaço.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

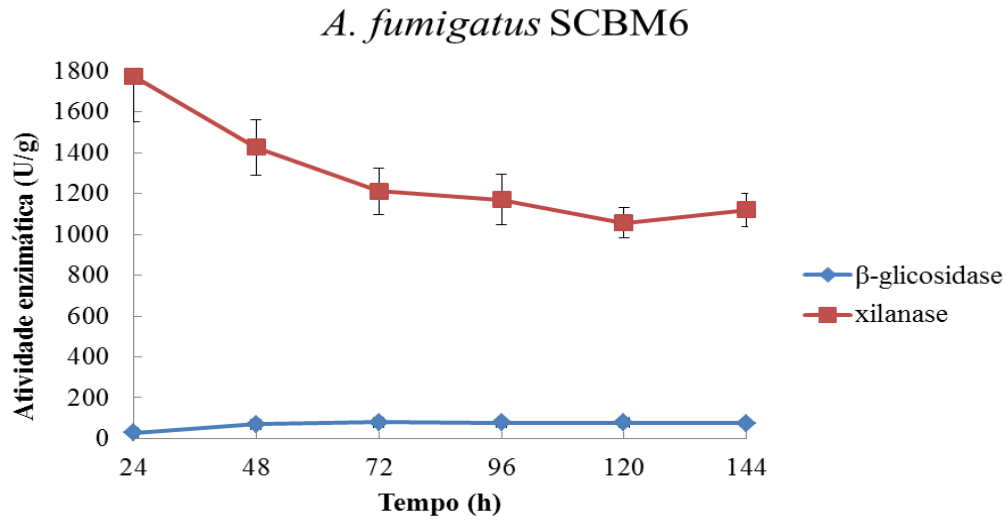
### 5.1 Produção de enzimas por FES

A fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos agroindustriais, pois possibilita o crescimento de microrganismos nesses substratos, permitindo a síntese de diversos compostos de interesse industrial, como por exemplo, enzimas microbianas (PINTO et al., 2006). É uma metodologia eficaz na produção de enzimas, como as celulases, apresentando alto rendimento e baixo custo (SINGHANIA et al., 2010).

Neste estudo, a produção de  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e xilanase pelas linhagens de *A. fumigatus* (SCBM6) e *A.niger* (SCBM1) foi avaliada após a FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos. Altos valores de atividades enzimáticas foram produzidos por ambas as linhagens. Para a enzima  $\beta$ -glicosidase, a produção máxima obtida pelo crescimento do fungo *A. fumigatus* SCBM6 foi de 78,47 U/g, enquanto que *A. niger* SCBM1 produziu 43,02 U/g. A enzima  $\beta$ -xilosidase foi sintetizada apenas por *A. niger* SCBM1 com produção bastante significativa (78,00 U/g). Para xilanase, a maior de produção foi obtida por *A.niger* SCBM1 (3289,58 U/g). Outras celulases e hemicelulases não foram detectadas em concentrações relevantes. A enzima com maior taxa de produção foi a xilanase para ambas as linhagens (*A. fumigatus* SCBM6 com 1774,50 U/g e *A. niger* SCBM1 com 3289,58 U/g).

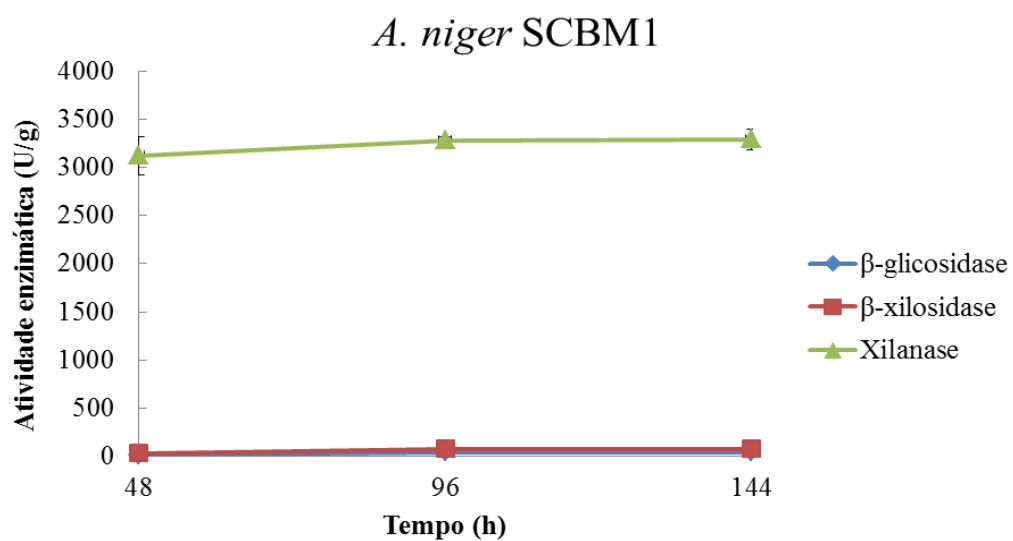
A curva de produção das enzimas em função do tempo também foi avaliada (Figuras 12 e 13). O pico máximo de produção de  $\beta$ -glicosidase por *A. fumigatus* SCBM6 foi observado entre 72 e 120 horas de fermentação (Figura 12). Para a linhagem SCBM1 de *A. niger*, o pico de biossíntese dessa enzima, bem como de  $\beta$ -xilosidase, foi observado entre 96 e 144 horas (Figuras 13). Para a xilanase, a maior produção foi obtida entre 24 e 48 horas por *A. fumigatus* SCBM6 (Figura 12). Já para a linhagem SCBM1 (*A. niger*), a produção dessa enzima foi alta e manteve-se constante entre 48 e 144 horas (Figura 13).

Figura 12: Produção de enzimas por FES pela linhagem SCBM6 de *A. fumigatus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 g/g). A:  $\beta$ -glicosidase e B: xilanase.



Fonte: A autora

Figura 13: Produção de enzimas por FES pela linhagem SCBM1 de *A. niger*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. A:  $\beta$ -glicosidase, B:  $\beta$ -xilosidase e C: xilanase.



Fonte: A autora

Linhagens de *Aspergillus* foram descritas em estudos anteriores como boas produtoras de enzimas extracelulares, principalmente xilanases (DE VRIES; VISSER, 2001; MORETTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Moretti et al. (2012) registraram uma atividade enzimática máxima de xilanase pela linhagem *A. fumigatus* M.7.1 de 1040,0 U/g em 144 horas de fermentação, utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Já para  $\beta$ -glicosidase, o valor máximo obtido foi de 5 U/g em 96 horas. Bansal et al. (2012) também avaliaram a produção da  $\beta$ -glicosidase pela espécie *A. niger* por FES, utilizando como substrato o bagaço de cana sem pré-tratamento e obteve apenas 3 U/g da enzima em 96 horas de incubação. Santos et al. (2015) também analisaram a produção das enzimas  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e xilanase pela linhagem *A. niger* SCBM3 utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos e obtiveram 54, 73 e 39 U/g após 240, 144 e 48 horas de FES, respectivamente. Com base nesses dados, podemos concluir que ambas as linhagens fúngicas são ótimas produtoras de enzimas hemicelulolíticas, demonstrando uma produção bastante elevada e superior às encontradas em outros estudos.

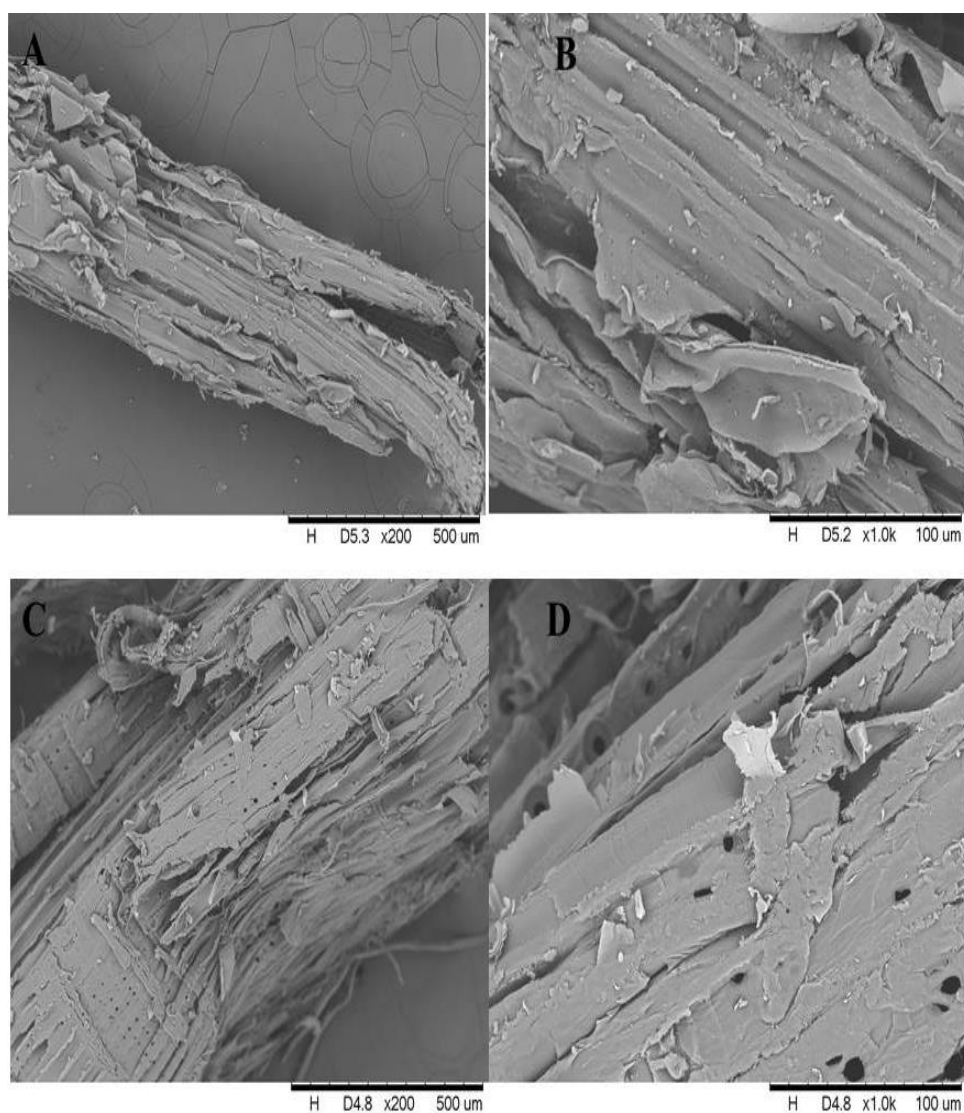
## **5.2 Caracterização do bagaço antes e após o pré-tratamento alcalino**

### **5.2.1 Análise microscópica das fibras**

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de amostras de bagaço bruto (BB) e tratado (BT) mostrou que o pré-tratamento alcalino alterou a estrutura das fibras, promovendo uma redução na recalcitrância e um aumento da porosidade das mesmas (Figura 13A, B e C). O bagaço bruto (BB) apresentou cadeias de fibras ordenadas uniformemente, com alguns poros com diâmetros pequenos (Figuras 14A e B). No bagaço tratado (BT), foram observadas fibras desorganizadas com desestruturação no seu arranjo primário e alguns pontos de dilaceração na estrutura dos feixes evidentes (Figuras 14C e D). Um aumento da porosidade das fibras também foi observado em BT, o que pode ter sido causado pela redução no conteúdo de lignina, deixando a parede celular mais acessível (Figura 14D).

Rezende et al. (2011) avaliaram a estrutura de fibras de bagaço tratadas com diferentes concentrações de NaOH e também relataram que concentrações maiores de solução alcalina resultaram em feixes mais desestruturados e fibras mais soltas e independentes. Essa desestruturação das fibras e aumento da porosidade nas amostras de bagaço tratado pode facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos celulose e hemiceluloses durante o processo de sacarificação (AGUIAR et al., 2011).

Figura 14: Eletromicrografia de varredura do bagaço de cana-de-açúcar bruto (A e B) e tratado (C e D). A e C: aumento de 200x, B e D aumento de 1000x.



Fonte: A autora

### 5.2.2. Caracterização química

O conhecimento da composição da biomassa lignocelulósica é fundamental para a eficiência das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. O tipo de pré-tratamento empregado é um fator importante e sua escolha irá depender do resíduo utilizado e dos componentes presentes na biomassa, tendo como requisito evitar a formação de subprodutos inibidores da hidrólise e assim, melhorar a produção de açúcares fermentescíveis (CHANDRA et al., 2012).

Nesse estudo, foram avaliadas as concentrações de cinzas, lignina Klason, celulose e hemiceluloses. Após o PTA, observou-se uma redução de 43,0 % na concentração de lignina e a fração de celulose aumentou em 20,58 % em BT (Tabela 2). Observou-se ainda que, em BT uma pequena porcentagem de hemiceluloses foi removida (apenas 5,47 %). Estes dados indicam que o pré-tratamento alcalino foi eficiente na remoção da lignina, mantendo a celulose e as hemiceluloses praticamente conservadas. O aumento observado na concentração de celulose é devido a essa remoção de parte da lignina, visto que a redução deste componente faz com que ocorram alterações na distribuição dos outros componentes nas fibras, tornando o bagaço tratado mais rico em celulose.

Os valores obtidos na caracterização química do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado foram comparados com outros estudos (Tabela 2). Rocha et al. (2015) avaliaram a composição química de amostras de bagaço de cana bruto e observaram valores próximos para lignina total (21,56 %). Porém, valores divergentes para celulose (42,19 %), hemiceluloses (27,60 %) e cinzas (2,84 %) foram encontrados por esses autores. Com relação ao conteúdo de lignina total no bagaço de cana pré-tratado com NaOH, uma redução de cerca de 50 % foi obtida por Maryana et al. (2014) e de 75,77% por Guilherme et al. (2015) após o pré-tratamento.

Tabela 2 – Composição química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT).

<b>Propriedades</b>	<b>Trabalho atual</b>		<b>MARYANA et al. (2014)</b>		<b>GUILHERME et al. (2015)</b>	
	<b>BB</b>	<b>BT</b>	<b>BB</b>	<b>BT</b>	<b>BB</b>	<b>BT</b>
<b>Teor de Umidade</b>	9,53	7,77	-	-	-	-
<b>Cinzas</b>	0,65	0,22	-	-	8,80	6,05
<b>Lignina Klason Total</b>	26,14	14,90	17,52	9,93	17,79	4,31
<b>Celulose</b>	54,36	75,04	44,43	56,33	38,59	47,21
<b>Hemiceluloses</b>	13,52	12,78	22,90	20,86	27,89	29,29



Pré-tratamentos alcalinos de biomassa lignocelulósica (com hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio e amônia) têm sido empregados (MOOD et al., 2013; GAO et al., 2013) com bons resultados no processo de deslignificação e preservação dos polissacarídeos (WAN et al., 2010; MAEDA et al., 2011; RABELO et al., 2014). Aguiar (2010) comparou diferentes pré-tratamentos em palha de milho, palha de trigo e bagaço de cana e também observou um aumento significativo na concentração de celulose e uma redução marcante no teor lignina nesses resíduos após pré-tratamento alcalino. Por outro lado, após pré-tratamentos ácidos o aumento da concentração de celulose e a redução no teor de lignina foram menos significativos, sugerindo que os reagentes alcalinos são mais seletivos para a separação da lignina e na preservação da fração polissacarídica. Além disso, esse processo alcalino possibilita ainda que a mesma seja recuperada com um relativo grau de pureza, o que pode ser interessante para as biorefinarias, pois permite uma flexibilidade na utilização da biomassa (KIM et al., 2016). Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o pré-tratamento com NaOH foi eficiente na deslignificação do material e no aumento da porosidade, promovendo uma redução do grau de polimerização da biomassa do bagaço de cana-de-açúcar.

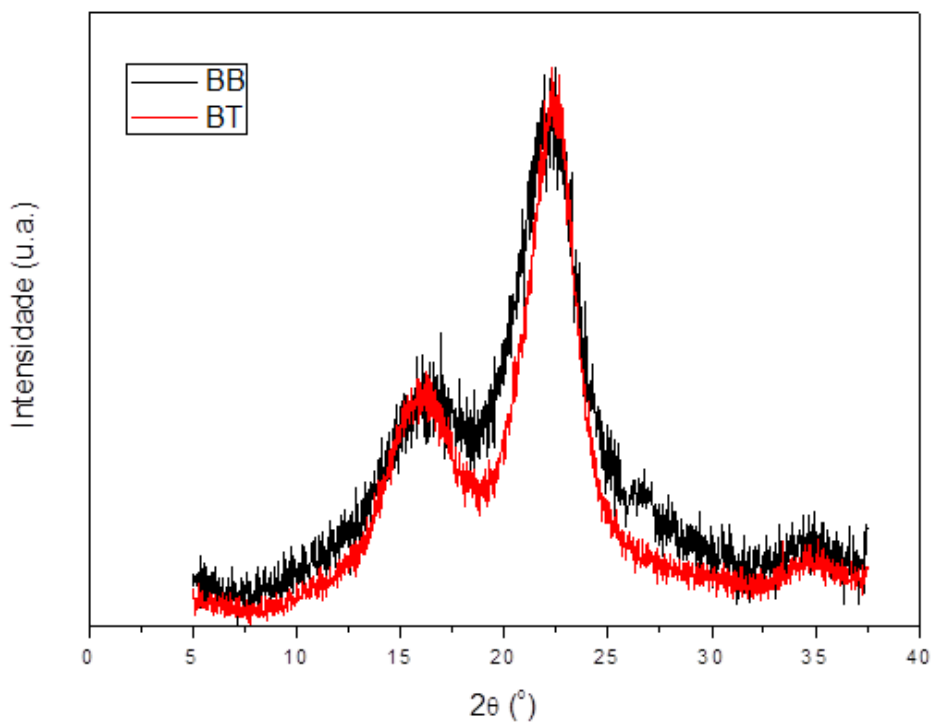
### **5.2.3. Teor de extrativos**

Além de lignina, hemiceluloses e celulose, a fibra do bagaço de cana também é constituída por ácidos graxos, fenóis, ceras e outros compostos orgânicos, conhecidos como extrativos, que podem ser extraídos com água ou solventes orgânicos (NASCIMENTO, 2007; SANTOS, 2008). A presença dos extrativos na fibra lignocelulósica pode tornar o processo de hidrólise incompleta, pois estes compostos podem reduzir o acesso à celulose e hemiceluloses e consumir a alcalinidade durante o pré-tratamento, portanto, devem ser removidos (SLUITER et al., 2010). Além disso, valores altos de extrativos podem interferir na análise de quantificação da lignina, prejudicando uma caracterização mais precisa dos resíduos lignocelulósicos. No presente estudo, a quantidade de extrativos presentes nas fibras de bagaço tratado diminuiu consideravelmente, em relação ao bagaço bruto apenas nos extrativos solúveis em água (de 17,88 para 10,73%), indicando que o pré-tratamento também foi eficiente nessa etapa. Já para os extrativos solúveis em hexano/etanol a redução foi menos significativa de BB para BT (de 13,67 para 12,01%, respectivamente).

#### 5.2.4 Avaliação da cristalinidade

A partir da análise de raios-X, observou-se que o bagaço bruto apresentou menor cristalinidade que o bagaço tratado (Figura 15), com índices de cristalinidade ( $I_c$ ) de 63,02 % em BB e 73,58 % em BT. A menor cristalinidade observada em BB pode ser devida à presença de lignina que é um componente amorfo, enquanto que as hemiceluloses e celulose são materiais semicristalinos. Além disso, após o pré-tratamento, juntamente com a remoção da lignina, pode ter ocorrido a remoção de parte das regiões amorfas da celulose (NASCIMENTO, 2011). Portanto, após o pré-tratamento a fração cristalina passou a ser mais predominante no bagaço tratado, ou seja, ocorreu um enriquecimento do material em celulose, como apontado anteriormente.

Figura 15: Difratoograma obtido das amostras de bagaço bruto (BB) e bagaço tratado (BT).



Fonte: A autora

#### 5.2.5. Análise termogravimétrica (TGA)

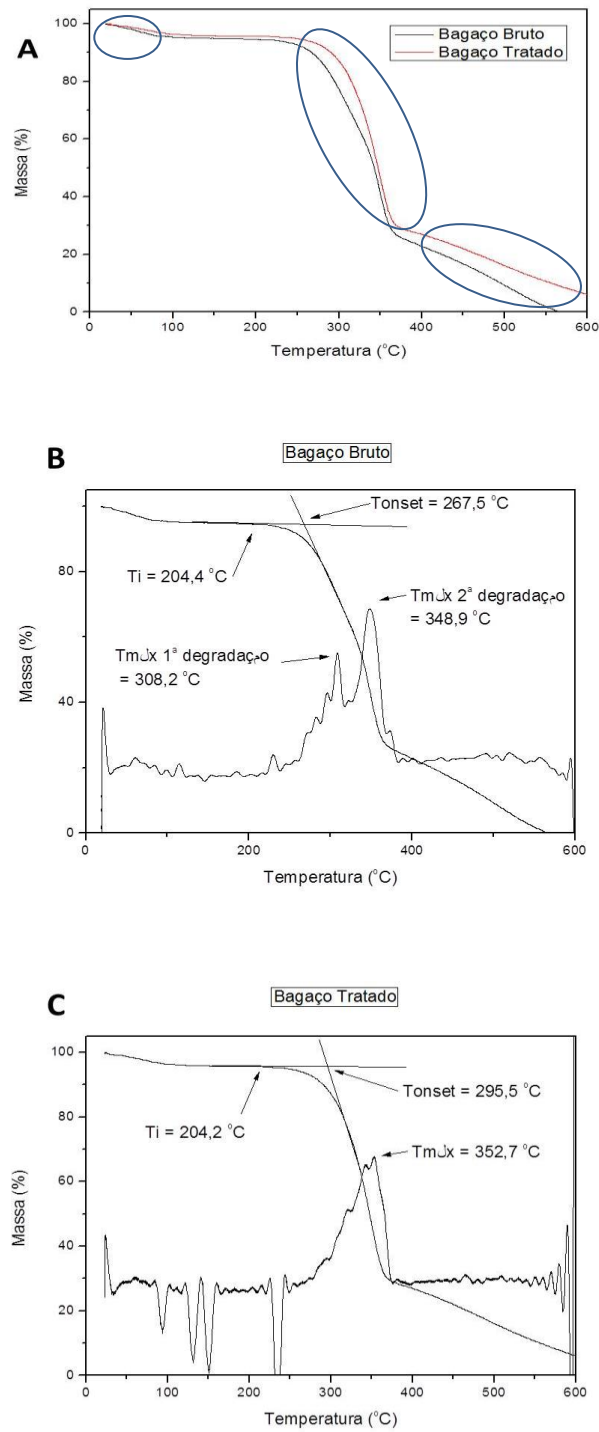
A degradação térmica do bagaço antes (BB) e após o pré-tratamento (BT) foi realizada para determinar a perda de massa em diferentes temperaturas. A degradação térmica apresentou três estágios (Figuras 16 A, B e C). O primeiro ocorreu próximo a 70 °C devido à

evaporação da água (Figura 16 A). Observou-se que BB começou a perder umidade antes de BT, justamente por conter mais água. Nota-se também que a linha de degradação térmica do bagaço bruto está um pouco abaixo da linha do bagaço tratado (Figura 16A).

O segundo estágio representa a etapa principal de degradação e está associado à perda de massa de uma mistura de compostos (Figuras 16B e C). O terceiro estágio está relacionado à carbonização. A intersecção das tangentes das curvas mostrou um ponto de início de degradação do material (representado pelo valor de temperatura “Tonset”). Observou-se que o bagaço bruto (BB) começou a degradar a 267,5 °C, enquanto que em BT, o início da degradação foi a 295,5 °C (Figuras 16B e C, respectivamente). Observa-se ainda que o bagaço bruto apresenta uma faixa de degradação mais ampla (em torno de 267,5 a 390 °C) em relação ao bagaço tratado (em torno de 295,5 a 390 °C), iniciando sua perda de massa em uma temperatura inferior. Essa faixa de degradação mais ampla pode ser justificada pela composição do bagaço bruto, no qual o conteúdo de lignina está preservado e o teor de hemiceluloses é mais elevado.

As curvas também apresentam picos de inflexão representando os pontos máximos de degradação. Em BB, ocorreram dois picos, um com temperatura máxima de 308,2 °C e o segundo com temperatura máxima de 348,9 °C (Figura 14B). Em BT, observou-se apenas um pico, o que pode indicar uma menor quantidade de lignina ( $T_{\text{máx}} = 352,7$  °C) (Figura 16C). As informações dos gráficos estão coerentes com os dados da caracterização química (item 5.2.2), visto que as análises demonstraram maior conteúdo de lignina em BB.

Figura 16: Análise termogravimétrica no bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT). A – termogramas de BB e BT; B – Picos de degradação máxima em BB; C – Picos de degradação máxima em BT.



Fonte: A autora

### 5.3 Hidrólise enzimática

#### 5.3.1 Rendimento em açúcares redutores totais (ART)

As hidrólises foram conduzidas utilizando coquetéis mistos contendo extratos enzimáticos brutos produzidos pelas linhagens *A. fumigatus* SCBM6 (EAF) e *A. niger* SCBM1 (EAN) em diferentes proporções para melhorar a ação sinérgica das enzimas na despolimerização do bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 3). Diferentes combinações das variáveis: tempo, temperatura, porcentagem de substrato e porcentagem de extratos enzimáticos foram delineadas pelo planejamento experimental (2<sup>4</sup>), totalizando inicialmente 30 hidrólises diferentes. Após cada hidrólise, as quantidades de açúcares redutores totais (ART) foram avaliadas pelo método do DNS.

A maior produção de ART (21,68 g/L) foi obtida na hidrólise 29 nas seguintes condições: 36 horas, a 47 °C, concentração de BT de 7,8 % e razão EAF/EAN de 25/75 % (Tabela 6). Já o maior rendimento em ART/grama de bagaço tratado (28,66 %) foi obtido no experimento 5, com a hidrólise realizada por 12 horas, a 47 °C, concentração de BT de 2,2 % e razão EAF/EAN também de 25/75 %.

Valores próximos de ART (31,00 g/L) foram obtidos por Gonçalves (2010) após sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com explosão a vapor. Comparando os resultados obtidos com o trabalho de Gonçalves (2010), observa-se que este autor obteve uma liberação de ART levemente superior, porém, em hidrólises realizadas por 48 horas, a 50 °C, com 6% de bagaço tratado e utilizando extratos enzimáticos de outras espécies fúngicas (*Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori*). O fungo *T. reesei* é um dos mais estudados em hidrólises de biomassa lignocelulósica por possuir enzimas (exoglucanases, endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases) que promovem uma eficiente conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis (GOTTSCHALK et al, 2010; FANG; XIA, 2015; TREEBUPACHATSAKUL et al., 2015). Dessa forma, conclui-se que uma liberação razoável de açúcares redutores totais foi obtida nesse estudo inicial.

Tabela 3 – Açúcares redutores totais (ART) após hidrólises enzimáticas em cada um dos experimentos realizados por Planejamento de Composto Central (PPC) (2<sup>4</sup>).

Experimento	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Concentração de bagaço (%)	Razão <sup>a</sup> EAF / <sup>b</sup> EAN (%)	ART (g/L) <sup>c</sup>	Rendimento <sup>d</sup> (%)
1	36	47	2,2	25	2,419	10,997
2	12	47	2,2	75	2,385	10,842
3	24	55	5	93	1,197	2,394
4	36	63	2,2	25	0,912	4,147
5	12	47	2,2	25	6,307	<b>28,668</b>
6	24	55	5	50	1,754	3,509
7	44,63	55	5	50	3,063	6,125
8	24	68,75	5	50	1,495	2,990
9	36	63	7,8	75	1,725	2,212
10	24	55	5	50	2,664	5,328
11	12	47	7,8	75	7,419	9,511
12	12	63	7,8	75	3,976	5,097
13	12	63	7,8	25	3,811	4,886
14	36	63	7,8	25	4,854	6,223
15	24	55	5	50	1,89	3,780
16	12	63	2,2	25	1,984	9,017
17	24	55	0,19	50	0,001	0,046
18	36	47	2,2	75	0,544	2,471
19	12	63	2,2	75	1,591	7,231
20	24	41,25	5	50	6,111	12,223
21	12	47	7,8	25	17,733	22,734
22	36	63	2,2	75	0,982	4,465
23	24	55	9,81	50	7,061	7,196
24	24	55	5	50	3,283	6,566
25	36	47	7,8	75	9,19	11,782
26	3,37	55	5	50	7,283	14,566
27	24	55	5	50	1,347	2,693
28	24	55	5	50	1,791	3,582
29	36	47	7,8	25	<b>21,68</b>	27,795
30	24	55	5	7	9,737	19,474

<sup>a</sup>EAF: extrato enzimático bruto de *A. fumigatus*;

<sup>b</sup>EAN: extrato enzimático bruto de *A. niger*;

<sup>c</sup>ART: Açúcares redutores totais;

<sup>d</sup>Concentração de g ART/g bagaço x 100;

### 5.3.2 Rendimento em monossacarídeos e dissacarídeos

As concentrações de monossacarídeos e dissacarídeos (glicose, xilose, arabinose e celobiose) foram quantificadas nos hidrolisados do bagaço de cana tratado, a partir de suas respectivas curvas de calibração (Tabela 4). Nesta análise, a maior liberação de glicose (20,18 mg/g de celulose) foi obtida no experimento 16 realizado por 12 horas, a 63 °C, com 2,2 % de bagaço e proporção EAF/EAN de 25/75 %. Para celobiose, o melhor resultado foi no experimento 6 (4,55 mg/g de celulose). Essa produção de celobiose sugere que a despolimerização da celulose não foi completa, indicando ainda a necessidade de otimizar as variáveis aplicadas no PPC, para aumentar o rendimento em glicose. Para xilose, as condições aplicadas no experimento 5 (12 horas, 47 °C, 2,2 % de substrato e razão de extrato EAF/EAN de 25/75 %) foram as mais interessantes para a produção desse açúcar (135,59 mg/g de hemiceluloses). A maior produção de arabinose foi obtida nos experimentos 11 e 12 (57,10 e 58,01 mg/g de hemiceluloses) também realizados por 12 horas. Esses resultados sugerem que o melhor tempo para realização de hidrólise foi de 12 horas.

Moretti et al. (2014) avaliou o pré-tratamento com irradiação por micro-ondas no bagaço de cana-de-açúcar e seu efeito na hidrólise enzimática utilizando extrato enzimático bruto de *Myceliophthora thermophila* M.7.7, contendo atividades de endoglucanases,  $\beta$ -glicosidase e xilanase (47,0, 1,0 e 220,0 U/g, respectivamente) e obteve 23,4 mg/g de glicose, 5,1 mg/g de xilose, 2,4 mg/g de arabinose e 0,6 mg/g de celobiose. No presente estudo, uma liberação aproximada de glicose (20,18 mg/g de celulose) foi obtida. Porém, valores mais altos foram encontrados para xilose, arabinose e celobiose (135,59, 58,01 e 4,55 mg/g de hemiceluloses e celulose, respectivamente).

Estes resultados mostraram que a hidrólise foi mais eficiente para a despolimerização da fração hemicelulósica com alto rendimento em xilose e arabinose. As altas atividades de xilanase e  $\beta$ -xilosidase presentes nos extratos enzimáticos brutos (principalmente no extrato de *A. niger* SCBM6) utilizados nas hidrólises podem justificar a maior eficiência na despolimerização das hemiceluloses. Outro fator que pode ter contribuído para a maior produção de pentoses foi a preservação da fração hemicelulósica no bagaço após o pré-tratamento (Tabela 2).

Tabela 4 – Dissacarídeo e monossacarídeos liberados nas hidrólises de cada um dos experimentos realizados por Planejamento de Composto Central (PPC).

Experimento	Variáveis				Açúcares a partir da celulose (mg/g)		Açúcares a partir de hemiceluloses (mg/g)	
	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Concentração de [bagaço](%)	EAF / EAN (%)	Celobiose	Glicose	Arabinose	Xilose
1	36	47	2,2	25	1,956	4,467	0	88,435
2	12	47	2,2	75	0,062	1,992	1,563	128,963
3	24	55	5	93	3,933	0,037	0	9,118
4	36	63	2,2	25	0,040	0,305	0,061	39,491
5	12	47	2,2	25	0,252	7,592	8,71	<b>135,598</b>
6	24	55	5	50	<b>4,555</b>	0,611	0	1,445
7	44,63	55	5	50	2,466	0,049	0	12,331
8	24	68,75	5	50	0	0	0	6,637
9	36	63	7,8	75	0,023	0,093	0	23,348
10	24	55	5	50	2,876	0,140	0	0,000
11	12	47	7,8	75	2,995	0,606	<b>57,10</b>	66,666
12	12	63	7,8	75	0,601	0,075	<b>58,010</b>	62,694
13	12	63	7,8	25	3,232	0,991	15,856	0
14	36	63	7,8	25	3,698	0,684	3,140	1,442
15	24	55	5	50	3,044	5,405	0	1,258
16	12	63	2,2	25	0,212	<b>20,186</b>	0	0,204
17	24	55	0,19	50	0,112	2,287	0	1,343
18	36	47	2,2	75	0,000	1	0	0,337
19	12	63	2,2	75	2,997	9,514	0	0,114
20	24	41,25	5	50	0	0	0	0,050
21	12	47	7,8	25	1,024	1,276	0	47,421
22	36	63	2,2	75	1,889	0,241	0	22,009
23	24	55	9,81	50	2,979	0,721	0	12,654
24	24	55	5	50	3,536	0,058	0	0
25	36	47	7,8	75	2,440	4,439	0	1,132
26	3,37	55	5	50	2	0	0	34,538
27	24	55	5	50	2,869	1,482	0	0
28	24	55	5	50	3,196	2,905	0	0
29	36	47	7,8	25	2	0	0	0
30	24	55	5	7	0	1	0	0



### 5.3.3 Avaliação do rendimento em xilose e glicose por Superfície de Resposta

Vários estudos têm utilizado métodos de Superfície de Resposta para avaliar diferentes condições de hidrólises, com o objetivo de se obter um máximo rendimento em monossacarídeos ao final dos processos de sacarificação enzimática de biomassas lignocelulósicas. No entanto, atualmente a maioria dos trabalhos tem sido realizada com a utilização de coquetéis de enzimas comerciais (CESÁRIO et al., 2014; BATALHA et al., 2015; COTANA et al., 2015; RAMOS et al., 2015). Rabelo et al. (2014) utilizou um planejamento composto central para avaliar as variáveis tempo e temperatura na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Como extrato enzimático utilizou celulase comercial de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma) e alcançou um alto rendimento em glicose (92%) após a otimização das hidrólises. No presente estudo, os gráficos de superfície de resposta foram construídos a partir da relação entre as variáveis estudadas e o rendimento em monossacarídeos (glicose e xilose) ao final de cada hidrólise (Figuras 17 e 18). O rendimento (%) foi calculado a partir da equação abaixo:

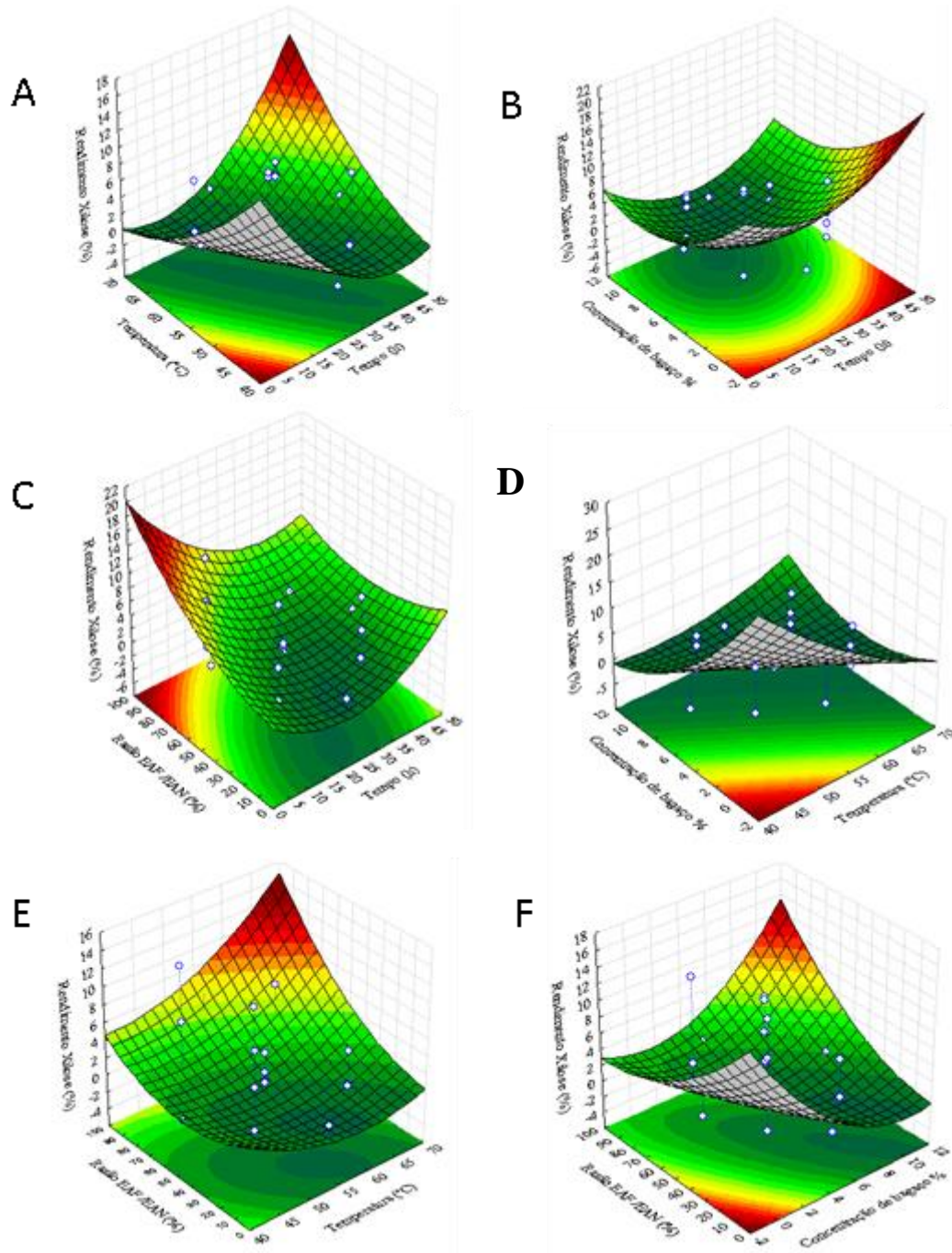
$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{mg de glicose ou xilose} / \text{g de celulose ou g de hemiceluloses}) \times 100$$

De acordo com cada variável aplicada, foram indicadas possíveis condições para melhorar os resultados de futuras hidrólises (Tabela 8). Considerando apenas o rendimento em glicose, as faixas mais realçadas foram: tempo de 1 a 12 horas, temperatura de 40 a 50 °C, concentração de bagaço de até 2 % e razão de extratos enzimáticos EAF/EAN de 25/75 %. Esses valores foram selecionados objetivando maior rendimento em açúcares, principalmente glicose, utilizando condições que possibilitem redução no custo do processo, tais como: menor tempo de hidrólise, menor gasto de energia (ensaios em baixas temperaturas) e utilização de extratos enzimáticos brutos produzidos por FES.

Rendimentos satisfatórios em monossacarídeos foram obtidos em outros estudos de sacarificações enzimáticas otimizadas por Superfície de Resposta. Zhang e Wu (2014) obtiveram 38,5 gramas de glicose em 100 gramas de bagaço de cana, utilizando celulase comercial. Rabelo et al. (2011) aplicou o método de Superfície de Resposta para otimizar as hidrólises enzimáticas e obteve 374 mg de glicose por grama de bagaço (pelo método de Glicose GOD-PAP).

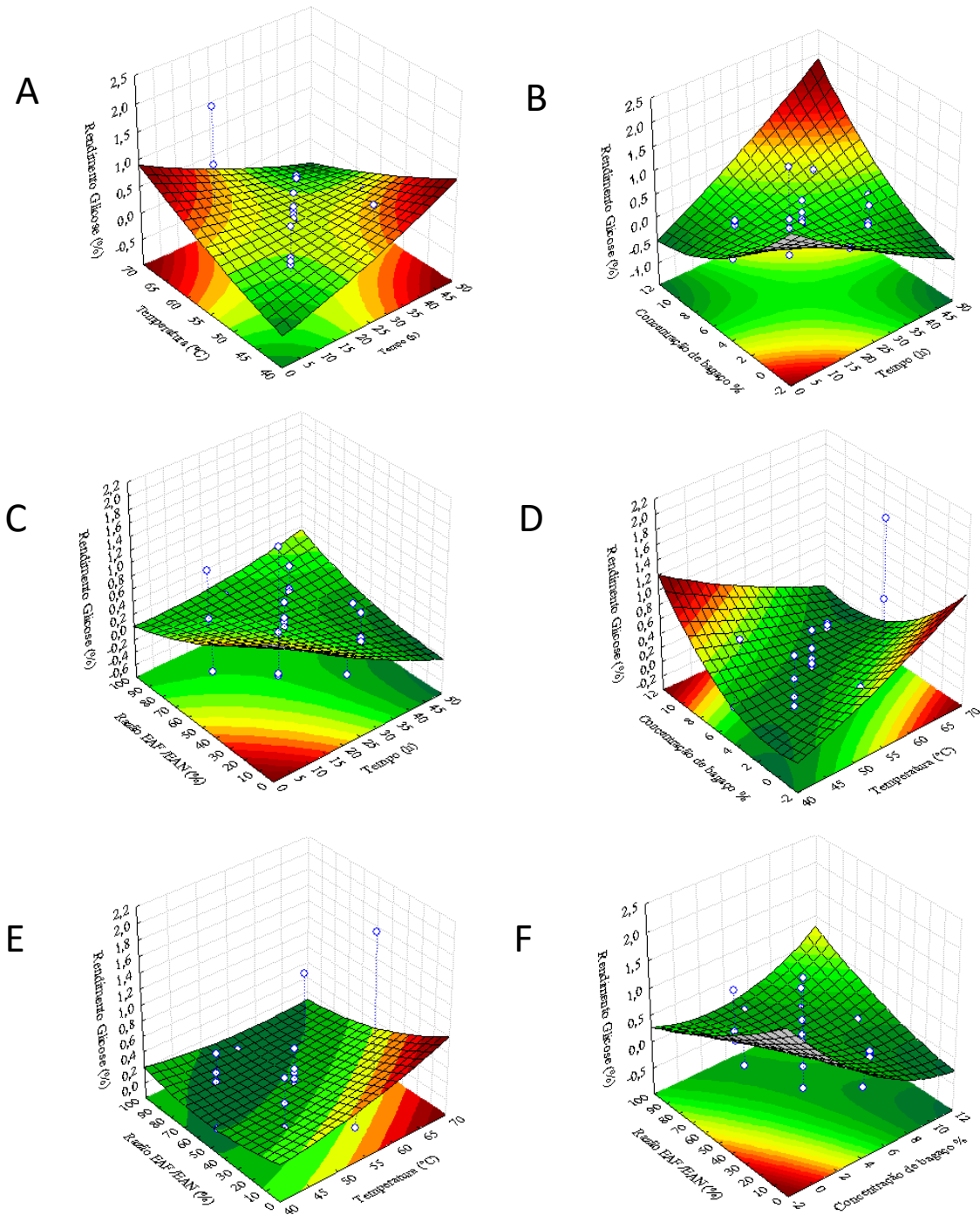
Um estudo realizado por Zimbardi (2014) avaliou a hidrólise enzimática em palha de cana-de-açúcar *in natura*, utilizando coquetéis enzimáticos de três espécies fúngicas *Colletotrichum graminicola*, *Pycnoporus sanguineus* e *T. reesei*. A partir da otimização das variáveis através da metodologia de superfície de resposta obteve um rendimento em ART de 52,3% e de 41,4% em glicose, comprovando assim a eficiência do método.

Figura 17: Superfície de resposta para rendimento de xilose (%) obtido a partir da relação entre as variáveis: A: temperatura e tempo; B: concentração de bagaço e tempo; C: razão EAF/EAN x tempo; D: concentração de bagaço x temperatura; E: razão EAF/EAN x temperatura; F: razão EAF/EAN x concentração de bagaço.



Fonte: A autora

Figura 18: Superfície de resposta do rendimento de glicose (%) obtido a partir da relação entre as variáveis: A: temperatura x tempo; B: concentração bagaço x tempo; C: razão EAF/EAN x tempo; D: concentração bagaço e temperatura; E: razão EAF/EAN x temperatura; F: razão EAF/EAN x concentração de bagaço.



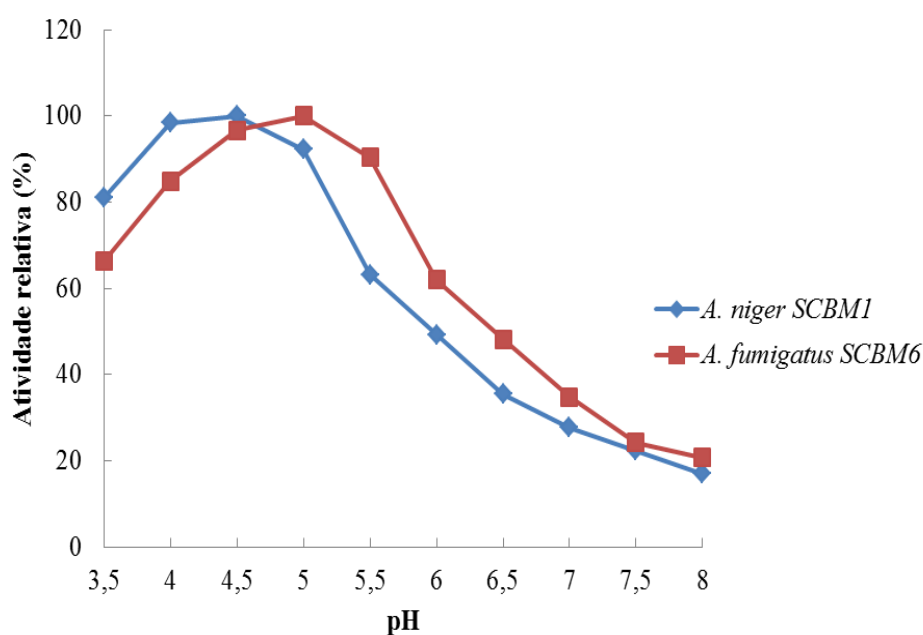
Fonte: A autora

#### 5.4 Influência do pH e temperatura na atividade da $\beta$ -glicosidase

O pH e a temperatura são variáveis importantes no processo de hidrólise e podem ser fatores determinantes para um bom rendimento em açúcares redutores no final da sacarificação. Alterações nos valores de pH, por exemplo, podem influenciar no rendimento de açúcares fermentescíveis, uma vez que as enzimas contidas nos extratos podem ter suas atividades reduzidas em função de desnaturação protéica (NELSON; COX, 2014). Como é sabido, flutuações de pH podem ocasionar alterações nas cargas líquidas dos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura tridimensional de uma enzima, alterando sua conformação nativa e conseqüentemente, sua atividade (NELSON; COX, 2014).

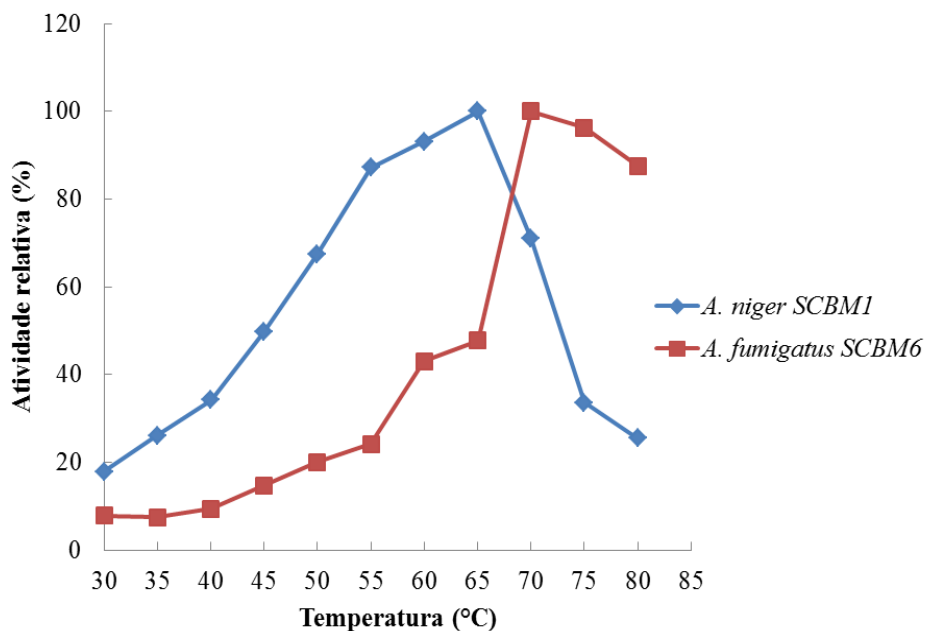
Dessa forma, com o objetivo de melhorar a eficiência na hidrólise enzimática, os extratos enzimáticos brutos produzidos por FES foram caracterizados quanto ao pH ótimo e temperatura ótima para a enzima  $\beta$ -glicosidase. Além disso, a estabilidade da  $\beta$ -glicosidase frente a diferentes valores de pH e temperatura também foi avaliada. Para a  $\beta$ -glicosidase presente no extrato EAN o pH ótimo foi 4,5 e para EAF a atividade ótima foi no pH 5,0 (Figura 19). A temperatura ótima obtida para  $\beta$ -glicosidase foi a 65 °C para EAN e a 70 °C para EAF (Figura 20).

Figura 19 – pH ótimo para a enzima  $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN e EAF (extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente).



Fonte: A autora

Figura 20 – Temperatura ótima para enzima  $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN (*A. niger*) e EAF (*A. fumigatus*).

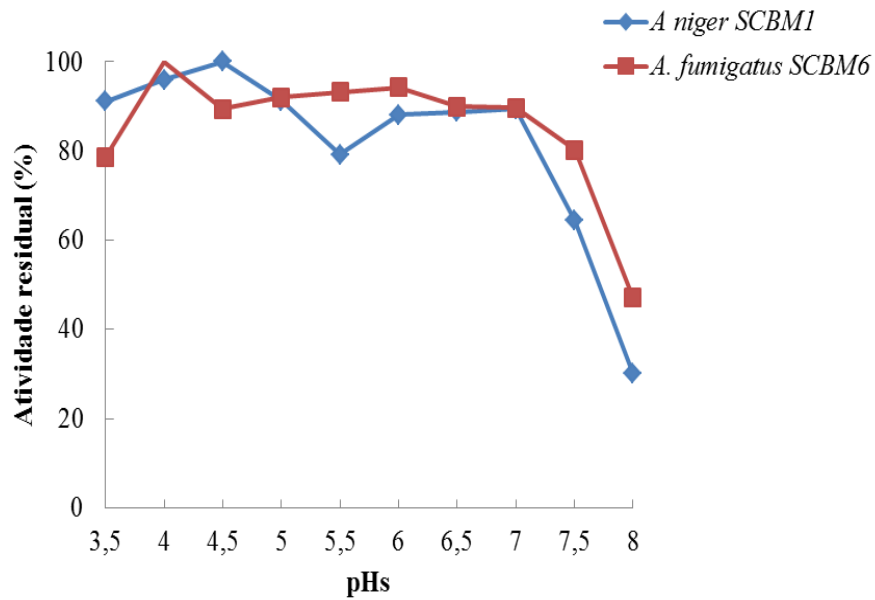


Fonte: A autora

Quanto à estabilidade da  $\beta$ -glicosidase em diferentes pHs, ambos os extratos enzimáticos mantiveram uma atividade residual relativamente constante entre os pHs 3,5 e 7,0, reduzindo drasticamente acima deste valor (Figura 21). A termoestabilidade da enzima em diferentes temperaturas após incubação por 1 hora foi estudada nas condições ótimas de pH e temperatura previamente determinados (Figura 22). Observou-se que após esse período de incubação, a atividade residual máxima ficou entre as temperaturas de 30 e 50 °C. Posteriormente, uma segunda análise foi realizada fixando-se a temperatura em 50 °C e variando o tempo. Nesta análise, a maior atividade residual foi observada após incubação entre 8 e 12 horas para a  $\beta$ -glicosidase obtida de ambos os extratos (Figura 23).

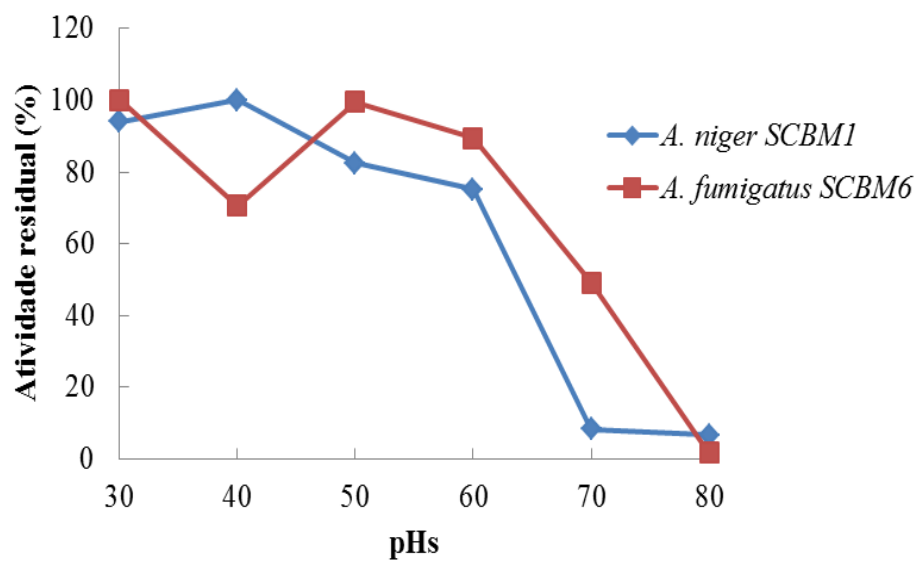
A maioria das enzimas microbianas apresenta melhor desempenho em temperaturas que variam de 30 a 70 °C, sendo que poucas resistem à temperaturas elevadas por muito tempo (NELSON; COX, 2014). Dessa forma, estudos de termoestabilidade são importantes, principalmente para aplicação em processos industriais onde podem ocorrer oscilações na temperatura (MORETTI; 2012). Neste estudo, a atividade residual da  $\beta$ -glicosidase de ambos os extratos enzimáticos reduziu consideravelmente em temperaturas superiores a 50 °C, indicando que em novos processos de hidrólise devemos utilizar temperaturas mais baixas.

Figura 21 – pH de estabilidade da enzima  $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN (*A. niger*) e EAF (*A. fumigatus*).



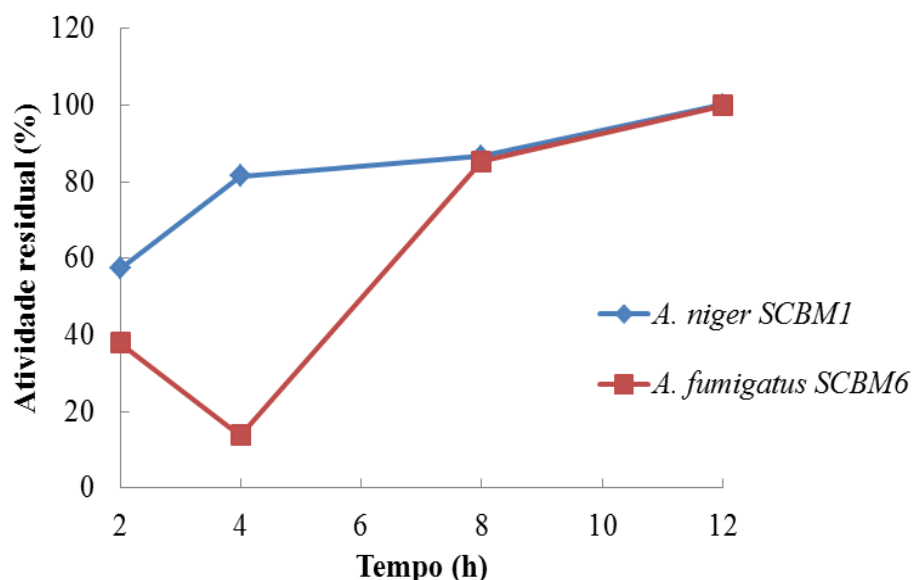
Fonte: A autora

Figura 22 – Termoestabilidade da enzima  $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN (*A. niger*) e EAF (*A. fumigatus*) após 1 hora de incubação.



Fonte: A autora

Figura 23 – Avaliação da atividade residual da  $\beta$ -glicosidase nos extratos EAN (*A. niger*) e EAF (*A. fumigatus*) na temperatura de 50 °C.



Fonte: A autora

### 5.5 Hidrólises utilizando enzima comercial e extratos enzimáticos concentrados

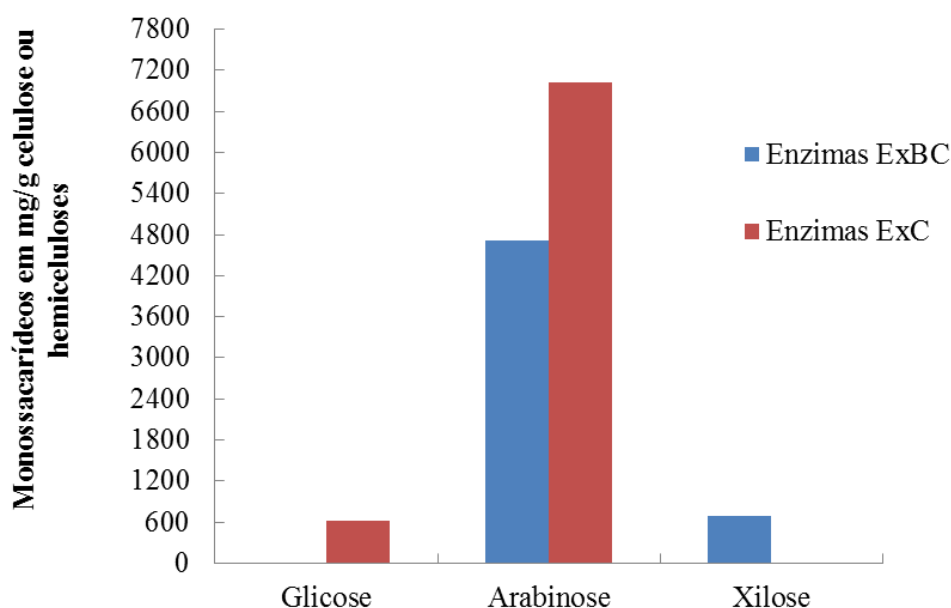
A partir dos resultados obtidos pela metodologia de superfície de resposta e da análise do efeito do pH e temperatura sobre a estabilidade da  $\beta$ -glicosidase nos extratos, duas novas hidrólises foram realizadas com extratos concentrados ou com enzima comercial nas condições indicadas: temperatura fixada em 45 °C, 2,2% de bagaço pré-tratado, tempo de 12 horas, razão de extratos enzimáticos EAF/EAN de 25/75 % e tampão no pH 4.5.

Na hidrólise realizada com extrato bruto concentrado foram obtidos 6,57 g/L em ART, com um rendimento de 29,89%. Na hidrólise realizada com enzima comercial, obteve-se 33,82 g/L de ART e um rendimento de 153,76%. Após a análise cromatográfica, apenas dois monossacarídeos (xilose e arabinose) foram liberados após hidrólise realizada com extratos enzimáticos concentrados (Figura 24). No entanto, essas pentoses foram obtidas em grandes quantidades. Observou-se ainda que o pH e a temperatura aplicados nas hidrólises não foram fatores determinantes no rendimento em monossacarídeos, pois obteve-se altos valores de xilose e arabinose no final do processo. Dessa forma, a principal limitação continua sendo a baixa conversão de celulose em glicose.



Além disso, observou-se que não houve diferença significativa no rendimento (%) e na concentração (g/L) de ART entre o melhor resultado obtido nas primeiras hidrólises (28,66%) e o obtido após a concentração dos extratos brutos (29,89%). Portanto, outro fator está limitando a ação da  $\beta$ -glicosidase e conseqüentemente, a liberação de glicose. Uma possível explicação seria que, provavelmente, a  $\beta$ -glicosidase pode ter sido adsorvida pela lignina residual no bagaço tratado. A “adsorção improdutivo” pode ocorrer quando as enzimas do complexo celulolítico, ao invés de se ligarem à celulose, se ligam a outras superfícies como a da lignina, diminuindo assim a quantidade de enzimas disponíveis para a sacarificação enzimática do resíduo (SIQUEIRA, 2015).

Figura 24 – Monossacarídeos liberados após hidrólises realizadas com extrato de enzima comercial (ExC) (Celic Ctec 3) e extratos enzimáticos concentrados (ExBC).



Fonte: A autora

Siqueira, 2015 avaliou o efeito da lignina residual no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado na hidrólise da celulose com enzimas comerciais e observou que após o pré-tratamento do bagaço com NaOH, a capacidade adsorptiva da lignina aumentou, reduzindo assim o rendimento de açúcares após a hidrólise. No entanto, quando o referido autor utilizou uma

combinação de pré-tratamentos (explosão a vapor e  $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ ), uma maior solubilização da celulose foi obtida.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo e com base em dados da literatura, visando uma melhor conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, principalmente glicose, sugere-se um novo estudo avaliando a associação de diferentes pré-tratamentos para uma maior remoção da lignina e da hemicelulose. Em seguida, a eficiência da hidrólise enzimática deve ser analisada em temperaturas mais brandas e em menor tempo.

## CONCLUSÕES

- A fermentação em estado sólido (FES) foi eficaz na produção de enzimas, obtendo-se altas concentrações de  $\beta$ -glicosidase (78,47 U/g pela linhagem de *A. fumigatus* SCBM6 e 73,0 U/g pela linhagem *A. niger* SCBM1),  $\beta$ -xilosidase (78,0 U/g por *A. niger* SCBM1) e xilanase (1774,50 U/g por *A. fumigatus* SCBM6 e 3289,58 U/g por *A. niger* SCBM1).
- A caracterização da enzima  $\beta$ -glicosidase nos extratos brutos de ambas as linhagens fúngicas (EAF e EAN) em relação ao pH e à temperatura mostrou que ambas as enzimas apresentam pH ótimo ácido, temperaturas ótimas elevadas e ampla estabilidade em diferentes valores de pH. Porém, ambas foram sensíveis a altas temperaturas, com redução expressiva de suas atividades após incubação em diferentes períodos, sugerindo que tal redução pode prejudicar a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis e que as hidrólises devem ser realizadas em temperaturas mais amenas.
- O pré-tratamento alcalino foi eficiente na remoção de lignina, na preservação da fração polissacarídica (celulose e hemiceluloses) e no aumento da porosidade das fibras do bagaço de cana-de-açúcar. Porém, não removeu a quantidade de lignina necessária para permitir uma alta conversão de glicose.
- As hidrólises apresentaram bom rendimento em açúcares redutores totais (ART) (28,66 %), moderada concentração de xilose e arabinose (135,59 mg e 58,10 mg por grama de hemiceluloses, respectivamente) e baixa liberação de glicose (20,18 mg/g de celulose), sugerindo que os extratos enzimáticos utilizados foram mais eficientes na despolimerização da fração hemicelulósica.
- Na hidrólise com extratos enzimáticos concentrados, o rendimento em ART não diferiu das primeiras análises, aumentando discretamente (29,89%). Porém, as concentrações dos monossacarídeos xilose e arabinose aumentaram consideravelmente (694,45 mg/g e 4715,01 mg/g de hemicelulose).
- A metodologia de Superfície de Resposta indicou as melhores condições para aplicação em experimentos futuros de hidrólise com o objetivo de aumentar o rendimento em glicose (12 horas, 40 - 50 °C, concentração de bagaço de até 2 % e razão de 25 / 75 % para os extratos EAF / EAN), para sua posterior utilização na produção de etanol de segunda geração.

## REFERÊNCIAS

ADLER, Erich. Lignin chemistry – past, present and future. **Wood Science And Technology**, v. 11, n. 3, p.169-218, 1977.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010, 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de engenharias e Ciências Exatas. Universidade Estadual do oeste do Paraná – Toledo, PR, 2010.

AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid state fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v.28, p.201-237, 1982.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, 340–349, 2007

ARAÚJO, C. R.; GARRIDO, C. V. S.; SANTOS, J. M. G. M.; LEAL, S. C. S.; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, 12. **Anais...** UNIFACS, 2013.

BAFFI, M. A.; TOBAL, T.; LAGO, J. H. G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. A Novel  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking. **Journal of Food Science**, Vol. 76, n. 7, 2011.

BAFFI, M. A., 2014. Enzimas microbianas envolvidas na produção de etanol celulósico a partir de resíduos agroindustriais. In: **Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas**. XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 33. Editora da Universidade Federal de Uberlândia. p. 323-334.

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

BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v.180, p. 97–105, 2015.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S.K. Production of celulasas from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n. 7, p.1341-1346, 2012.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.286-290, nov. 1985.

BON, E. P.S.; FERRARA, M. A. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. **Document prepared for "The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries"**, an FAO seminar held in Rome on. 11p.,2007. Disponível em:< <http://www.fao.org/biotech/docs/bon.pdf>> . Acesso em: 20 de abr. 2015.

BOONYUEN, N; MANOCH, L.; LUANGSA-ARD, J.; PIASAI, O.; CHAMSWARNG, C.; CHUASSEHARONNACHAI, C.; UEAPATTANAKIT, J.; ARNTHONG, J.; SRI-IDRASUTDHI, V. Decomposition of sugarcane bagasse with lignocellulose-derived thermotolerant and thermoresistant *Penicillia* and *Aspergilli*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 92, p. 86-100, 2014.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Cioresource Technology**, v. 101, p. 4862-4874, 2010.

BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010, 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo – Lorena, 2010.

BROWNING, B. L. Methods of wood chemistry. New York: **Interscience Publishers**. v.2. p. 561-587, 1967

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A.C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designet cocktail. **Bioresource Technology**, v.187, p.173–181, 2015.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of a sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. Review Article. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química. Nova**, Vol. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H., HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p. 1462– 147, 2012.

CESÁRIO, A. L. L.; COSTA, A.C.; RABELO, S. C. Effect of particle size on dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering transaction**, v. 37, p. 409-414, 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology review**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COTANA, F; BURATTI, C.; BARBANERA, M.; LASCARO, E. Optimization of the steam explosion and enzymatic hydrolysis for sugars production from oak woods. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 470–477, 2015.

DAMASCENO, C. M. B.; SOUSA, S. M.; NODA, R. W.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. A importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração. **EMBRAPA Documento 108**, p.23, 2010.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n.4, p.497, 2001.

DIPARDO, J. Outlook for biomass ethanol production and demand. Washington, D. C.: U. S. Department of Energy. **Energy Information Administration**, 2000. 12 p.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2, p.113-125, 2003.

FANG, H.; XIA, L. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. **Fuel**, v. 143, p.211-216, mar. 2015.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **EMBRAPA, Documentos54**, 2011.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: Definições e perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 12, n. 1.Três Lagoas, MS, 2015. Disponível em:<  
[http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoatual/sumario/downloads/2015/2.%20Ci%C3%AAncias%20Exatas%20e%20da%20Terra,%20Engenharias%20e%20Ci%C3%AAncias%20Agr%C3%A1rias/010%20\(Eng\\_Alimentos\)%20ETANOL%20DE%20SEGUNDA%20GERA%C3%87%C3%83O%20-%20defini%C3%A7%C3%A3o%20e%20perspectivas.pdf](http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoatual/sumario/downloads/2015/2.%20Ci%C3%AAncias%20Exatas%20e%20da%20Terra,%20Engenharias%20e%20Ci%C3%AAncias%20Agr%C3%A1rias/010%20(Eng_Alimentos)%20ETANOL%20DE%20SEGUNDA%20GERA%C3%87%C3%83O%20-%20defini%C3%A7%C3%A3o%20e%20perspectivas.pdf)> Acesso em: 28 de Ago. 2015.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, YU.; YU, QIANG; YUAN, Z.; LIU, Y. Effects of diferente pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396–400, 2013.

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

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Revista. Microbiologia**, v. 29, p. 187-192, 1998.

GONÇALVES, D. L. **Produção de álcool combustível a partir de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia). Faculdade de Biotecnologia. Universidade federal de Santa Catarina, 2010.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1-2, p.72-78, ago. 2010.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; MACEDO, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p.23-33, 2015.

HENRIQUE, M. A.; SILVÉRIO, H. A.; NETO, W. P. F.; PASQUINI, D. Valorization of an agro-industrial waste, mango seed, by the extraction and characterization of its cellulose nanocrystals. **Journal of Environmental Management**, v.121, p.202-209, 2013.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo a árvore do conhecimento agroenergia. **EMBRAPA, Documentos 95**, 2009.

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, n.4, p. 679-689, 2013.

KIM J. S.; LEE, Y. Y.; KIM T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p.42-48, jan. 2016.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic Biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 48, n.20, p.3713–3729, 2009.

LI, J.; LI, S.; HAN, B.; YU, M.; LI, G.; JIANG, Y. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p.174-186, 2013.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; JUNIOR, N. P.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46:, p.1196–1201, 2011.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Companhia Nacional de Abastecimento Superintendência de Informações do Agronegócio (2008). O ETANOL COMO UM NOVO COMBUSTÍVEL UNIVERSAL. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/O%20Etanol%20como%20Novo%20Combust%20C3%ADvel%20Universal%20%20\(pdf\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/O%20Etanol%20como%20Novo%20Combust%20C3%ADvel%20Universal%20%20(pdf).pdf)> Acesso em: 04 de Dez. 2015.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Companhia Nacional de Abastecimento Superintendência de Informações do Agronegócio. In: Nota Técnica DEA 24/14 – Boletim de conjuntura energética – 1º trimestre de 2014, 2014. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/mercado/Documents/S%C3%A9rie%20Estudos%20de%20Energia/DEA%2024%20-%20Boletim%20I%20Tri%202014.pdf>>. Acesso em: 27 de jan. 2015.

MARYANA, R.; MA'RIFATUN D.; WHENI, I. A.; SATRIYO, K. W.; RIZAL, W. A. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v. 47, p.250-254, 2014.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; GONZÁLEZ, M.; CASTRO, E.; MUSSATTO, S. I. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v.168, p. 1157–1162, 2011.

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

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v.109, n. 6, p.1430-1442, 2012.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAD, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p. 77–93, 2013.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M.. Documento 236 - Procedimentos para Análise Lignocelulósica. **EMBRAPA**, Campina Grande, PB, 2010.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. 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. Disponível em:  
<<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v29n3/a14v29n3.pdf>> Acesso em: 03 de ago. 2015.

MORETTI, M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RORIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MORETTI, M. M. S.; MARTINS, D. A. B.; NUNES, C. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p.189-195, jun. 2014.

MOTAUNG, T.E.; ANANDJIWALA, R.D.,. Effect of alkali and acid treatment on thermal degradation kinetics of sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.472–477, 2015.

NASCIMENTO, R. A. A. – **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação dos compostos de degradação e reações envolvidas**, 133f, 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena Universidade de São Paulo – USP, 2007.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino(NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 138f, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de ciências exatas e tecnologia. Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**: LEHNINGER. 6. ed. Madison: Artmed, 2004. 1328 p.

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

OLIVEIRA, L.R.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**. v.58, p.1–7. 2014.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 65-72, 2004.

PALLAPOLUA, V. R.; LEEA, Y.Y.; GARLOCK, R. J.; BALANB V.,; DALEB, B. E.; KIMD, Y.; MOSIERD, N. S.; LADISCHD, M. R.; FALLSE, M.; HOLTZAPPLEE, M. T.; SIERRA-RAMIREZF, R.; SHIG, J.; EBRIKG, M. A.; REDMOND, T.; YANGG, B.; WYMANG, C. E.; DONOHOEH, B. S.; VINZANTH, T. B.; ELANDERH, R. T.;

HAMESI, B.; THOMASI S.; WARNERJ, R. E. Effects of enzyme loading and  $\beta$ -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Colombia, v. 102, p. 1111511120, 2011.

PEDERSEN, M.; VIKSO-NIELSEN, A.; MEYER, AS. Monosaccharide yields and lignina Remova lfrom wheat straw in response to pH and catalyst type during mild thermal pretreatment. **Process Biochemistry**, v.45, p.1181–6, 2010.

PEREIRA, B. **Produção de lignina peroxidase com a utilização de Subprodutos industriais**. 38f, 2014. Monografia (Bacharel Engenharia Industrial química) – Escol de engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, SP, 2014.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p.928-939, 4 fev. 2015.

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 82f, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo , SP, 2012.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, F. S. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v.74, p.17-20, 2006.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**, 150f, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acessado em 18 ago. 2009.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento de hidrolise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 414f, 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química ) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABELO, S.C.; FONSECA, N.A. A.; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.2600 – 2607, 2011.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R; COSTA, A.C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p.349-357, nov. 2014.

RAMOS, L. P.; SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v.175, p. 195–202, 2015.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n. 54, pp.18, 2011.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; SILVA, V.F.N.; CORSO, D.L.S., GONÇALVES, A.R., Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.63–68, 2014.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; ALVES, A. R. G.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical, **Industrial Crops and Products**, v.64, p.52–58, 2015.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURIL, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p.912-919, 2011.

RYABOVA, O.; VRSANSKA, M.; KANEKO, S.; VAN ZYL, W. H.; BIELY, P. A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. **Febs Letters**, v. 583, n. 9, p.1457-1462, maio 2009.

SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p.903-910, 2015.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ J. H.; COLODETTE J. L.; FERNANDES S. A.; GUIMARÃES V. M.; REZENDE, S. T. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. **Quimica Nova**, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, I. D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**. 92f, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Universidade de Brasília, Brasília. 2008.

SANTOS, M. L.; OMAR, J. L.; EDUARDO, J. N.; KATIA, J. C.; PAULO, S. C. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p.507-511, 2011.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, Princeton, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

SIQUEIRA, F.G.; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FERREIRA FILHO, E.X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.20-26, 2010.

SIQUEIRA, G. A. **Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose**, 141f, 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2015.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p.541–549, 2010.

SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J. et al. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, 2010.

SOUZA, S. C. **Derivatização química e caracterização de uma lignina do bagaço de cana-de-açúcar**, 79f, 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SOUZA, O; SANTOS, I. E. Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes. **Comunicado Técnico 07**. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento – MAPA. Aracajú – SE, 2002. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/download/CMT07.pdf>> . Acesso em: 22 de julh. 2015.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P.. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 22, n. 1, p.33-64, jan. 2002

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Jornal of Molecular Sciences**, v. 9, n.9, p. 1621-1651, 2008.

TAKAHASHI, T.; SATO Y.; ITO K.; MORI H. Effect of agitation speed on enzymatic saccharification of drypulverized lignocellulosic biomass. **Renewable. Energy**, v.62, p.754-760, 2014.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.338-350, 2006.

TREEBUPACHATSAKUL, T.; SHIOYA, K.; NAKAZAWA, H.; KAWAGUCHI, T.; MORIKAWA, Y.; SHIDA, Y.; OGASAWARA, W.; OKADA, H. Utilization of recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -glucosidase I (JN11) for a more economical production of ethanol from lignocellulosic biomass. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 120, n. 6, p.657-665, dez. 2015.

WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J.M.; GOUVEIA, E. R. G. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.128, p. 448–453, 2013.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review Of Entomology**, v. 55, n. 1, p.609-632, jan. 2010.

ZHANG, H.; WU, S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.158, p.161–165, 2014.

ZHENG, Y.; ZHANG, S.; MIAO, S.; SU, Z.; WANG, P. Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 3, p.135-143, jul. 2013.

ZHOU, J. WANG, Y.; CHU, J.; LUO, L.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v.100, n. 2, p. 819–825, 2009.

ZIMBARDI, A. L. R. L. **Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica.** 203f, 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de pós-graduação em química. Universidade de São Paulo, 2014.