

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**JÉSSICA CRECENCIO MATEI**

**PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM  
ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA  
2018**

**JÉSSICA CRECENCIO MATEI**

**PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM ENZIMAS  
LIGNINOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel  
Coorientadora: Profa. Dra. Marlene Soares

CURITIBA  
2018

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

M425p Matei, Jéssica Crecencio  
2018 Pré-tratamento de resíduos agroindustriais com enzimas  
ligninolíticas para produção de bioetanol / Jéssica  
Crecencio Matei.-- 2018.  
99 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.  
Texto em português, com resumo em inglês.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2018.  
Bibliografia: p. 83-93.

1. Bagaço de cana. 2. Cascas de arroz. 3. Etanol.  
4. Fungos. 5. Hidrólise. 6. Tecnologia ambiental.  
7. Engenharia ambiental - Dissertações. I. Maciel,  
Giselle Maria, orient. II. Soares, Marlene, coorient.  
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa  
de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst.  
IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 091

A Dissertação de Mestrado intitulada PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Jéssica Crencio Matei**, no dia 23 de fevereiro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Giselle Maria Maciel - Presidente – UTFPR

Prof(a). Dr(a). Lucia Regina Rocha Martins – UTFPR

Prof(a). Dr(a). Luciana Porto de Souza Vandenberghe – UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

## AGRADECIMENTOS

Primeiro agradecer a Deus, por me dar forças para subir mais este degrau.

Aos meus pais, por auxiliarem em tudo que foi necessário. Mãe, obrigada por me segurar e manter-me sempre em pé, me encorajando a continuar e nunca desistir. Obrigada por todo o carinho e dedicação em mais esta etapa da minha vida.

Ao Marcelo, pelo companheirismo e paciência. Obrigada por me acalmar e ajudar em tempos difíceis, sempre me lembrando sobre a luz no fim da travessia.

Aos meus queridos companheiros do mestrado, Rafael, Bárbara, Olga, Maria Paula, Anna Lou e as Alines (Bisinella e Hermann), muitíssimo obrigada por estarem comigo em todas as crises, de ansiedade, desespero e choros. Só vocês para tornarem tudo mais divertido durante estes dois anos.

Aos colegas dos laboratórios de microbiologia e biotecnologia, agradeço pela colaboração e ajuda ao longo dessa subida, bem como pelas conversas e risadas do dia a dia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), por transmitirem seus conhecimentos, ajudando na formação acadêmica e nas pesquisas que desenvolvi durante o mestrado.

Um agradecimento especial à minha orientadora Giselle Maria Maciel e à minha coorientadora Marlene Soares. Obrigada por estarem sempre presentes, me dando a assistência necessária para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço à vocês também, sendo eu mesma e não a aluna, pois vocês são o máximo e eu não poderia estar mais feliz com a orientação de pessoas tão queridas para mim.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), que possuía toda a infraestrutura, bem como os materiais e equipamentos necessários para a realização deste estudo.

E à todos aqueles que posso ter esquecido de mencionar, mas que, de alguma maneira, cooperaram para a realização de mais este trabalho.

*Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.*

**(Martin Luther King)**

## RESUMO

MATEI, Jéssica Crecencio. **Pré-tratamento de resíduos agroindustriais com enzimas ligninolíticas para produção de bioetanol.** 100 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Em 2017 foram produzidas ao redor do mundo, aproximadamente, 515 milhões de toneladas de bagaço de cana e 102 milhões de toneladas de cascas de arroz. Estes resíduos podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração, pois a celulose existente na composição de ambos pode ser hidrolisada e, então, fermentada. Contudo, é necessário um tratamento nas biomassas para reduzir a barreira de lignina presente, sem gerar componentes tóxicos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de um pré-tratamento biológico, com extratos enzimáticos produzidos por fungos da podridão branca, em bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz, para posterior sacarificação e fermentação. Os fungos estudados foram: *Trametes* sp., *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus splitgerberi*, *Perenniporia* sp. e *Aurantioporus pulcherrimus*. A produção dos extratos enzimáticos foi realizada em um meio nutritivo com incorporação de indutores naturais de enzimas ligninolíticas (casca de arroz ou bagaço de cana). Os cultivos foram realizados a 28°C em estufa, durante 7 dias e a atividade das enzimas foi determinada por análises colorimétricas. Os melhores resultados de produção enzimática foram alcançados por *Trametes* sp., com atividade máxima de 9467,8 U/L de lacase produzida na presença de cana, e *Pleurotus pulmonarius*, que apresentou 5099,9 U/L desta enzima com casca de arroz. Posteriormente, os extratos enzimáticos obtidos pelo *Trametes* sp., contendo lacase como principal enzima ligninolítica, foram aplicados nos resíduos de cana ou arroz em conjunto com outros fatores (hidroxibenzotriazol, Tween 80, tampão acetato de sódio, peróxido de hidrogênio, 2,6-dimetoxifenol e ácido 4-hidroxibenzoico) para um tratamento de 48 horas, a 28°C sob agitação de 130 rpm. Em seguida, os produtos oriundos do pré-tratamento foram sacarificados, durante 72 horas a 50°C, com o coquetel enzimático Cellic Ctec2 (Novozymes). A determinação de sacarídeos foi realizada através do ácido 3,5-dinitrosalicílico. O tratamento enzimático contendo todos os fatores resultou em 0,22 g/L e 0,30 g/L de açúcares, no bagaço de cana e na casca de arroz, respectivamente, correspondendo a pelo menos o dobro do valor do controle (tratado somente com água fervente). Para este mesmo tratamento, a sacarificação aumentou a concentração de açúcar em mais de 9 vezes quando comparado com o controle, resultando em 4,07 g/L de açúcares no substrato de cana e 3,39 g/L no resíduo de arroz. A fermentação com o hidrolisado da cana foi realizada a 28°C em um período de 36 horas para dois isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. Os rendimentos observados foram de 5,30 e 4,64 gramas de açúcar por grama de etanol, com uma produtividade em torno de 0,5 g/(L.h), obtendo-se 18,62 e 16,02 g/L do álcool etílico ao final do processo fermentativo.

**Palavras-chave:** Bagaço de cana. Casca de arroz. Etanol de segunda geração. Fungos da Podridão Branca. Hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

MATEI, Jéssica Crecencio. **Pretreatment of agroindustrial waste with ligninolytic enzymes for bioethanol production.** 100 f. Dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2018.

In 2017 approximately 515 million tons of sugarcane bagasse and 102 million tons of rice husks were produced around the world. These residues can be used for the production of second generation ethanol, as the cellulose present in the composition of both can be hydrolyzed and then fermented. However, a treatment in the biomass is necessary to reduce the present lignin barrier, without generating toxic components. In this way, the objective of this work was to evaluate the application of a biological pretreatment with enzymatic extracts produced by white rot fungi, in sugarcane bagasse and rice husk, for saccharification and fermentation. The fungi studied were: *Trametes* sp., *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus splitgerberi*, *Perenniporia* sp. and *Aurantioporus pulcherrimus*. The production of enzymatic extracts was carried out in a nutrient medium incorporated of natural inducers of ligninolytic enzymes (rice husk or sugarcane bagasse). The cultures were incubated at 28°C in static condition for 7 days and the activity of the enzymes was determined by colorimetric analysis. The best results were obtained by *Trametes* sp., with a maximum activity of 9.467,8 U/L of laccase produced in the presence of sugarcane, and *Pleurotus pulmonarius*, which presented 5.099,9 U/L of this enzyme with rice husk. Subsequently, the enzymatic extracts obtained by *Trametes* sp., containing laccase as the main ligninolytic enzyme, were applied to cane or rice wastes together with other factors (hydroxybenzotriazole, Tween 80, sodium acetate buffer, hydrogen peroxide, 2,6-dimethoxyphenol and 4-hydroxybenzoic acid) in a treatment at 28°C, 48 hour under stirring at 130 rpm. Then, the products from the pre-treatment were saccharified, for 72 hours at 50°C, with the enzymatic cocktail Cellic Ctec2 (Novozymes). The determination of saccharides was performed by 3,5-dinitrosalicylic acid. The enzymatic treatment containing all factors resulted in 0.22 g/L and 0.30 g/L of sugars, in sugarcane bagasse and rice husk, respectively, corresponding to at least double the value of the control (treated only with boiling water). In this same treatment, the saccharification increased the sugar concentration by more than 9 times when compared to the control, resulting in 4.07 g/L sugars in the cane substrate and 3.39 g/L in the rice residue. Fermentation with cane hydrolyzate was performed at 28°C during 36 hours for two isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. The yields observed were 5.30 and 4.64 grams of sugar per gram of ethanol, with a productivity around 0.5 g/(L.h), yielding 18.62 and 16.02 g/L of the alcohol at the fermentation process end.

**Keywords:** Enzymatic hydrolysis. Rice husk. Second generation ethanol. Sugarcane bagasse. White rot fungi.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Consumo de energia nos transportes em 2016 no Brasil.....	17
Figura 02 – Rotas para a produção de bioetanol.....	18
Figura 03 – Composição de materiais lignocelulósicos.....	22
Figura 04 – Estrutura química da lignina.....	23
Figura 05 – Ciclo catalítico da lacase.....	31
Figura 06 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase.....	32
Figura 07 – Ciclo catalítico da manganês peroxidase.....	34
Figura 08 – Processo da fermentação alcoólica.....	37
Figura 09 – Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.....	40
Figura 10 – Fotografia das amostras de bagaço de cana-de-açúcar (A) e casca de arroz (B), <i>in natura</i> após secagem.....	41
Figura 11 – Fotografia de placas de Petri contendo o crescimento micelial de alguns fungos utilizados na pesquisa, após cultivo a 28°C com período entre 7 e 10 dias.....	43
Figura 12 – Esquema de produção dos extratos enzimáticos.....	44
Figura 13 – Fotografia dos frascos com crescimento fúngico em cultivo líquido estático após 7 dias a 28°C.....	53
Figura 14 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de fenólicos totais após o pré tratamento do bagaço de cana (A) e da casca de arroz (B).....	58
Figura 15 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após o pré tratamento do bagaço de cana (A) e da casca de arroz (B).....	60
Figura 16 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para o bagaço de cana em um espectro completo (A) e em outro com a região 700 - 2200 cm <sup>-1</sup> ampliada (B) (n=2).....	62
Figura 17 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para a casca de arroz em um espectro completo (A) e em outro com a região 700 - 2200 cm <sup>-1</sup> ampliada (B) (n=2).....	63
Figura 18 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	68
Figura 19 – Perfil estatístico para valores previstos correlacionado ao bagaço de cana.....	70
Figura 20 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática da casca de arroz.....	71
Figura 21 – Perfil estatístico para valores previstos correlacionado à casca de arroz.....	73
Figura 22 – Microscopia eletrônica de varredura para o bagaço de cana e casca de arroz com as melhores condições da segunda otimização.....	76

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01 – Resultados do consumo de açúcares e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da Sigma-Aldrich (n=2).....77
- Gráfico 02 – Resultados do consumo de açúcares e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da Fleischmann (n=2).....77

## LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Características das usinas de etanol 2G com produção em escala comercial mundial em 2016.....	20
Quadro 02 – Efeitos de diferentes pré-tratamentos, com suas vantagens e desvantagens, em materiais lignocelulósicos.....	27
Quadro 03 – Efeito do pré-tratamento fúngico na hidrólise enzimática e produção de bioetanol.....	28
Quadro 04 – Comparação com as vantagens e as limitações entre as técnicas de sacarificação e fermentação (simultâneas ou separadas) em um processo fermentativo.....	38
Quadro 05 – Rendimento de etanol a partir de alguns substratos em um processo fermentativo com diferentes microrganismos.....	39
Quadro 06 – Características dos picos de celulose, hemicelulose e lignina analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição química percentual de diferentes resíduos agrícolas e florestais.....	24
Tabela 02 – Matriz experimental do pré-tratamento enzimático (Plackett-Burman design) de bagaço de cana e casca de arroz (n=2).....	47
Tabela 03 – Produção enzimática pelos fungos da podridão branca testados (n=2).....	54
Tabela 04 – Matriz do planejamento experimental (Plackett–Burman design) e resultados da composição fenólica das amostras após pré-tratamento (n=2).....	57
Tabela 05 – Matriz do planejamento experimental (Plackett–Burman design) e resultados da quantificação de açúcares redutores das amostras após pré-tratamento (n=2).....	59
Tabela 06 – Picos da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com valores de acréscimo e decréscimo de absorvância sob o substrato <i>in natura</i> (n=2).....	65
Tabela 07 – Matriz do planejamento experimental do pré-tratamento e resultados da quantificação de açúcares redutores das amostras após sacarificação com Cellic Ctec2 (n=2).....	66
Tabela 08 – Análise de variância dos resultados da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	68
Tabela 09 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) após sacarificação de bagaço de cana sob efeito de Tween 80 e extrato enzimático (rico em lacase), por delineamento Box-Behnken (n=2).....	69
Tabela 10 – Análise de variância dos resultados da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática da casca de arroz.....	72
Tabela 11 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) após sacarificação de casca de arroz sob efeito de extrato enzimático (rico em lacase), ácido 4-hidroxibenzóico (AHB) e tampão acetato de sódio (pH 5,0), por delineamento Box-Behnken (n=2).....	73
Tabela 12 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) e etanol, obtidos após fermentação com o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar (n=2).....	79

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS .....	16
3.1.1 Etanol .....	17
3.1.2 Etanol de Segunda Geração .....	19
3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	21
3.2.1 Bagaço de Cana .....	24
3.2.2 Casca de Arroz .....	25
3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	26
3.3.1 Pré-Tratamento Biológico .....	27
3.3.2 Fungos da Podridão Branca .....	29
3.3.3 Enzimas Ligninolíticas .....	30
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA / SACARIFICAÇÃO .....	34
3.5 PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	36
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	40
4.1 AMOSTRAS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....	41
4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS BASIDIOMICETOS .....	42
4.3 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS .....	43
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	45
4.4.1 Enzimas Ligninolíticas .....	45
4.4.2 Celulases Totais .....	45
4.5 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS .....	46
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS TRATADOS .....	48
4.6.1 Quantificação de Compostos Fenólicos .....	48
4.6.2 Quantificação de Açúcares Redutores .....	48
4.6.3 Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier ..	49
4.7 SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	50

4.8 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO ....	51
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	52
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	53
5.2 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DOS SUBSTRATOS .....	57
5.2.1 Caracterização por Fenólicos Totais .....	57
5.2.2 Caracterização por Açúcares Redutores.....	59
5.2.3 Caracterização por FTIR (ATR).....	61
5.3 SACARIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO .....	66
5.3.1 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana .....	67
5.3.2 Hidrólise Enzimática da Casca de Arroz .....	71
5.3.3 Comparação da Sacarificação do Bagaço de Cana e da Casca de Arroz .....	74
5.4 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	76
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE A – Curva padrão de fenólicos totais medindo ácido gálico de 50 a 450 mg/L, através da metodologia por reagente de Folin.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE B – Primeira curva padrão de açúcares redutores medindo glicose de 0,15 a 0,90 mg/mL, através da metodologia por ácido 3,5 dinitrossalicílico</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE C – Segunda curva padrão de açúcares redutores medindo glicose de 1 a 7 mg/mL, através da metodologia por ácido 3,5 dinitrossalicílico .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO A – Curva padrão de etanol cedida pelo Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO B – Perfil cromatográfico para a amostra do período de 24 horas da fermentação pela levedura da Sigma-Aldrich.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO C – Perfil cromatográfico para a amostra do período de 24 horas da fermentação pela levedura da Fleischmann .....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Pelo menos três quartos do consumo de energia mundial nos últimos 15 anos originaram-se de combustíveis fósseis, sendo 33% do percentual global correspondente ao petróleo, 29% ao carvão e 24% ao gás natural (WORLD ENERGY COUNCIL, 2016). Eles são causadores de grande parte da poluição global e da maior parte das emissões de gases de efeito estufa da Terra (CORTEZ, 2010).

Segundo o *World Energy Council* (2016), a bioenergia (proveniente da transformação química da biomassa) é a maior fonte de energia renovável mundial, representando 10% do suprimento total global. Além disso, o uso de biomassas vem chamando atenção, pois são substratos com capacidade de substituir os produtos derivados de petróleo, gás natural e carvão, seja para a produção de energia, bioprodutos ou biocombustíveis (CUNHA, 2013).

O Brasil se destaca pelo pioneirismo no uso da cana-de-açúcar para produção de bioetanol, desde o surgimento do PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool), depois da primeira crise do petróleo em 1973. De acordo com a *Renewable Fuels Association* (2016), o país é o segundo maior produtor mundial deste combustível, com uma produção de 27,6 bilhões de litros de bioetanol. A projeção para 2025, segundo a OECD/FAO (2016), é de aproximadamente 35,5 bilhões de litros; um aumento de 28,6 % em relação a 2016.

Contudo, o uso de culturas alimentares (como a cana) para produção de bioetanol pode causar conflito com a produção de alimentos. Nesse caso, se todo o resíduo da cana-de-açúcar, por exemplo, fosse usado para geração de energia, e 50% do bagaço fosse utilizado para produção de bioetanol, isso adicionaria de 3700 a 4000 L/ha de combustível. Desse modo, isso poderia reduzir o uso da terra de plantio em 33 - 38% (SOCCOL et al., 2010).

No Brasil há duas das maiores empresas de biocombustíveis, produzindo etanol de segunda geração – no qual se emprega resíduos lignocelulósicos agroindustriais – desde 2014, são elas: Granbio (São Miguel dos Campos – AL) e Raízen (Piracicaba – SP). Ambas unidades têm capacidade de produzir, juntas, até 182 milhões de litros desse combustível por ano (UNICA, 2016).

O desenvolvimento da 2ªG de etanol contribui com a quantidade de matérias primas que podem ser usadas, incluso fontes mais econômicas e variáveis

do que as empregadas na primeira geração. Entre os resíduos lignocelulósicos que podem ser utilizados destacam-se o bagaço de cana-de-açúcar e a casca de arroz, ambos devido ao grande volume gerado nas agroindústrias.

Os engenhos de açúcar geram cerca de 275 kg de bagaço (com 50% de umidade) por tonelada métrica de cana-de-açúcar. A produção brasileira do resíduo é estimada em 186 milhões de toneladas por ano (SOCCOL et al., 2010). Para a casca de arroz, esses números são um pouco diferentes. Aproximadamente 600 milhões de toneladas de arroz são produzidos em todo o mundo a cada ano. Estima-se que a produção global de cascas dessa semente seja de 120 milhões de toneladas/ano, correspondendo a 20% do arroz moído (ABBAS; ANSUMALI, 2010).

Em comum nestes resíduos está a celulose, que pode ser convertida em açúcares e, posteriormente, em etanol. Todavia, é necessário que ela esteja acessível à hidrólise para que haja uma maior eficiência na sua sacarificação. Para expor a holocelulose à ação das enzimas, é necessário ter um estágio de pré-tratamento da biomassa para quebrar a barreira da lignina, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a área superficial do substrato (BINOD et al., 2010).

O pré-tratamento biológico de resíduos lignocelulósicos é visto de forma mais ecológica por não possuir altos gastos energéticos e por não utilizar tantos produtos químicos (MACHADO; FERRAZ, 2017). Assim se reduz a geração de compostos tóxicos que possam inibir o processo fermentativo, como o furfural, por exemplo. O tratamento pode ser realizado com a ajuda de microrganismos, sendo os fungos da podridão branca os mais efetivos (SARKAR et al., 2012). Além disso, este processo de forma biológica se faz favorável atuando em condições semelhantes às ambientais, especialmente em relação à temperatura e pressão.

Com base no apresentado, o objetivo deste trabalho foi avaliar o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz, com enzimas ligninolíticas produzidas por fungos da podridão branca. Na sequência, analisar o efeito da otimização desta etapa na sacarificação com celulases comerciais, para posterior produção de bioetanol. A contribuição desta pesquisa é para o desenvolvimento de uma metodologia mais sustentável que as utilizadas no pré-tratamento convencional (explosão a vapor com ácido diluído), agregando valores aos resíduos agroindustriais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de um pré-tratamento biológico, com extrato enzimático produzido por fungos da podridão branca, em bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz, com posterior sacarificação, para produção de etanol celulósico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de enzimas ligninolíticas por fungos da podridão branca em cultivo líquido estático;
- Avaliar o efeito da adição de bagaço de cana e casca de arroz como indutores da atividade enzimática ligninolítica;
- Avaliar a deslignificação dos resíduos agroindustriais de cana e arroz submetidos à ação dos extratos enzimáticos produzidos;
- Avaliar a influência de mediadores químicos aplicados no pré-tratamento das biomassas;
- Avaliar a hidrólise enzimática/sacarificação da celulose e da hemicelulose, aplicando o coquetel enzimático Cellic® Ctec2 (Novozymes), nos resíduos com e sem pré-tratamento ligninolítico;
- Avaliar a fermentação dos açúcares provenientes da etapa de sacarificação com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

O esgotamento das reservas de petróleo nos próximos anos faz com que haja uma atenção especial no que diz respeito à busca por novas alternativas energéticas, visto que o petróleo é a fonte principal de energia usada no mundo e não é renovável. Segundo a *International Energy Agency* (2017), o suprimento total de energia primária mundial por combustível em 2015 foi de 13.647 Mtoe (megatonelada equivalente de petróleo), deste número 31,7 % era correspondente ao óleo e apenas 9,7% era referente à biomassa (biocombustíveis e resíduos).

A matéria orgânica renovável acumula energia química advinda da conversão de energia luminosa em razão da fotossíntese. Sendo assim, biomassa é todo material de origem vegetal ou animal, que pode ser utilizada para produção de energia (ANEEL, 2002). Exemplos de biomassas são resíduos agrícolas e florestais, restos de alimentos, casca de frutas, esterco, madeira, entre outros materiais orgânicos.

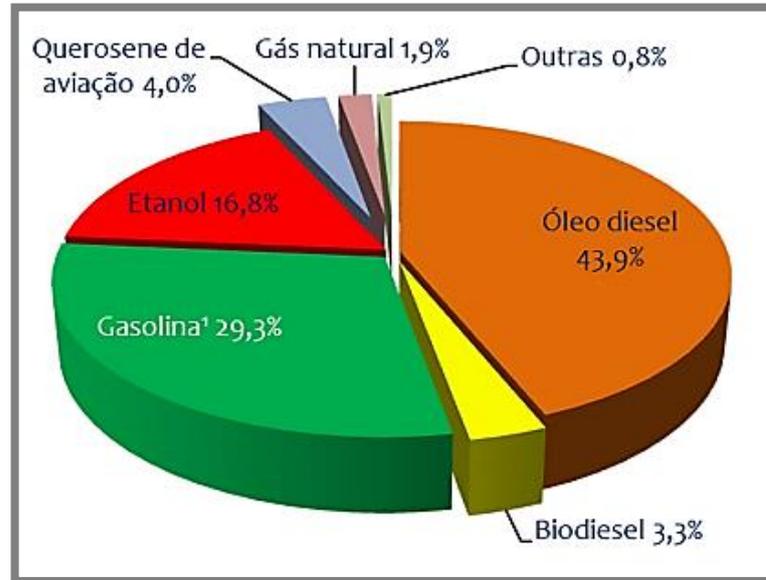
A produção de biocombustíveis – biogás, bioetanol e biodiesel – a partir de energia biológica tem sido considerada para atender, particularmente, as necessidades de transporte veicular, sendo uma possibilidade com potencial para competir no comércio com os derivados do petróleo (SILVA, 2010; SOUZA, 2011). A Figura 01 mostra o consumo brasileiro de energia nos transportes, no ano de 2016, no qual se observa que apenas 20% do uso dos combustíveis é de fonte renovável.

Por causa do esgotamento progressivo do petróleo e devido aos graves problemas ambientais que a exploração de fontes não renováveis acarreta, principalmente no que diz respeito às emissões de CO<sub>2</sub>, a busca por outras fontes de energia torna-se cada vez mais necessária (SANTOS, 2012). Deste modo, os biocombustíveis aparecem como uma opção alternativa.

Biocombustível nada mais é do que um combustível produzido por microrganismos por meio da fermentação de matérias-primas ricas em carbono. O gás natural (metano, CH<sub>4</sub>), por exemplo, é produzido pelo metabolismo anaeróbio de arqueas metanogênicas, enquanto o álcool etílico (etanol) é gerado através da

fermentação microbiana da glicose oriunda de substratos, como cana-de-açúcar e milho (MADIGAN, 2016).

**Figura 01 – Consumo de energia nos transportes em 2016 no Brasil.**



Fonte: BRASIL– EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (2017).

Segundo Nunes et al. (2013), os biocombustíveis apresentam algumas vantagens. Primeira, sua utilização possibilita diminuir a emissão de carbono para a atmosfera, o que minimiza a difusão de gases do efeito estufa. Ademais são favoráveis do ponto de vista ecológico, já que liberam 50% menos material particulado e 98% menos enxofre, além de serem biodegradáveis e não tóxicos. Possibilitam o acréscimo de emprego na zona rural, diminuição da dependência de recursos fósseis, além de investimentos financeiros menores em pesquisas, pois os estudos de investigação de petróleo são muito custosos.

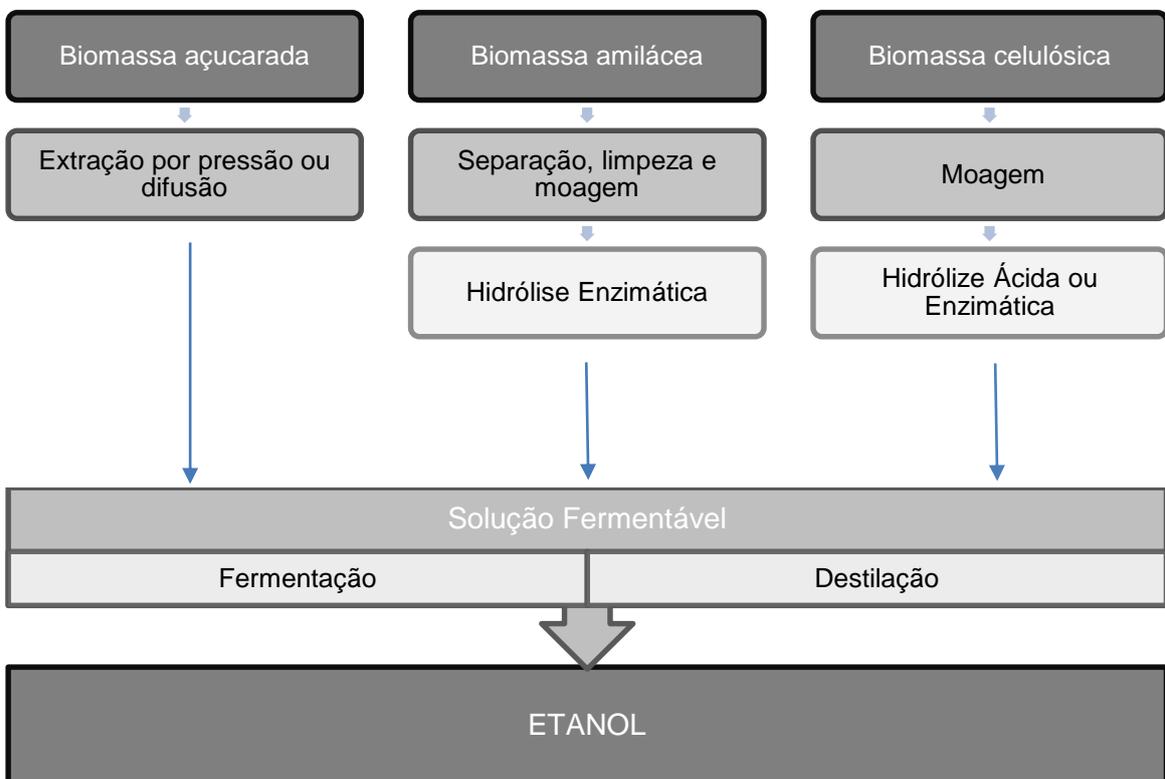
### 3.1.1 Etanol

O álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) é produzido desde antigamente pela fermentação dos açúcares oriundos de produtos vegetais. Atualmente, boa parte do

etanol industrial ainda é obtido pelo mesmo sistema, embora também possa ser fabricado a partir do eteno, que é um derivado do petróleo (SANTOS, 2012).

O bioetanol pode ser produzido por qualquer biomassa que seja sacarificada, como o caldo da cana-de-açúcar e a beterraba açucareira, amilácea, como o milho e o trigo, ou ainda celulósica, como bagaço de cana e casca de arroz (NUNES et al., 2013; MARABEZI, 2009). A Figura 02 mostra as diferentes rotas tecnológicas que podem ser aplicadas para obtenção do biocombustível em questão, considerando os três grupos de matéria-prima.

**Figura 02 – Rotas para a produção de bioetanol.**



Fonte: Adaptado de MARABEZI (2009).

Segundo a *Renewable Fuels Association*, o Brasil e os Estados Unidos foram os dois maiores produtores mundiais de etanol em 2016, produzindo 27 e 58 bilhões de litros, respectivamente. Estes países fazem o biocombustível a partir do caldo de cana (BR) e do amido de milho (EUA) e juntos correspondem a 85% da produção global.

O Brasil é destacado como o país que possui mais vantagens competitivas para nortear a agricultura de energia; por causa da posição geográfica favorecida (com clima mais apropriado), disponibilidade de terras agriculturáveis e imensa competitividade internacional que o setor sucroalcooleiro brasileiro demonstra, tanto na produção de açúcar quanto na de álcool (CINELLI, 2012).

Mesmo que o uso do álcool combustível, elaborado e empregado há mais de trinta anos no Brasil, tenha passado por uma crise de não abastecimento na década de 80 e 90, estudos voltados à área estão em constante avanço no país. E com a presença dos carros bicombustíveis no mercado, as pesquisas ganharam um maior estímulo (SOCCOL et al., 2010).

Gradativamente, aparecem novas espécies de canas mais resistentes à secas ou pragas, e com produtividade de açúcar e álcool mais elevada. Para o futuro, então, a maior e melhor tecnologia será aproveitar também a palha, e o bagaço proveniente da moagem da cana – que atualmente é empregado na geração de energia térmica ou alimentação animal – para produzir o bioetanol, neste caso, de segunda geração (MARABEZI, 2009).

### 3.1.2 Etanol de Segunda Geração

A produção de bioetanol a partir de cultivos alimentares, como cereais, resultou em uma concorrência direta indesejável com oferta de alimentos. Uma modificação de matéria-prima para um material vegetal não comestível mais abundante colabora na diminuição da pressão sobre as culturas alimentares (BINOD et al., 2010).

Para a produção de etanol 2<sup>a</sup>G, 83,3 litros podem ser produzidos a partir de uma tonelada de bagaço de cana, o que propicia um incremento da produção de etanol sem a necessidade de expandir a área plantada de cana-de-açúcar. Com a evolução da agroindústria canavieira, a manufatura do bioetanol poderia diminuir em 33% a área de plantio da cana por unidade de etanol 2<sup>a</sup>G (ARAÚJO et al., 2013).

Com o intuito de aumentar a produção sem prejudicar a segurança alimentar e assegurando o fornecimento de combustível, aparecem então pesquisas

para obtenção do etanol 2<sup>a</sup>G. Nestas, se utilizam materiais lignocelulósicos que podem, por meio de tratamentos, ser utilizados aperfeiçoando a eficiência e, da mesma maneira, minimizando impactos ambientais (NUNES et al., 2013).

Materiais lignocelulósicos são considerados matéria-prima interessante para a produção de álcool combustível, por causa da sua disponibilidade em grandes quantidades e menor valor. Quando se produz etanol a partir do amido de milho ou caldo de cana, a matéria-prima representa cerca de 40-70% do custo de produção. Ao empregar os resíduos da silvicultura, agricultura e indústria, os investimentos são reduzidos (CARDONA et al., 2010).

Existem várias tecnologias disponíveis para a produção de bioetanol a partir de matéria-prima lignocelulósica, algumas delas são atualmente usadas por diversas indústrias (Quadro 01). A hidrólise enzimática pode ser aplicada a várias matérias-primas (substrato), sendo necessária para atingir uma produção em grande escala (ANTIZAR-LADISLAO; TURRION-GOMEZ, 2008).

**Quadro 01 – Características das usinas de etanol 2G com produção em escala comercial mundial em 2016.**

	<b>Raízen</b>	<b>Granbio</b>	<b>Beta-Renewables</b>	<b>Poet-DSM</b>	<b>Dupont</b>	<b>Abengoa</b>
<b>País</b>	Brasil	Brasil	Itália	EUA	EUA	EUA
<b>Capacidade (milhões L/ano)</b>	40,1	83,2	75,7	94,6	113,5	94,6
<b>Matéria-prima</b>	Bagaço de cana-de-açúcar	Palha de cana-de-açúcar	Palha de trigo	Palha de milho	Palha de milho	Palha de milho
<b>Preço (US\$ /t)</b>	38	40	75	90	52	90
<b>Tipo de pré-tratamento</b>	Ácido diluído	Explosão a vapor	Explosão a vapor	Ácido diluído	Alcalino	Ácido diluído
<b>Rendimento do pré-tratamento (%)</b>	90	90	90	80	80	80
<b>Hidrólise enzimática (Fornecedor)</b>	Novozymes	Novozymes	Novozymes	DSM	Dupont-Danisco	Dyadic
<b>Fermentação (eficiência C6) (%)</b>	95	90	95	90	95	85
<b>Fermentação (eficiência C5) (%)</b>	85	80	85	80	85	75

Fonte: Adaptado de BOSSLE (2016).

A produção de bioetanol (2ª geração) compreende as seguintes etapas: quebra do resíduo de lignina (pré-tratamento), hidrólise de celulose e hemicelulose, fermentação do açúcar e, por último, recuperação e purificação do etanol para seguir aos critérios dos combustíveis (ALVIRA et al., 2010).

O desafio das usinas, na sua grande maioria, é em relação a fase de tratamento dos substratos, pois é este processo que determina como será realizada a hidrólise do material, assim como a eficiência da etapa subsequente. Conforme visto no Quadro 01, o rendimento dos pré-tratamentos aplicados pelas empresas é alto, contudo as metodologias físicas ou químicas empregadas podem gerar complicações diversas ao sistema.

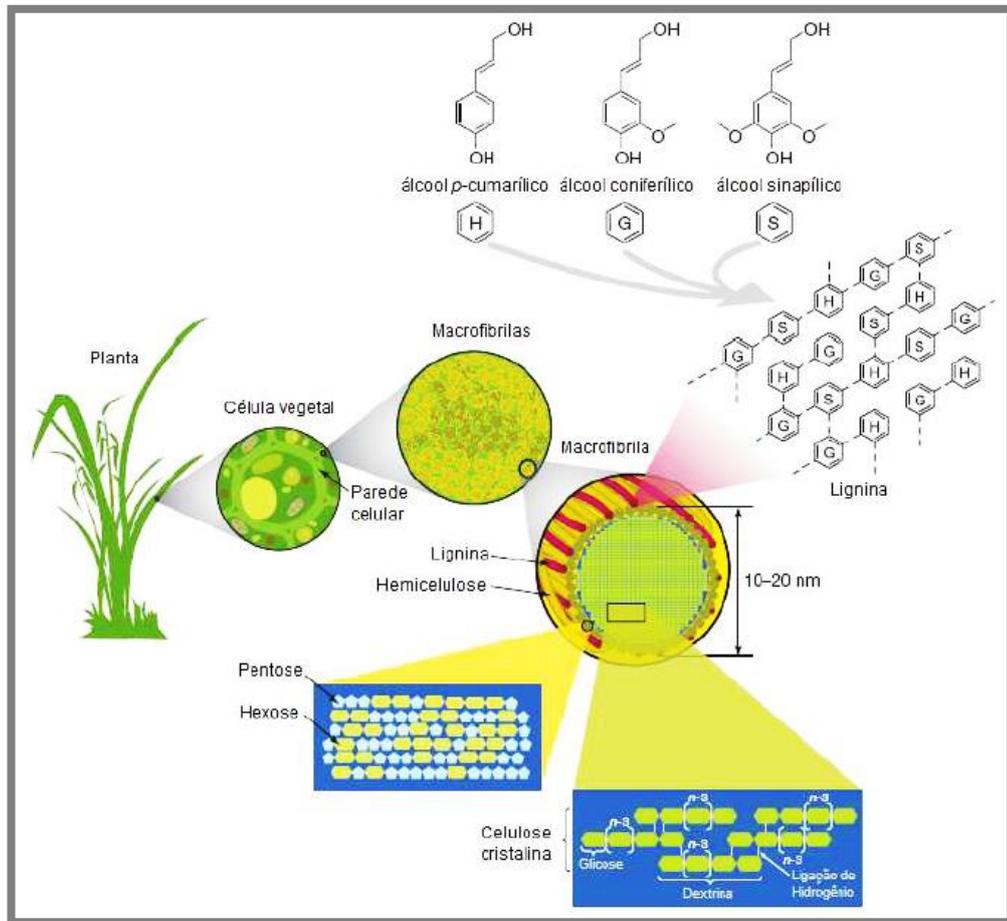
Em 2015, por exemplo, a unidade da Granbio localizada em São Miguel dos Campos (AL) passou por alguns períodos de inatividade, devido à dificuldades encontradas no pré-tratamento. O processo utilizado pela usina, através de explosão à vapor, estava sofrendo com casos de abrasão, por causa das partículas de biomassa que são transportadas em estados de alta pressão, temperatura e velocidade, causando erosão nos equipamentos (NOVACANA, 2015).

A conversão biológica de biomassa lignocelulósica em etanol não proporciona uma taxa de hidrólise tão elevada em relação a outras metodologias, por outro lado, apresenta benefícios como baixo custo, ausência de reagentes químicos e condições ambientais mais brandas (SUN; CHENG, 2002).

### 3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A biomassa lignocelulósica é apontada como a fonte de matéria orgânica mais farta na biosfera, pois é acumulada em grande quantia na forma de resíduos agroindustriais e florestais. Sua utilização como matéria-prima é bastante influenciada por sua composição química (Figura 03). As principais frações presentes nestes substratos são celulose, hemicelulose e lignina; sendo que os dois primeiros são compostos por polissacarídeos e o último por um material polifenólico (FERRAZ, 2010). Estes carboidratos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis com o intermédio de microrganismos, por exemplo as leveduras alcoolgênicas, que os transformam em etanol (BINOD et al., 2010).

Figura 03 – Composição de materiais lignocelulósicos.



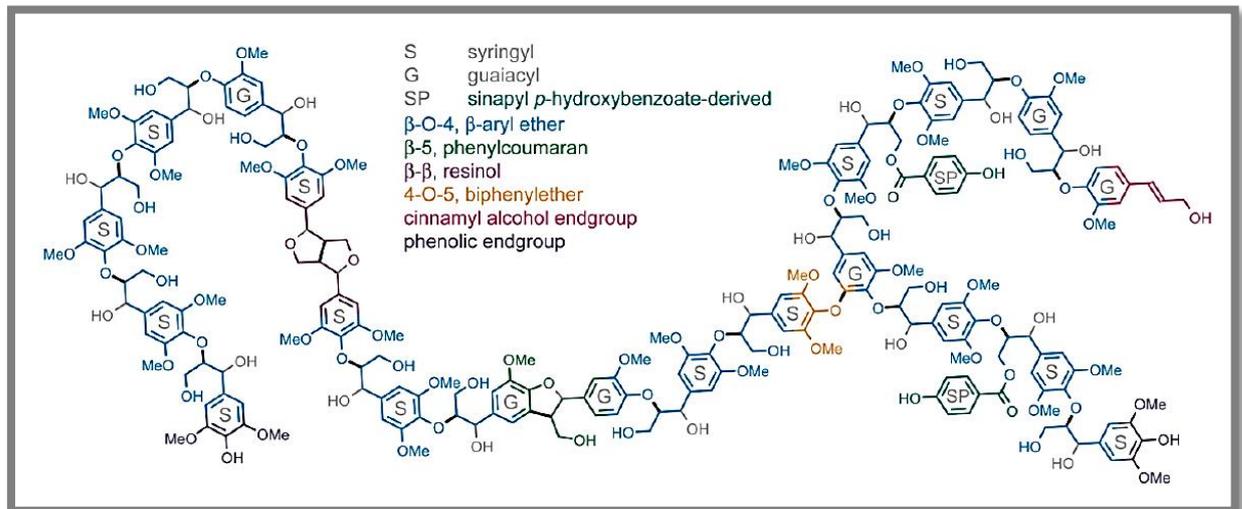
Fonte: CASTRO (2011).

A celulose é um homopolissacarídeo linear e não ramificado, composto por 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) (NELSON; COX, 2011). Sua forma permite o arranjo de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, que agrupam as cadeias celulósicas em fibrilas elementares com grau de cristalinidade elevado. Assim, a celulose possui muita resistência à tensão e insolubilidade a uma ampla variedade de solventes (FERRAZ, 2010).

A hemicelulose, por outro lado, é composta por mais de um açúcar, incluindo hexoses (glicose, galactose, manose) e pentoses (xilose, arabinose) em ligações lineares e ramificadas (na ordem de 100 a 200 monômeros). É o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose, e difere desta porque não é quimicamente homogênea, tem peso molecular inferior e ramificações com cadeias laterais curtas, que são facilmente hidrolisadas (AGBOR et al., 2011).

A lignina é uma macromolécula aromática, que se constitui de uma complexa estrutura polifenólica (Figura 04), composta principalmente de unidades de fenilpropano. Apresenta uma conformação tridimensional e amorfa, que se deposita junto aos carboidratos, gerando ligações covalentes com unidades monossacarídicas da hemicelulose (ARAÚJO et al., 2013).

**Figura 04 – Estrutura química da lignina.**



Fonte: VANHOLME et al. (2010).

A lignina está presente na parede celular e sua principal função é proporcionar à planta apoio estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Não é solúvel em água e é inativa opticamente em razão da sua estrutura multiforme, que faz com que sua degradação seja extremamente difícil.

Neste contexto, devido à composição química dos materiais lignocelulósicos, muitos podem ser testados para produção de bioetanol. Dentre eles estão: resíduos de culturas (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, bagaço de sorgo doce), resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório, resíduos e lamas de papel reciclado), biomassa herbácea (feno de alfafa, capim-amarelo) e resíduos sólidos urbanos (RSU) (CARDONA et al., 2010).

Cada resíduo possui uma constituição própria, pois existem diferenças na composição química da espécie vegetal, variações genéticas e diversas

condições de cultivo (FERRAZ, 2010). As diferentes composições de resíduos lignocelulósicos agroindustriais podem ser vistas na Tabela 01.

**Tabela 01 – Composição química percentual de diferentes resíduos agrícolas e florestais.**

<b>Resíduo Lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
<b>Bagaço de Cana de Açúcar</b>	33	30	29	4
<b>Sabugo de Milho</b>	42	39	14	2
<b>Talo de Milho</b>	35	15	19	5
<b>Casca de Arroz</b>	36	15	19	20
<b>Palha de Arroz</b>	32	24	13	12
<b>Serragem</b>	55	14	21	5
<b>Palha de Sorgo</b>	33	18	15	10
<b>Palha de Trigo</b>	30	24	18	1
<b>Palha de Cevada</b>	40	20	15	11

Fonte: Adaptado de FERRAZ (2010).

Quando as frações de lignina são maiores, o material tende a ser mais recalcitrante à hidrólise da celulose. Assim sendo, quanto menor a quantidade existente, mais fácil deve ser o pré-tratamento do resíduo (ZENG et al., 2014). Quanto à hemicelulose, ela é inconveniente ao tornar difícil o acesso à celulose, mas é conveniente por ser outra fonte de açúcares fermentescíveis. Isto quando o microrganismo fermentador tem capacidade de metabolizar seus constituintes (PIRES, 2015).

### 3.2.1 Bagaço de Cana

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea proveniente da Índia, que foi trazida para o Brasil na época colonial, sendo que atualmente é muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Da natureza, é uma das maiores fontes de carboidrato. Bem como demais vegetais lignocelulósicos, o

bagaço da cana é composto principalmente por lignina, hemicelulose e celulose, podendo ser usado como fonte para produção de bioetanol (CARVALHO, 2011).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo a região centro-sul responsável por mais de 90% dessa produção nacional, que é estimada em 647,6 milhões de toneladas para a safra 2017/18 (área a ser colhida de 8,84 milhões de hectares). A produção de açúcar deverá alcançar 38,70 milhões de toneladas, semelhante ao produzido na safra 2016/17 e a produção de etanol poderá atingir 26,45 bilhões de litros, um decréscimo de 4,9%, devido a predileção pela produção de açúcar (CONAB, 2017a).

O aporte da cana considera não somente o açúcar, no qual o Brasil é o maior produtor e exportador mundial, e o álcool consumido pelos veículos automotores, mas idem ao seu uso sob forma de forragem, para alimentação de animais, ou como matéria-prima para a produção de rapaduras, melado e aguardente. Além do mais, aproveita-se o bagaço (resíduo da fabricação de açúcar e álcool) empregado nas usinas para a geração de energia térmica, elétrica e mecânica (WOLF, 2011).

O bagaço da cana-de-açúcar é um material ligninocelulósico não homogêneo, composto, em sua grande maioria, por células parenquimáticas (medula), células esclerenquimáticas (fibras), e células epidérmicas. No subproduto descrito é encontrado 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina e 1,5-5% de cinzas (WOLF, 2011).

### 3.2.2 Casca de Arroz

O arroz está entre os cereais mais consumidos do mundo. Seu cultivo ocupa o segundo lugar em área plantada, perdendo apenas para o trigo (SOUZA, 2012). Especifica-se como o alimento principal da maioria da população do mundo. Apenas na Ásia, de 60 a 70% do consumo calórico de mais de 2 bilhões de pessoas é resultante do arroz e seus subprodutos. A estimativa de produção mundial anual do grão é mais de 475 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

No Brasil, a produção de arroz na safra 2017/18 poderá alcançar 11,64 milhões de toneladas, tendo uma área plantada estimada de 1,94 milhões de

hectares, com produtividade de 5.98 kg/ha. O Rio Grande do Sul, maior estado produtor do cereal, deverá representar 70% desta produção brasileira (CONAB, 2017b).

O arroz é consumido principalmente na forma de grãos inteiros. No seu processamento e beneficiamento é gerado arroz quebrado, casca e farelo, que são subprodutos pouco utilizados (SILVA, 2009a). A casca é uma substância fibrosa, cuja maior composição é formada por celulose (32-47%), hemicelulose (19-27%) e lignina (5-24%) (KARIMI et al., 2006).

Sem muito valor comercial, a casca de arroz, por causa da sua fibrosidade, dureza e abrasividade, acaba sendo jogada em grandes áreas rurais. A sua demorada biodegradação, além da composição bastante fenólica, resulta em sua inalteração por longos períodos de tempo, provocando, deste modo, danos ao meio ambiente. Contudo, a casca em questão, possui alto poder calorífico, todavia variável devido à umidade e condições de plantio (ALMEIDA, 2010). Apresenta um teor energético elevado e pode ser empregada como combustível, em razão de algumas características, como o grande poder calorífico (12-18 MJ/kg).

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Do ponto de vista econômico, o pré-tratamento é um passo fundamental para o processo de bioconversão da holocelulose de um substrato, pois deve melhorar a separação entre os componentes da parede celular, evitando a formação de compostos que possam ser inibitórios para a hidrólise e fermentação (SOCCOL et al., 2010).

Materiais lignocelulósicos diferentes dispõem de propriedades físico-químicas distintas, deste modo, é preciso a adoção de procedimentos de acordo com cada particularidade da matéria-prima. Isso se torna muito importante, visto que a escolha de um pré-tratamento específico tem um alto impacto nas etapas posteriores (SOUZA, 2011).

De um modo geral, os principais objetivos de um pré-tratamento são: aumentar a área superficial da biomassa, reduzir o grau de cristalinidade da celulose, desintegrar a hemicelulose e degradar ou alterar a estrutura da lignina

(RABELO, 2010). O Quadro 02 apresenta os efeitos causados por diferentes pré-tratamentos de substratos, com vantagens e desvantagens de cada metodologia.

**Quadro 02 – Efeitos de diferentes pré-tratamentos, com suas vantagens e desvantagens, em materiais lignocelulósicos.**

Pré-tratamentos	A	B	C	D	E	Vantagem	Desvantagem
<b>Explosão à vapor</b>	+	Nd	+	-	+	Alto rendimento de glicose	Geração de compostos tóxicos e alto custo de energia
<b>Hidrotérmico</b>	+	Nd	+	-	+/-	Baixo custo na construção e manutenção de reatores	Alta demanda de água e energia
<b>Ácido</b>	+	Nd	+	-	+	Altos rendimentos na hidrólise enzimática	Problemas de corrosão no reator e formação de inibidores
<b>Alcalino</b>	+	Nd	-	+/-	+	Condições ambientais de temperatura e pressão	Custo elevado com reagentes e recuperação de solventes
<b>Explosão com amônia</b>	+	+	-	+	+	Baixa formação de inibidores	Não é eficiente em substratos com alto teor de lignina
<b>Biológico</b>	+	Nd	-	+	+	Baixo custo operacional e baixo consumo de reagentes	Baixa taxa de hidrólise

**A = Aumento da área superficial do substrato; B = Redução de cristalinidade da celulose; C = Solubilização da hemicelulose; D = Remoção de lignina; E = Alteração da estrutura de lignina. Onde: (+) = maior efeito e (-) = menor efeito. ND = não determinado. Fonte: Adaptado de ALVIRA et al. (2010).**

### 3.3.1 Pré-Tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico consiste na utilização de microrganismos, como fungos da podridão branca, branca ou parda, para a degradação seletiva de lignina e hemicelulose. Destes, os fungos da podridão branca, pertencentes ao filo Basidiomycota, são os mais eficazes na degradação da lignina, que acontece por meio da ação de enzimas, como as lacases e as peroxidases (TALEBNIA et al., 2010).

Bioprocessos que envolvem microrganismos ou enzimas como biocatalisadores são alternativas tecnológicas competitivas aos processos convencionais, com particularidades vantajosas como baixo consumo energético e eficiência em circunstâncias moderadas de pH, temperatura e força iônica (TAVARES, 2006).

Vários fungos da podridão branca como *Ceriporia lacerata*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyathus stercolerus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* já foram investigados em diferentes biomassas lignocelulósicas (ALVIRA et al., 2010). Alguns estudos podem ser visualizados no Quadro 03, no qual são mostrados os efeitos do pré-tratamento fúngico para as etapas de sacarificação e fermentação. Os fungos deslignificadores seletivos devem possuir muita afinidade para lignina e degradá-la de forma mais rápida do que os hidratos de carbono (TALEBNIA et al., 2010).

**Quadro 03 – Efeito do pré-tratamento fúngico na hidrólise enzimática e produção de bioetanol.**

Fungo	Substrato	Rendimento (%) de açúcar / etanol*	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Palha de arroz	50% de glicose 50% de etanol	Bak et al. (2009)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palha de arroz	33% de glicose	Taniguchi et al. (2005)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Casca de arroz	38,9% de glicose	Yu et al. (2009)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Palha de milho	56-66% de glicose 57,8% de etanol	Wan e Li (2010)

\*com base em % do rendimento teórico de glucano no material original.

Fonte: Adaptado de WAN; LI (2012).

Pré-tratamentos químicos têm muitas desvantagens no que diz respeito à exigência de equipamento especializado resistente à corrosão, extensa lavagem e eliminação satisfatória dos resíduos químicos. Sem contar a geração de outros produtos tóxicos no decorrer do processo (BINOD et al., 2010). Já os pré-tratamentos biológicos são seguros, ambientalmente corretos e utilizam menos energia em comparação com outros métodos. Entretanto, a velocidade da reação de

hidrólise é menor e precisa ser otimizada para que a aplicação comercial seja viável (TALEBNIA et al., 2010).

### 3.3.2 Fungos da Podridão Branca

A madeira é um material orgânico, complexo e heterogêneo, vulnerável à degradação biológica, física e química. Os fungos são uma das causas mais frequentes de deterioração. Estes são classificados seguindo a decomposição que provocam: podridão branca e parda (resultantes principalmente da ação de basidiomicetos) e podridão mole (causada por ascomicetos) (SILVA, 2014).

A degradação da lignina por fungos da podridão branca é causada mais rapidamente quando comparada com outros microrganismos. Além disso, eles são os responsáveis pela maior parte da decomposição da lignina no meio ambiente. Para penetração nas plantas, os fungos, comumente, secretam enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases), proteolíticas e ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase), as quais podem exibir propriedades de grande potencial para aplicação biotecnológica (MACIEL, 2012).

O tratamento de materiais lignocelulósicos é uma das mais importantes aplicações, tanto na indústria papeleira como na agroindústria, e nos dois casos, a finalidade é a redução da quantidade de lignina nos materiais tratados. A escolha de um fungo deslignificante adequado, para a produção de etanol 2<sup>a</sup>G, deve observar a habilidade deste em romper a dura estrutura da lignina, a perda da conformação da hemicelulose, que também complica a hidrólise da celulose, e redução da cristalinidade desta, o que melhora a eficiência das enzimas celulolíticas. Para a produção de bioetanol, os fungos da podridão branca são os mais interessantes, por conservarem a celulose, que é a fonte dos açúcares desejados (PIRES, 2015).

Entre os fungos basidiomicetos estão: *Agaricus bisporus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *Lepista nuda*, *Panus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*. Alguns destes são empregados na produção de cogumelos para alimentação, e os mais conhecidos e explorados encontram-se agrupados nos gêneros *Pleurotus* e *Agaricus* (PINTO, 2010).

### 3.3.3 Enzimas Ligninolíticas

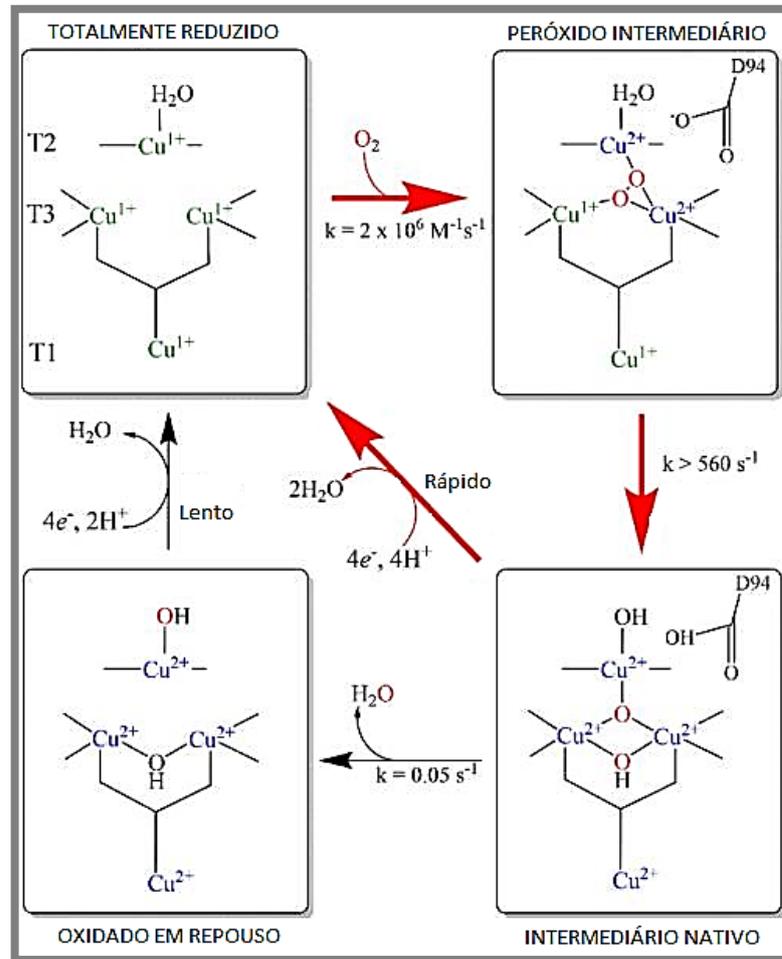
As enzimas são proteínas que funcionam como biocatalisadores, aumentando a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível e reduzindo a energia de ativação. São fundamentais no metabolismo, estando presentes em todos os organismos vivos, desde os mais simples aos mais desenvolvidos. As enzimas envolvidas na degradação dos materiais vegetais, responsáveis pela degradação da lignina, são chamadas de ligninolíticas e são amplamente estudadas (TAVARES, 2006).

Os fungos basidiomicetos, em especial os fungos da podridão branca (FPB) são considerados um grupo notável em razão de seu sistema enzimático ligninolítico extracelular inespecífico. Este engloba lacases (E.C. 1.10.3.2) e peroxidases, como a lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.13) e peroxidase versátil (E.C. 1.11.1.16) (MARTINEZ et al., 2005).

#### 3.3.3.1 Lacase

A lacase (EC 1.10.3.2) pertence à classe das polifenol oxidases, que contêm cobre em seu sítio ativo. Esta enzima catalisa a oxidação de muitas substâncias inorgânicas e aromáticas (sobretudo fenóis) pela retirada de um elétron incluso no substrato fenólico com a redução de  $\text{Cu}^{2+}$  em Cu. Então, a enzima volta à sua forma  $\text{Cu}^{+2}$  acarretando na redução de  $\text{O}_2$  em água (BREEN; SINGLETON, 1999). Na Figura 05 é representado o ciclo catalítico dessa enzima em função do seu centro ativo, composto de quatro átomos de cobre.

Figura 05 – Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: Adaptado de JONES; SOLOMON (2015).

A lacase existe em grande quantidade nos fungos basidiomicetos, que são hábeis na degradação ligninolítica (PINTO, 2010). A ação direta dessa enzima na lignina é, em princípio, restrita a unidades fenólicas que representam apenas um pequeno percentual do polímero total, fato que limita sua aplicação biotecnológica (GUTIÉRREZ et al., 2012).

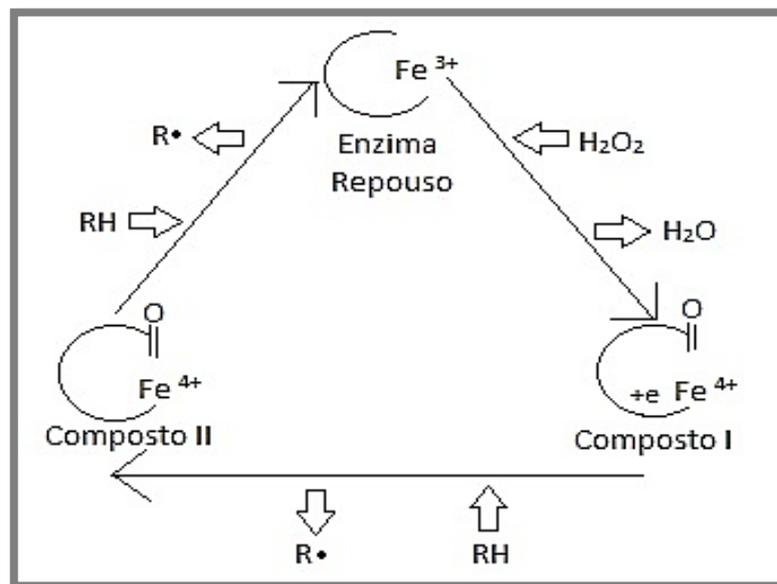
O potencial de ataque da lacase pode ser ampliado com o uso de compostos sintéticos, como o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), um dos mediadores mais utilizados e eficientes, que podem atuar como transportadores de elétrons entre a enzima e o substrato final (GUTIÉRREZ et al., 2012).

### 3.3.3.2 Lignina Peroxidase

Lignina peroxidase (LiP) (1.11.1.14) contém um grupo heme e suas isoenzimas são glicoproteínas. Esta enzima catalisa oxidações da lignina dependentes de peróxido de hidrogênio, interferindo numa sequência reacional. Possui potencial redox alto e caracteriza-se por uma baixa especificidade em relação aos substratos, oxidando, preferencialmente, anéis aromáticos metoxilados sem grupo fenólico livre (PINTO, 2010).

O mecanismo de ação da LiP envolve a oxidação dos substratos por meio da transferência de elétrons, gerando, assim, radicais intermediários. Estes são sujeitos às ações enzimáticas, como o acoplamento de radicais, polimerização, clivagem da cadeia lateral, desmetilação e adição intramolecular (WONG, 2009). O ciclo catalítico da lignina peroxidase pode ser visualizado na Figura 06.

Figura 06 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase.



Fonte: Autoria própria.

O processo começa pela oxidação do sítio ativo da LiP e do íon ferro contido nele de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{4+}$ , pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultando em água e num intermediário com dois elétrons oxidados, chamado de Composto I (que é a enzima na sua forma

oxidada). Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, formando um radical livre e o Composto II, cujo ferro ainda está presente como  $\text{Fe}^{4+}$ . O Composto II oxida um segundo substrato (que pode ser uma nova molécula de álcool veratrílico), gerando outro substrato-radical livre. Então, neste ponto, a enzima retorna à sua conformação primária. O excesso de peróxido de hidrogênio, coligado à falta de um substrato redutor, acarreta a oxidação do composto II a composto III, estado inativado da enzima (GONÇALVES, 2010).

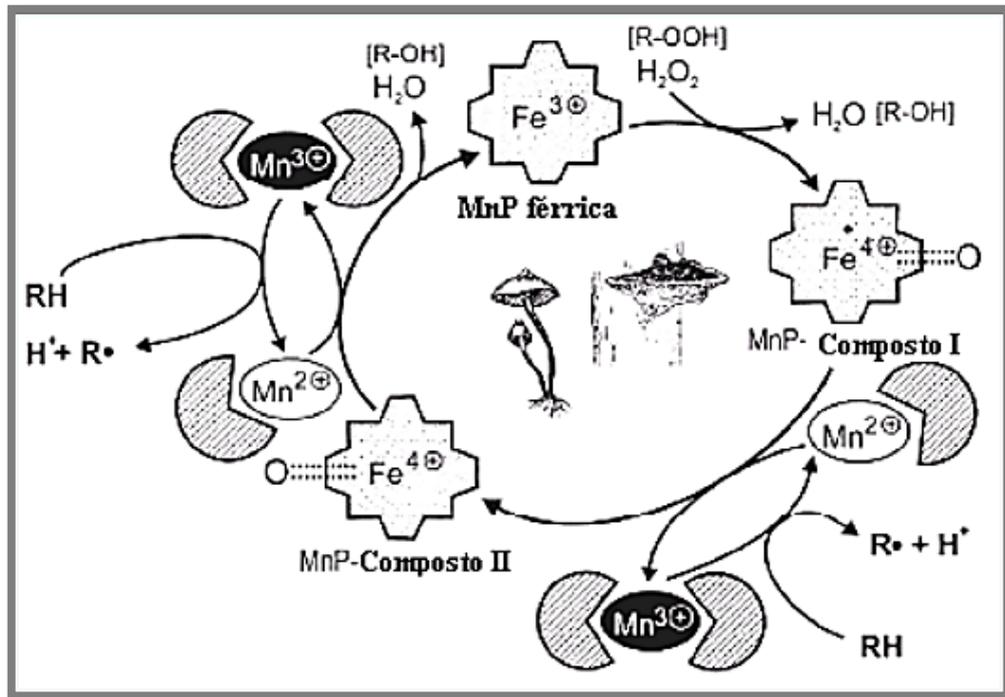
O álcool veratrílico é o redutor preferencial da lignina peroxidase, sendo produzido por fungos da podridão branca após lignólise, pois defende a enzima contra inativação por abundância de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Havendo peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, sendo normal esta reação em ensaios de atividade (GONÇALVES, 2010).

### 3.3.3.3 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) é uma peroxidase extracelular que contém um grupo heme e tem como substrato redutor o  $\text{Mn}^{2+}$ , que é oxidado a  $\text{Mn}^{3+}$ , o qual por sua vez oxida estruturas fenólicas a radicais fenoxi. O oxalato e outros compostos dicarboxílicos formam quelatos com o  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{3+}$  tendo papel importante na oxidação dos compostos aromáticos (PINTO, 2010).

O  $\text{Mn}^{3+}$  complexado com um ácido orgânico é um agente primário na quebra da lignina. Deste modo, a MnP é vista como uma enzima chave na ligninólise através de fungos da podridão branca. Seu ciclo catalítico é iniciado pela junção do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou de um peróxido orgânico à enzima férrica originária formando o composto I. Um íon  $\text{Mn}^{2+}$  age como doador de elétron para este composto, resultando na formação do composto II, o qual abstrai um elétron de outro íon  $\text{Mn}^{2+}$  e retorna à forma original (Figura 07). Os íons  $\text{Mn}^{3+}$  formados durante o processo são estabilizados por ácidos orgânicos como o lactato, malonato, oxalato ou tartarato e atuam como mediadores difusíveis de massa molecular baixa, atacando moléculas orgânicas inespecíficas pela abstração de elétrons (COELHO, 2007).

Figura 07 – Ciclo catalítico da manganês peroxidase.



Fonte: COELHO (2007).

### 3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA / SACARIFICAÇÃO

Posterior ao pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é factível hidrolisar a celulose por intermédio de concepções modernas. Estas englobam processos enzimáticos para a obtenção de glicose que poderá ser fermentada e, assim, convertida a etanol (SANTOS, 2012).

Com o passar dos anos, diversas técnicas foram propostas para hidrólise de material celulósico, sendo que duas delas são frequentemente utilizadas: hidrólise ácida e hidrólise enzimática do material pré-tratado. Em ambas, há várias maneiras de operação; a escolha deve ser feita de acordo com o produto bruto que será empregado, o microrganismo utilizado para a fermentação dos açúcares gerados, além da economia (OGEDA; PETRI, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar, assim como a casca de arroz, pode ser hidrolisado por vias biológicas com a aplicação de enzimas secretadas por microrganismos. O emprego destes biocatalisadores, que são muito específicos, minimiza a geração de subprodutos indesejáveis e elimina o uso de equipamentos

resistentes à corrosão. Estas vantagens trazem benefícios econômicos, tanto do ponto de vista energético quanto do metalúrgico, se comparado à hidrólise ácida. Além do mais, as condições de operação (pressão, temperatura, pH) da hidrólise enzimática são mais brandas do que os processos químicos. No entanto, as enzimas possuem um custo alto e são muito sensíveis, deste modo, é preciso controlar rigorosamente diversos parâmetros (ARAÚJO et al., 2013).

Vários estudos têm sido relatados na conversão da biomassa de material celulósico em açúcares por hidrólise enzimática. Borjesson et al. (2007) relataram que a adição de polietileno glicol (PEG) pode aumentar a conversão enzimática de lignocelulose macia de 42% a 78% em 16 horas, numa temperatura ótima de hidrólise de 50°C. Já Belkacemi e Hamoudi (2003) estudaram a hidrólise enzimática da hemicelulose do talo de milho a 30°C e pH 5, resultando numa sacarificação de 90%, sendo o açúcar liberado após 10 h.

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por celulases. Na verdade, é um complexo enzimático integrado por pelo menos três grupos: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (SILVA, 2010).

Segundo Souza (2011), as endoglucanases catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose de forma aleatória, formando oligossacarídeos de variados tamanhos e novas cadeias terminais. Agem apenas na parte amorfa da celulose, e sua atividade reduz de acordo com o encurtamento da cadeia.

As exoglucanases, também conhecidas como celobiohidrolases, trabalham de modo progressivo, em porções redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, formando principalmente moléculas de celobiose. São capazes de agir sobre a celulose microcristalina, diminuindo o tamanho das cadeias do polissacarídeo. Estas enzimas possuem em sua estrutura um domínio responsável pela ligação da molécula ao substrato – *cellulose binding domain* (CBD) – e sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (SOUZA, 2011).

Já as  $\beta$ -glicosidases são as enzimas que finalizam o processo, completando a degradação da celulose à glicose. São importantes também na hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobioses solúveis (SOUZA, 2011). A atuação de endoglucanases e exoglucanases é normalmente inibida por celobiose. As  $\beta$ -glicosidases, nesta perspectiva, não só produzem glicose degradando

celobiose, como também reduzem o efeito inibitório desta, possibilitando uma maior eficiência das outras duas enzimas (DAROIT, 2007).

Para realizar a hidrólise enzimática algumas usinas de etanol 2G, como a Raízen e a Granbio, utilizam um coquetel enzimático comercial da Novozymes, como a Cellic® CTec2. Este produto é um complexo de celulase para degradação da celulose em açúcares fermentescíveis, numa mistura de celulases com alto nível de  $\beta$ -glicosidases e hemicelulases. Tem como característica um bom rendimento de conversão, além de ser eficaz em altas concentrações de sólidos, sendo tolerante ao inibidor e compatível com múltiplos pré-tratamentos e matérias-primas, com alta concentração e estabilidade.

### 3.5 PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A biomassa sacarificada é utilizada para fermentação por diversos microrganismos, porém o uso de materiais lignocelulósicos para a geração de bioetanol é prejudicada pela falta de microrganismos ideais, que sejam eficientes na fermentação, tanto de pentoses quanto de hexoses. Para um processo de produção de etanol comercialmente viável, um organismo ideal deve ter ampla utilização do substrato, alto rendimento e produtividade elevada do biocombustível, deve ser capaz de resistir a altas concentrações de etanol e temperatura elevada, tolerar os inibidores presentes no hidrolisado e possuir atividade celulolítica (SARKAR et al., 2012).

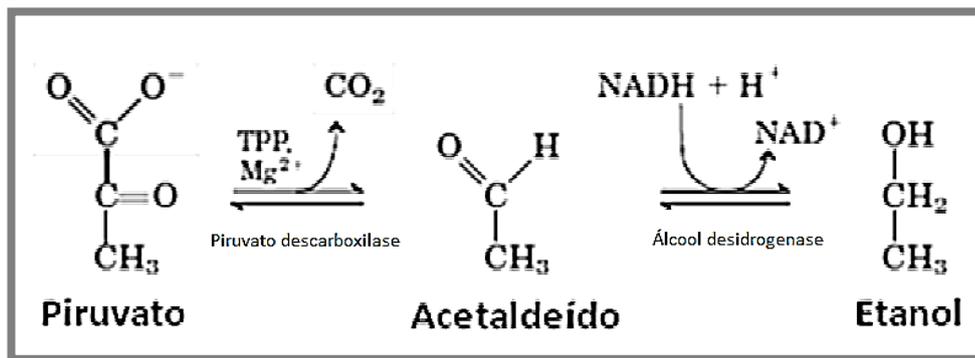
*Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada para esses processos. É tradicionalmente usada nas usinas, pois possui tolerância a teores de etanol elevados e boa velocidade de fermentação (WOLF, 2011).

A fermentação dos açúcares é um processo anaeróbio no qual estes são convertidos em álcool através de microrganismos (geralmente leveduras). O etanol é obtido pela conversão de glicose, de acordo com a equação 1, cujo rendimento estequiométrico é de 0,51 g etanol / g glicose (WOLF, 2011).



A fermentação alcoólica é, então, um processo biológico onde a energia produzida por reações de oxidação parcial pode ser usada para o desenvolvimento de leveduras. Posteriormente a conversão da glicose em piruvato, através da glicólise, esse é convertido em etanol e  $\text{CO}_2$  em um processo de duas etapas (Figura 08).

**Figura 08 – Processo da fermentação alcoólica.**



Fonte: Adaptado de WANDERLEY (2012).

Primeiramente, o piruvato passa por uma descarboxilação numa reação não reversível catalisada pela piruvato descarboxilase. Esta necessita de  $\text{Mg}^{2+}$  e possui uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato. Na segunda etapa, por meio da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o  $\text{NADH}$  proveniente da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase provendo o poder redutor (NELSON; COX, 2011).

Para se obter o álcool em questão, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ocorrer separadamente ou simultaneamente. O benefício do processo em separado é que as temperaturas, bem como outros parâmetros, da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas (SANTOS et al., 2010). As vantagens e as limitações de cada técnica podem ser visualizadas no Quadro 04.

**Quadro 04 – Comparação com as vantagens e as limitações entre as técnicas de sacarificação e fermentação (simultâneas ou separadas) em um processo fermentativo.**

<b>Processo Fermentativo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
<b>Sacarificação e Fermentação Simultâneas</b>	Baixo custo; Rendimentos de etanol mais elevados devido à remoção da inibição pelo produto final da etapa de sacarificação; Reduz o número de reatores necessários.	Diferença em condições ideais de temperatura para a hidrólise e a fermentação.
<b>Hidrólise e Fermentação em Separado</b>	Cada passo pode ser processado na sua ótima condição de funcionamento; Passos separados minimizam a interação entre as etapas.	Inibição pelo produto final; Minimiza o rendimento de etanol; Possibilidade de contaminação devido ao processo de período longo.

Fonte: Adaptado de SARKAR et al. (2012).

Alguns microrganismos nativos ou selvagens empregados na fermentação são *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomomas mobilis*, *Escherichia coli*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Candida brassicae*, *Mucor indicus*, etc. Entre todas as leveduras e as bactérias, as mais conhecidas e utilizadas na produção de etanol a partir de hexoses são *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, respectivamente (SARKAR et al., 2012).

Muitas fontes potenciais de celulose também contêm quantidades substanciais de arabinose e outros açúcares, que não são tão facilmente fermentados como as unidades de glicose. A *E. coli* tem capacidade para fermentar arabinose, mas este microrganismo não é naturalmente tolerante a altos níveis de etanol (NELSON; COX, 2011). Diferentemente de *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*, que toleram níveis mais altos, porém não são capazes de fermentar pentoses.

A *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se comercialmente entre as leveduras pois apresenta fácil isolamento e manutenção, não exigindo tantos nutrientes e possuindo um bom crescimento em meios constituídos por resíduos (agro)industriais. Alguns estudos de fermentação microbiana usando substratos lignocelulósicos estão mostrados no Quadro 05.

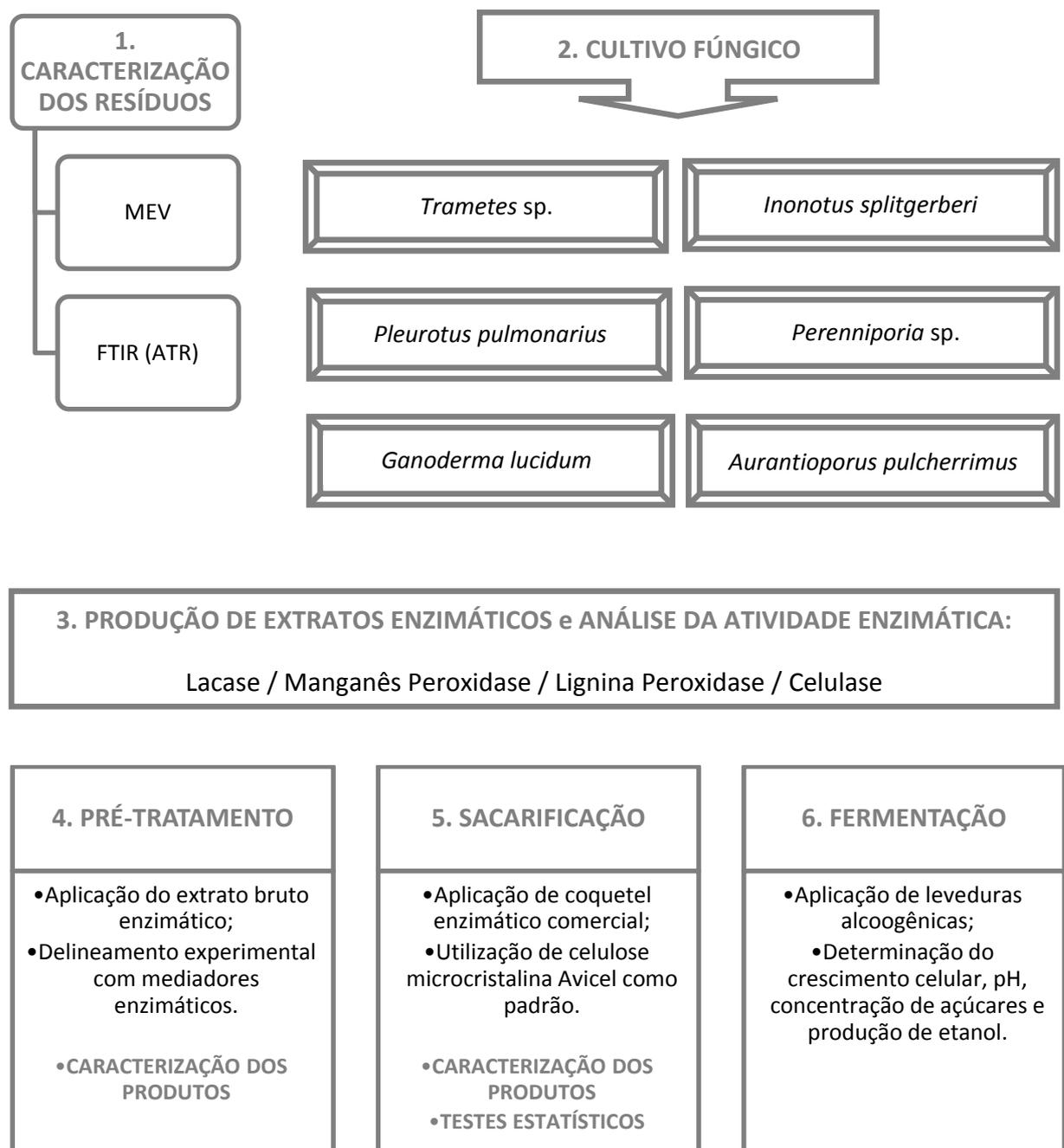
**Quadro 05 – Rendimento de etanol a partir de alguns substratos em um processo fermentativo com diferentes microrganismos.**

<b>Substrato</b>	<b>Fermentação Microbiana</b>	<b>Rendimento de Etanol</b>	<b>Referência</b>
<b>Bagaço de cana-de-açúcar</b>	<i>Pichia stipitis</i> BCC15191	0,29 g de etanol / g de açúcares fermentescíveis	Buaban et al. (2010)
<b>Palha de Trigo</b>	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	0,35 g de etanol / g de açúcares fermentescíveis	Nigam (2001)
<b>Palha de Arroz</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26603	0,40 g de etanol / g de açúcares fermentescíveis	Moniruzzaman (1995)
<b>Palha de Arroz</b>	<i>Candida shehatae</i> NCL-3501	0,45 g de etanol / g de açúcares fermentescíveis	Abbi et al. (1996)
<b>Palha de Arroz</b>	<i>Zimomomas mobilis</i> CP4 (pZB5)	0,46 g de etanol / g de açúcares fermentescíveis	Krishnan et al. (2000)

## 4 METODOLOGIA

As etapas pertinentes da pesquisa estão apresentadas na Figura 09 e descritas nos tópicos 4.1 a 4.9.

Figura 09 – Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.



#### 4.1 AMOSTRAS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As amostras de casca de arroz foram coletadas em uma fazenda experimental na cidade de Botucatu, interior do estado de São Paulo. As amostras de bagaço de cana foram cedidas pela empresa Costa Bioenergia, de Umuarama, Paraná. Ambas foram secas em estufas de esterilização e secagem a 60°C durante 24 h, com um diâmetro entre 1,0 e 2,5 centímetros (Figura 10), sendo armazenadas em pacotes plásticos fechados, ao abrigo da luz.

**Figura 10 – Fotografia das amostras de bagaço de cana-de-açúcar (A) e casca de arroz (B), *in natura* após secagem.**



A composição inicial dos resíduos foi determinada seguindo as normas brasileiras: ABNT NBR 14853 (extrativos), ABNT NBR 7989 (lignina) e ABNT NBR 13999 (cinzas). Além disso, os resíduos lignocelulósicos foram analisados, em duplicata, por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) – espectrômetro Varian 640-IR equipado com aparato de leitura por reflectância total atenuada (ATR) Pike Miracle com cristal de diamante – em uma faixa de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Mudanças na intensidade e/ou deslocamento das bandas correspondentes à lignina (1429 e 1515  $\text{cm}^{-1}$ ) e à celulose (898, 1098, 1338 e 1373  $\text{cm}^{-1}$ ) foram avaliadas (PANDEY et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss EVO MA 15) foi realizada para analisar a morfologia e as características estruturais do bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz, tanto das amostras iniciais quanto após o pré-tratamento enzimático. Para preparação dessas amostras foi utilizado o equipamento Quanta Quorum Q150R ES para recobrimento com ouro de ambos os substratos (materiais não condutores).

#### 4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS BASIDIOMICETOS

As enzimas ligninolíticas foram produzidas em cultivo líquido estacionário utilizando diferentes espécies de fungos da podridão branca (*Trametes* sp., *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus splitgerberi*, *Perenniporia* sp. e *Aurantioporus pulcherrimus*). Os dois primeiros mencionados foram obtidos do banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR, sendo que *Trametes* sp. foi isolado de um basidioma coletado num tronco de árvore em decomposição em Curitiba e o *P. pulmonarius* foi isolado a partir de um basidioma adquirido comercialmente no mercado municipal da cidade. Os demais fungos, *G. lucidum* EF32, *I. splitgerberi* EF46, *Perenniporia* sp. EF78 e *A. pulcherrimus* EF19, foram cedidos pelo banco de cepas do Centro Nacional de Pesquisas Florestais da EMBRAPA Florestas.

Na Figura 11 estão exemplificados alguns cultivos dos basidiomicetos utilizados neste trabalho. Eles foram repicados em placas e tubos com meio ágar batata dextrose (*Potato Dextrose Agar* - PDA), para crescimento em estufa a 28°C, por 7-10 dias. Posteriormente foram aplicados nos experimentos ou mantidos em geladeira em 4°C, por no máximo 3 semanas até serem repicados novamente.

Figura 11 – Fotografia de placas de Petri contendo o crescimento micelial de alguns fungos utilizados na pesquisa, após cultivo a 28°C com período entre 7 e 10 dias.



#### 4.3 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

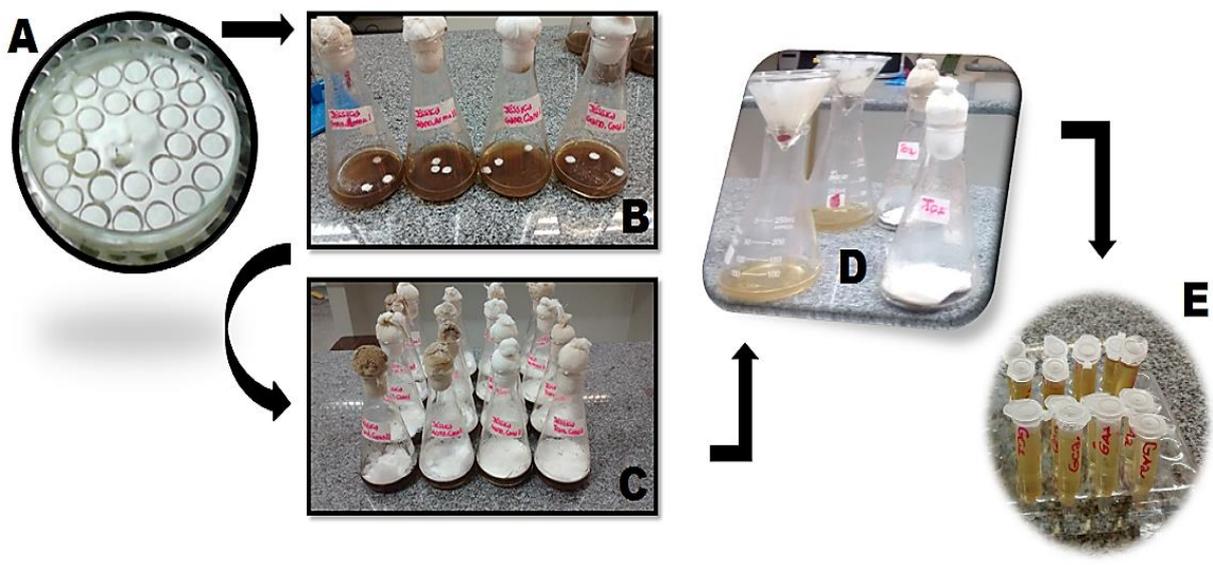
A produção dos extratos enzimáticos brutos foi realizada em um meio nutritivo com incorporação de indutores naturais de enzimas ligninolíticas (casca de arroz e bagaço de cana). A aplicação de resíduos lignocelulósicos em cultivos submersos de fungos da podridão branca pode contribuir com a produção de lacases (MOLDES et al., 2004) e outras enzimas degradadoras de lignina (NILADEVI, 2009).

O meio nutritivo (50 mL) foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL para produção das enzimas, e em sua composição estavam presentes: glicose (10 g/L), fosfato de potássio monobásico (3 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L), (GALHAUP et al., 2002; HOU et al., 2004), solução de sulfato de cobre (1 mM) e solução de sulfato de manganês (1 mM). Neste meio, ainda foi adicionado 0,5% (m/v) de bagaço de uva bordô seco e 1% (m/v) de material lignocelulósico seco (casca de arroz ou bagaço de cana) (LORENZO et al., 2002). O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

O procedimento para obtenção dos extratos enzimáticos está esquematizado na Figura 12 (A, B, C, D e E). O inóculo constituiu-se de três discos (plugs) de 11 mm de micélio fúngico, os quais foram recortados de placas de Petri contendo meio PDA com o auxílio de tubos de ensaio estéreis (A). O cultivo em placa foi realizado a 28°C por 7-10 dias (ou até o momento em que o micélio fúngico atingisse a borda da placa).

Os plugs foram transferidos para os meios de cultura líquidos (B) com palitos de madeira autoclavados. O crescimento foi realizado a 28°C em estufa, interrompido após 7 dias (C) (LORENZO et al., 2002). A biomassa foi separada por filtração com papel filtro (D), e o filtrado foi centrifugado a 5000 rpm (força gravitacional = 1680 g) por 15 minutos (E) (CABANA et al., 2007). O sobrenadante foi então aplicado como extrato enzimático bruto nos ensaios de degradação da lignina.

Figura 12 – Esquema de produção dos extratos enzimáticos.



## 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 4.4.1 Enzimas Ligninolíticas

Para analisar a presença e a atividade das enzimas dos extratos produzidos pelos seis fungos analisados, amostras foram testadas por meio dos seguintes procedimentos:

- Atividade da lacase: determinada em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51) em 420nm através do monitoramento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato)) (HOU et al., 2004).
- Atividade da manganês peroxidase (MnP): avaliada pela medição da absorbância (270 nm) em relação à oxidação do  $MnSO_4$  1mM em solução tamponada (pH 4,5) usando o tampão malonato de sódio 0,05 M, na presença de  $H_2O_2$  0,1 mM (WARIISHI et al., 1992).
- Atividade da lignina peroxidase (LiP): monitorada por absorbância em 310 nm, quanto a oxidação do álcool veratrílico em tampão tartarato 0,1 M, pH 3, na presença de  $H_2O_2$  0,2 mM (KIRK et al., 1984).

### 4.4.2 Celulases Totais

Para determinar a atividade enzimática de celulases dos extratos brutos e do coquetel Cellic CTec2 foram utilizadas tiras de papel filtro como substrato, conforme o método de Ghose (1987).

Em um tubo de ensaio foi pipetado 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), 0,5 mL da amostra centrifugada e uma tira de papel filtro Whatman Nº1 (50 mg) foi juntamente inserida. A reação foi realizada durante 60 minutos a 50°C. Após a incubação, 3 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foi adicionado às amostras e todos os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C num período de 5 minutos. Após a fervura, os tubos foram transferidos para um banho de água

fria e 20 mL de água destilada foi acrescentado nas amostras. Então, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51) a 540 nm. Para zerar o equipamento, a amostra foi substituída pelo tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Por outro lado, o branco de cada um dos experimentos se deu no mesmo processo descrito para a amostra, porém sem o substrato (papel).

Os valores obtidos no desconto do branco da amostra foram traduzidos em glicose através de uma curva padrão (em mg/0,5 mL). E então, para converter tais resultados em atividade enzimática, foi utilizada a equação 2.

$$\text{Concentração da enzima} = \frac{1}{\text{diluição}} = \frac{\text{volume da enzima em diluição}}{\text{volume total da diluição}} \quad (2)$$

Com este resultado, foi estimada a concentração que liberou 2 mg de glicose. Tendo-se este valor, calculou-se as unidades de papel filtro (FPU) conforme equação 3.

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima para liberar 2 mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (3)$$

#### 4.5 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Os testes de pré-tratamento enzimático foram realizados segundo metodologias já estabelecidas na literatura (CHEN et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012; MOILANEN et al., 2011), com o extrato fúngico que apresentou as maiores atividades de enzimas ligninolíticas (conforme item 5.4).

Para evitar contaminação das amostras testadas no pré-tratamento enzimático, realizou-se um teste com os resíduos de cana e arroz sendo tratados termicamente (fervidos durante 10 minutos com 50 mL de água destilada para 1,5 g de substrato) ou colocados frente à luz ultravioleta (15 minutos, distante 30 cm) antes de serem utilizados no ensaio. Com tal experimento, pode-se constatar que a opção da fervura foi a mais adequada.

Em cada ensaio foram utilizadas 96,9 U de lacase por grama de material lignocelulósico, na presença de mediadores químicos. Um delineamento experimental de Plackett-Burman (Tabela 02) foi realizado para avaliar alguns parâmetros que podem influenciar no processo. Os seguintes fatores foram estudados: hidroxibenzotriazol (1 mM), Tween 80 (0,1%), extrato enzimático, tampão acetato de sódio (pH 5,0), peróxido de hidrogênio (2 mM), 2,6-dimetoxifenol (1 mM) e ácido 4-hidroxibenzóico (1 mM).

**Tabela 02 – Matriz experimental do pré-tratamento enzimático (Plackett–Burman design) de bagaço de cana e casca de arroz (n=2).**

Amostra	A	B	C	D	E	F	G
01	0	0	0	1	1	1	0
02	1	0	0	0	0	1	1
03	0	1	0	0	1	0	1
04	1	1	0	1	0	0	0
05	0	0	1	1	0	0	1
06	1	0	1	0	1	0	0
07	0	1	1	0	0	1	0
08	1	1	1	1	1	1	1

A = Hidroxibenzotriazol; B = Tween 80; C = Extrato enzimático; D = Tampão acetato de sódio; E = Peróxido de hidrogênio; F = 2,6-Dimetoxifenol; G = Ácido 4-hidroxibenzóico.  
Onde: (0) = sem adição e (1) = com adição.

Um ajuste das condições experimentais de homogeneização resultou em 0,75 g de substrato para 25 mL de solução, ou seja, 30 g/L. Ensaio foram realizados em duplicata e um controle com a biomassa e apenas água de fervura foi efetuado simultaneamente, para efeito de comparação e avaliação deste “pré-tratamento físico”.

O processo de tratamento foi realizado em *shaker* (agitador orbital) a 130 rpm, 28°C durante 48 horas. Ao término, as amostras foram filtradas em membranas de fibra de vidro. Os filtrados foram congelados a -20°C e os sólidos retidos foram secos em estufa durante 12 horas a 45°C e armazenados em temperatura ambiente para posterior caracterização.

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS TRATADOS

Os filtrados oriundos do pré-tratamento foram descongelados e investigados quanto à sua composição fenólica e de mono e dissacarídeos, pelos métodos de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) e do ácido 3,5-dinitrosalicílico (SAQIB; WHITNEY, 2011), respectivamente. Os sólidos foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada e microscopia eletrônica de varredura.

### 4.6.1 Quantificação de Compostos Fenólicos

Uma curva de calibração de ácido gálico foi realizada num intervalo de concentração de 45 a 450 mg/L. Em balões volumétricos de 10 mL, as amostras foram feitas da seguinte maneira: pipetou-se primeiro 5 mL de água destilada, logo 100 µL de solução diluída de ácido gálico, então 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Deixou-se repousar por 3 minutos e adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de cálcio a 15 %. Os balões foram agitados e as soluções avolumadas e homogeneizadas. As amostras foram colocadas ao abrigo da luz durante 2 horas e após este período as absorvâncias de cada uma foram lidas em espectrofotômetro a 765 nm. A curva obtida está apresentada no Apêndice A.

Com as amostras dos sobrenadantes filtrados provenientes dos tratamentos foram utilizados os mesmos volumes de reagentes, apenas substituindo o volume de solução de ácido gálico pelo de amostra. Do mesmo modo, as soluções ficaram no escuro por 2 horas e suas absorvâncias foram lidas a 765 nm.

### 4.6.2 Quantificação de Açúcares Redutores

Primeiramente, o reagente DNS foi preparado da seguinte forma: em um béquer de 1 L, adicionou-se 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g de tartarato

sódio e potássio em 800 mL de hidróxido de sódio 0,5 M, sob agitação magnética e leve aquecimento. Após a solubilização dos sólidos, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e avolumada com água destilada.

Duas curvas de soluções padrão de glicose foram realizadas. A primeira com concentrações de 0,15 a 0,9 g/L (Apêndice B) e a segunda de 1 a 7 g/L (Apêndice C). Todas as análises foram feitas em duplicatas.

As quantificações das amostras que continham 0,15 a 0,9 g/L de açúcar redutor (AR) foram feitas adicionando um mL de cada concentração da amostra em 4 mL do reativo DNS em um tubo de ensaio. Agitou-se cada mistura por 30 segundos em vórtex, depois colocou-se todos os tubos em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Logo transferiu-se as amostras para um banho de gelo por mais 5 minutos e após atingir a temperatura ambiente as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

Já para as amostras que continham entre 1 e 7 g/L de AR, 0,5 mL foi adicionado em tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e 3 mL do reativo DNS. E o procedimento foi o mesmo descrito no parágrafo anterior; porém, depois do banho-maria adicionou-se 20 mL de água destilada. Logo, resfriou-se as amostras e as absorbâncias foram lidas a 540 nm.

#### 4.6.3 Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os sólidos, depois de filtrados e secos a 45°C por 12 h, foram analisados por FTIR (ATR), sendo que a leitura foi feita com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, numa faixa de comprimento de onda de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

O efeito do tratamento da biomassa foi observado por meio de mudança na intensidade das bandas correspondentes à celulose, à hemicelulose e à lignina, de acordo com Chen et al. (2010), Adapa et al. (2011), Xu et al. (2013) e Castoldi et al. (2017), conforme o Quadro 06.

**Quadro 06 – Características dos picos de celulose, hemicelulose e lignina analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Polímero	Atribuições
898	Celulose	Celulose amorfa
1098	Celulose	Celulose cristalina
1338	Celulose	Vibração no plano C–H
1373	Celulose	Estiramento C–O
1429	Lignina	Unidades siringil e guaiacil condensadas
1467	Lignina	Deformação CH <sub>2</sub>
1510	Lignina	Vibração no esqueleto aromático
1730	Hemicelulose	Estiramento C=O de acetona e aldeído

Fonte: Autoria própria.

#### 4.7 SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Conforme condições estabelecidas por Wang et al. (2013), Dias et al. (2010) e Jeya et al. (2009), foram utilizados tampão acetato de sódio (pH 5,0) e um volume adequado de coquetel enzimático Cellic® CTec2 para obtenção de 50 FPU (*filter paper units*) de celulasas por grama de substrato (SUN; CHENG, 2002).

As amostras de hidrólise consistiram em 0,4 g de casca de arroz ou bagaço de cana provenientes do pré-tratamento com lacase, 20 FPU de enzima (Cellic® CTec2) e 20 mL de tampão acetato de sódio (pH 5,0) que foi suplementado com 40 µg/mL de amoxicilina para não haver contaminação da solução.

Os ensaios foram mantidos em *shaker* a 50°C, 150 rpm, no decorrer de 72 h. A celulose microcristalina Avicel® (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão de sacarificação nas mesmas condições descritas acima. Além disso, a amostra oriunda do controle da etapa anterior também foi testada com enzima e um controle com a biomassa tratada foi analisado sem a presença do coquetel enzimático.

No final da sacarificação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos para interromper a reação. Então, foram arrefecidas em temperatura ambiente e filtradas em membrana de fibra de vidro. Os filtrados e os sólidos

restantes (biomassa) foram analisados quanto à composição (como descrito no tópico 4.6).

#### 4.8 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO

A fermentação dos açúcares obtidos com a biomassa que apresentou a melhor condição de sacarificação foi realizada por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, uma proveniente da Sigma-Aldrich e outra isolada de amostra liofilizada, adquirida comercialmente (marca Fleischmann). Essas cepas foram cultivadas em caldo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 20 g/L agar) a 28°C por 48 h. Na sequência foram repicadas para placas de Petri contendo agar YPD, cultivadas nas mesmas condições. Antes da utilização, todos os materiais foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) durante 15 minutos.

No preparo do inóculo, uma colônia de cada estirpe foi isolada e cultivada em caldo YPD durante 24 h a 28°C. Após este estágio, as células foram transferidas na proporção de 10% (v/v) para um frasco Erlenmeyer contendo meio de fermentação composto de hidrolisado enzimático (como única fonte de carbono) e alguns suplementos, como fosfato de amônio e sulfato de magnésio, nas concentrações definidas por Alfani et al. (2000).

O meio de cultivo inoculado foi transferido do frasco Erlenmeyer para tubos de ensaio (8 mL), de modo a minimizar o espaço livre (oxigênio disponível) no frasco. Para cada levedura foram dispostos 20 tubos (10 retiradas de amostra em duplicata).

A fermentação foi realizada em câmaras de anaerobiose (para priorizar a rota alcoólica) durante 36 h a 28°C. As amostras foram retiradas nos tempos 0, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 28, 32 e 36 horas. Durante o processo foram monitorados o crescimento celular, através de contagem em placas por *spread plate* (SANDERS, 2012), pH (tiras indicadoras Merck), concentração de açúcares conforme descrito no item 4.6.2 e quantificação de etanol.

A concentração de álcool etílico obtida durante esta etapa foi determinada pelo Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais (LATAM)

(Curitiba-PR), através de Cromatografia Gasosa (CG Varian, CP-3380) com detector por ionização de chama (FID – *flame ionization detector*), em uma amostragem por *headspace*.

Para a cromatografia gasosa foi utilizada coluna capilar Varian Factor Four, VF-1ms (15 m, 0,25 mm, 0,25 µm), com temperatura do injetor de 250°C e do detector de 290°C. A temperatura inicial do forno foi de 40°C por 8 minutos, seguida de rampa de aquecimento de 25°C/min até atingir 140°C, mantidos por 12 minutos. Em seguida efetuou-se uma nova rampa de 45°C/min até atingir 220°C, mantida por 13,8 minutos.

A curva padrão para concentrações de etanol variando de 2 a 20 mil mg/L encontra-se no Anexo A.

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizados testes estatísticos para avaliação dos principais efeitos e das interações entre os tratamentos, assim como para analisar a significância estatística ( $p < 0,05$ ) das possíveis diferenças entre os experimentos controle e pós-tratamento enzimático. Os principais testes realizados foram: análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (comparações múltiplas), através dos *softwares* Origin Pro 8.0 e Statistica 8.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Seis gêneros de basidiomicetos foram testados para produção de enzimas ligninolíticas em cultivo líquido estático: *Trametes*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Inonotus*, *Perenniporia* e *Aurantioporus*. Adicionando-se bagaço de uva, bagaço de cana e casca de arroz no meio de cultura, o crescimento fúngico foi observado após uma semana de incubação (Figura 13).

Figura 13 – Fotografia dos frascos com crescimento fúngico em cultivo líquido estático após 7 dias a 28°C.



Todas as cepas testadas produziram lacase como a principal enzima ligninolítica, com atividades superiores àquelas observadas para manganês e lignina peroxidase (Tabela 03). O meio de cultivo para produção dos extratos enzimáticos potencializou a produção desta enzima, em particular, devido à sua composição. Muitos trabalhos já realizados comprovam que a presença de sulfato de cobre, por exemplo, induz a atividade da lacase, visto que tal metal é necessário para a síntese das cobre polifenoloxidasas (SILVA et al., 2012; DING et al., 2014).

O cobre tem sua influência sobre a enzima decorrente de elementos sensíveis ao metal, que estão localizados na região promotora de genes da lacase. Sendo assim, esta expressão gênica pode indiretamente ser afetada pela presença de cobre no meio de cultivo (FARACO et al., 2003).

**Tabela 03 – Produção enzimática pelos fungos da podridão branca testados (n=2).**

Fungo	Substrato	Atividade Enzimática (U/L)		
		Lacase	Manganês Peroxidase	Lignina Peroxidase
<i>Trametes sp.</i>	Cana	9467,85 ± 589,60	28,79 ± 18,51	ND
	Arroz	7942,72 ± 418,19	22,69 ± 3,95	ND
<i>P. pulmonarius</i>	Cana	4650,34 ± 100,07	ND	2,14 ± 0,23
	Arroz	5099,89 ± 535,69	ND	2,04 ± 0,03
<i>G. lucidum</i>	Cana	2826,89 ± 424,23	5,50 ± 0,17	1,53 ± 0,33
	Arroz	2156,45 ± 354,38	5,13 ± 0,72	ND
<i>I. splitgerberi</i>	Cana	529,69 ± 42,07	ND	ND
	Arroz	432,57 ± 3,92	ND	ND
<i>Perenniporia sp.</i>	Cana	268,98 ± 4,12	ND	ND
	Arroz	289,38 ± 6,12	ND	ND
<i>A. pulcherrimus</i>	Cana	12,31 ± 1,44	1,70 ± 0,06	ND
	Arroz	11,80 ± 1,03	ND	ND

ND = Não detectado.

Como observado na Tabela 03, a produção das enzimas apresentou ampla variação, de acordo com a espécie fúngica e o substrato adicionado para crescimento. Segundo estudos feitos por Burla et al. (1992) e Arora e Gill (2001), a adição dos resíduos lignocelulósicos eleva significativamente a produção enzimática

dos fungos, pois as unidades fenólicas existentes na lignina do resíduo induzem a produção de lacase (PIRES, 2015). Além disso, a presença de resíduos agroindustriais na composição do meio de produção das enzimas ligninolíticas pode apresentar vantagens econômicas pela redução de custos com o uso de substratos/indutores caros, aumentando a viabilidade para a aplicação dessas enzimas em escala industrial (FILLAT et al., 2017).

Os melhores resultados obtidos foram com *Trametes* sp.: 9467,8 U/L para lacase induzida pela adição do bagaço de cana-de-açúcar e 7942,7 U/L induzida por casca de arroz. Atividades de MnP também foram detectadas nestes extratos brutos, com valores para bagaço de cana e casca de arroz de 28,8 U/L e 22,7 U/L, respectivamente. O resultado alcançado neste trabalho com esta cepa está condizente com a literatura.

Em um estudo feito por Songulashvili et al. (2007) – cujo meio de cultivo era composto de: glicose 10 g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,8 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L e extrato de levedura 2 g/L – todas as cepas e espécies testadas pertencentes ao gênero *Trametes* apresentaram uma produção de lacase extracelular comparativamente elevada, entre 9 mil a 20 mil U/L, e de manganês peroxidase entre 60 e 700 U/L, após 7 – 14 dias de fermentação submersa em 25 °C.

Em contrapartida, a cepa de *Pleurotus pulmonarius* produziu 4650,3 U/L e 5099,9 U/L de lacase com bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz, respectivamente; com baixos valores de LiP (2 U/L) em ambos os resíduos. Tychanowicz et al. (2006) encontraram a atividade máxima de lacase para *P. pulmonarius* de 1420 U/L com 9 dias de fermentação (em estado sólido), a 30°C, num meio de cultura contendo 5 g de espiga de milho enriquecido com 0,15 g de glicose e 0,014 g de tartarato de amônio. Sendo este meio basal complementado com diferentes quantidades de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  variando de 0 a 15,0 mM.

A secreção de enzimas ligninolíticas para os demais fungos investigados foi menor do que para as espécies mencionadas nos parágrafos anteriores. É importante salientar que estudos com as espécies *Inonotus splitgerberi*, *Perenniporia* sp. e *Aurantioporus pulcherrimus* ainda são escassos, sendo difícil comparar as produções enzimáticas de cada um com a literatura. Ou seja, os resultados encontrados nesse trabalho para alguns isolados são inéditos.

Devido ao exposto, os dados obtidos demonstraram que diferentes espécies de fungos da podridão branca podem apresentar uma grande variabilidade na produção de lacase (e outras enzimas ligninolíticas) nas mesmas condições de cultura.

Atividade de lacase detectada com *Trametes* sp. foi duas vezes maior que a obtida com o segundo melhor produtor, *P. pulmonarius*, na presença de bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, a casca de arroz induziu mais lacase do que o bagaço de cana em culturas de *P. pulmonarius*, evidenciando que a presença de diferentes fontes de resíduos lignocelulósicos em meios de cultivo pode afetar a produção de lacase de fungos da podridão branca, mesmo que seja da mesma espécie.

Os resultados divergentes com um ou outro substrato ocorre devido a presença de unidades fenólicas na lignina da biomassa, que pode colaborar para o aumento da produção de enzimas. No caso do arroz, a presença de sílica nas cascas, teóricamente 4% em massa seca, e a forte ligação existente entre a lignina e a celulose do resíduo (SOUZA et al., 2000) podem não ter contribuído tanto para a indução enzimática quanto o bagaço de cana.

Deste modo, com os resultados obtidos, a avaliação que se têm é que os fungos *Trametes* sp. e *Pleurotus pulmonarius* são produtores promissores de lacase. Contudo, mesmo que os demais fungos não tenham se destacado tanto neste aspecto, é possível que maiores incrementos na produção destes sejam alcançados em outras condições de cultivo, assim como mostra o estudo realizado por Younes et al. (2007). Estes autores otimizaram o meio para produção de enzimas por *Perenniporia tephropora*, adicionando extrato de malte (20 g/L), peptona de soja (10 g/L) e cobre (250 µmol/L), em 9 dias de fermentação a atividade de lacase passou de aproximadamente 200 U/L para 5300 U/L após o aprimoramento.

## 5.2 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DOS SUBSTRATOS

### 5.2.1 Caracterização por Fenólicos Totais

Após o pré-tratamento com extrato enzimático, produzido por *Trametes* sp., os compostos fenólicos removidos da lignina, assim como os mediadores químicos com grupamento fenol utilizados no tratamento, foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu nos filtrados das amostras. Na Tabela 04 são encontrados os resultados de compostos fenólicos totais do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz.

**Tabela 04 – Matriz do planejamento experimental (Plackett–Burman design) e resultados da composição fenólica das amostras após pré-tratamento (n=2).**

Amostra	Condições Amostrais							Fenólicos Totais EAG (g/L)	
	A	B	C	D	E	F	G	Bagaço de Cana	Casca de Arroz
Controle								0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,00
01	0	0	0	1	1	1	0	0,21 ± 0,00	0,18 ± 0,02
02	1	0	0	0	0	1	1	0,27 ± 0,04	0,20 ± 0,00
03	0	1	0	0	1	0	1	0,18 ± 0,02	0,09 ± 0,02
04	1	1	0	1	0	0	0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
05	0	0	1	1	0	0	1	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,00
06	1	0	1	0	1	0	0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00
07	0	1	1	0	0	1	0	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01
08	1	1	1	1	1	1	1	0,14 ± 0,00	0,11 ± 0,00

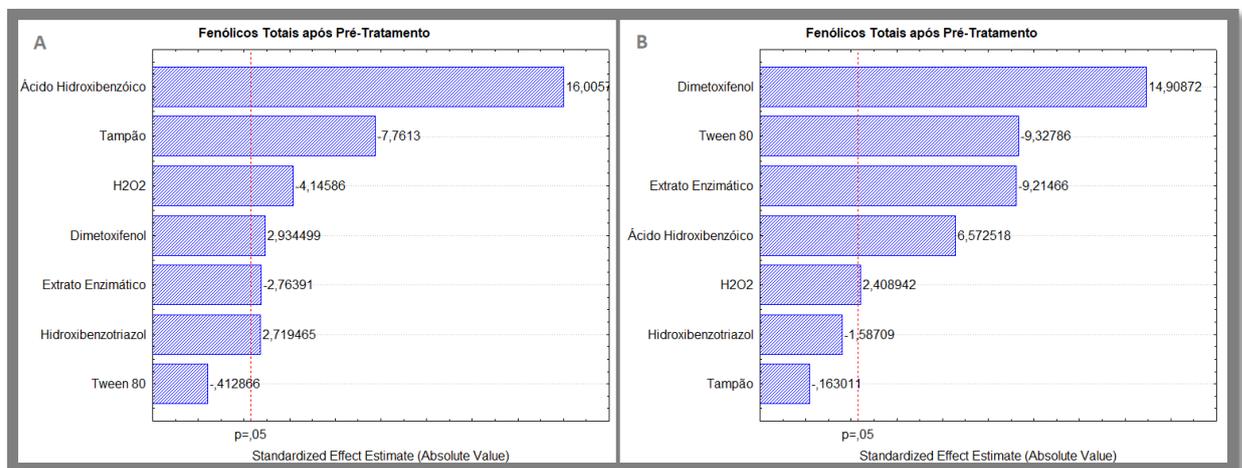
A = Hidroxibenzotriazol; B = Tween 80; C = Extrato enzimático; D = Tampão acetato de sódio; E = Peróxido de hidrogênio; F = 2,6-Dimetoxifenol; G = Ácido 4-hidroxibenzóico.  
Onde: (0) = sem adição e (1) = com adição. EAG = Equivalente Ácido Gálico.

A amostra 2 do pré-tratamento do bagaço de cana apresentou um maior valor de fenólicos totais (0,27 g/L), o que já era esperado, visto que era composta apenas por compostos com radicais fenóis (hidroxibenzotriazol, 2,6-dimetoxifenol e ácido 4-hidroxibenzóico), e ainda com ausência de lacase. Segundo

Pires (2015), a detecção de compostos fenólicos pode estar vinculada à presença dos mediadores da enzima inseridos no pré-tratamento dos resíduos agroindustriais.

De acordo com a análise estatística feita com base nos resultados da quantificação de fenólicos totais, cujo diagrama de Pareto está apresentado na Figura 14, os fatores que mais influenciaram nesse experimento foram o ácido hidroxibenzoico e o dimetoxifenol, para o bagaço de cana e para a casca de arroz, respectivamente.

**Figura 14 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de fenólicos totais após o pré tratamento do bagaço de cana (A) e da casca de arroz (B).**



Outra consideração a se fazer é que no ensaio 8 (Tabela 04) os valores obtidos foram superiores aos de controle, sendo aproximadamente metade da amostra 2. Ou seja, na amostra com todos os reagentes empregados houve a ação da enzima consumindo mediadores, a qual pode estar simultaneamente liberando fenólicos devido à degradação de lignina.

Os resultados evidenciam que quando não há atividade das enzimas ligninolíticas, condições 1 a 4, os mediadores não são consumidos e assim são detectados pelo método de Folin-Ciocalteu. Assim como, em virtude da presença de lacase, condições 5 a 8, os mediadores podem ser oxidados por esta enzima, auxiliando no tratamento dos resíduos.

É importante ressaltar que as lacases e outras enzimas ligninolíticas, além de atuarem como agentes na biodesignificação, também podem ser utilizadas

na destoxificação de subprodutos reacionais originados do pré-tratamento de lignoceluloses. Esses subprodutos incluem diversos compostos fenólicos, como o ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, siringaldazina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, entre outros, que podem exercer efeito inibidor nos processos bioquímicos subsequentes (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000), ou seja, nas etapas de sacarificação e fermentação (PANAGIOTOU; OLSSON, 2006; TAHERZADEH; KARIMI, 2011; XIMENES et al., 2011).

Deste modo, a aplicação do extrato com lacases no pré-tratamento do bagaço de cana e da casca de arroz apresenta vantagens com relação à outros processos, como os químicos, por possibilitar a alteração da lignina e, ao mesmo tempo, a redução direta da toxicidade dos subprodutos do processo de deslignificação.

### 5.2.2 Caracterização por Açúcares Redutores

Os resultados obtidos da quantificação de açúcares redutores após o pré-tratamento estão apresentados na Tabela 05.

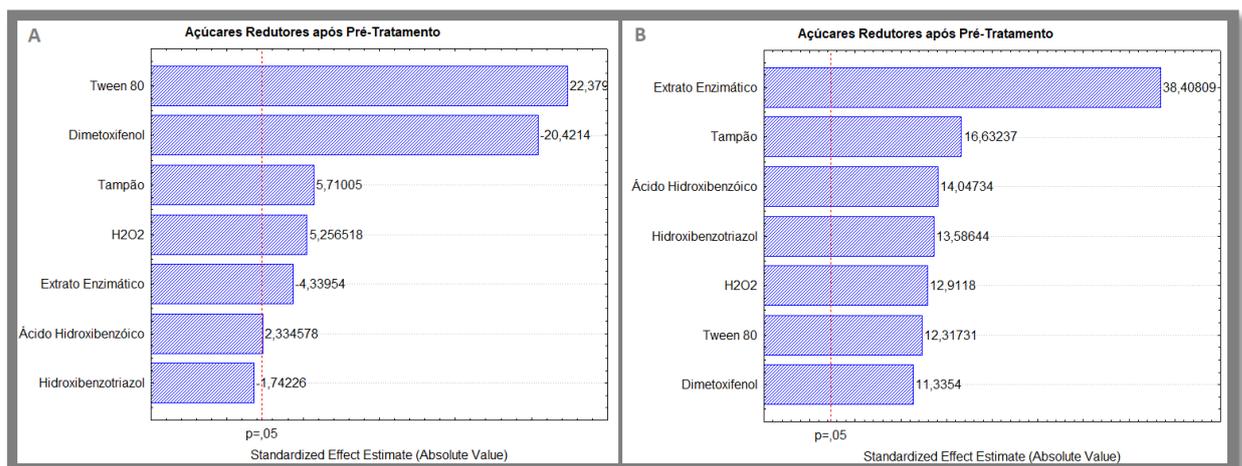
**Tabela 05 – Matriz do planejamento experimental (Plackett–Burman design) e resultados da quantificação de açúcares redutores das amostras após pré-tratamento (n=2).**

Amostra	Condições Amostrais							Açúcares redutores (g/L)	
	A	B	C	D	E	F	G	Bagaço de Cana	Casca de Arroz
Controle								0,11 ± 0,00	0,09 ± 0,00
01	0	0	0	1	1	1	0	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,00
02	1	0	0	0	0	1	1	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,00
03	0	1	0	0	1	0	1	0,29 ± 0,00	0,10 ± 0,00
04	1	1	0	1	0	0	0	0,27 ± 0,00	0,10 ± 0,01
05	0	0	1	1	0	0	1	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01
06	1	0	1	0	1	0	0	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01
07	0	1	1	0	0	1	0	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,00
08	1	1	1	1	1	1	1	0,22 ± 0,00	0,30 ± 0,01

A = Hidroxibenzotriazol; B = Tween 80; C = Extrato enzimático; D = Tampão acetato de sódio; E = Peróxido de hidrogênio; F = 2,6-Dimetoxifenol; G = Ácido 4-hidroxibenzóico.  
Onde: (0) = sem adição e (1) = com adição.

Todas as amostras resultaram em valores iguais ou maiores que a do controle (tratado somente com água da fervura). As pequenas quantidades encontradas em todos os ensaios podem ser provenientes tanto dos açúcares que já se encontravam livres no bagaço de cana e na casca de arroz, quanto aqueles açúcares redutores presentes no extrato enzimático inserido nas amostras, como pode ser constatado pelo diagrama de Pareto da Figura 15. Segundo a análise estatística realizada, na quantificação de açúcares redutores das amostras com casca de arroz, a variável mais significativa para este experimento após o pré-tratamento foi o extrato rico em enzimas ligninolíticas.

**Figura 15 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após o pré tratamento do bagaço de cana (A) e da casca de arroz (B).**



É perceptível também, pela análise da Tabela 05, que ocorreu uma pequena hidrólise da celulose em algumas amostras no decorrer do pré-tratamento. No ensaio 8, por exemplo, o resultado é o dobro para o substrato de cana e o triplo para a casca de arroz, quando comparado à biomassa tratada apenas com água fervente. A presença de celulasas no extrato bruto pode estar relacionada a este fato. A atividade de celulasas totais determinada foi de 16,5 FPU/mL (na presença de bagaço de cana) e 16,2 FPU/mL (com casca de arroz), o que pode explicar o acréscimo discreto na concentração de açúcares.

Não somente isso, mas a presença das lacases no extrato bruto em ação conjunta com mediadores químicos pode ter afetado a estrutura rígida da

lignina e deixado a celulose mais disponível, facilitando o acesso desta pelas celulasas. Em princípio, a ação direta da lacase sob a lignina é restrita as unidades fenólicas desse polímero, porém alguns compostos sintéticos, como o hidroxibenzotriazol, atuam como portadores de elétrons entre a enzima e o substrato final, expandindo a ação da enzima ligninolítica (GUTIÉRREZ et al., 2012).

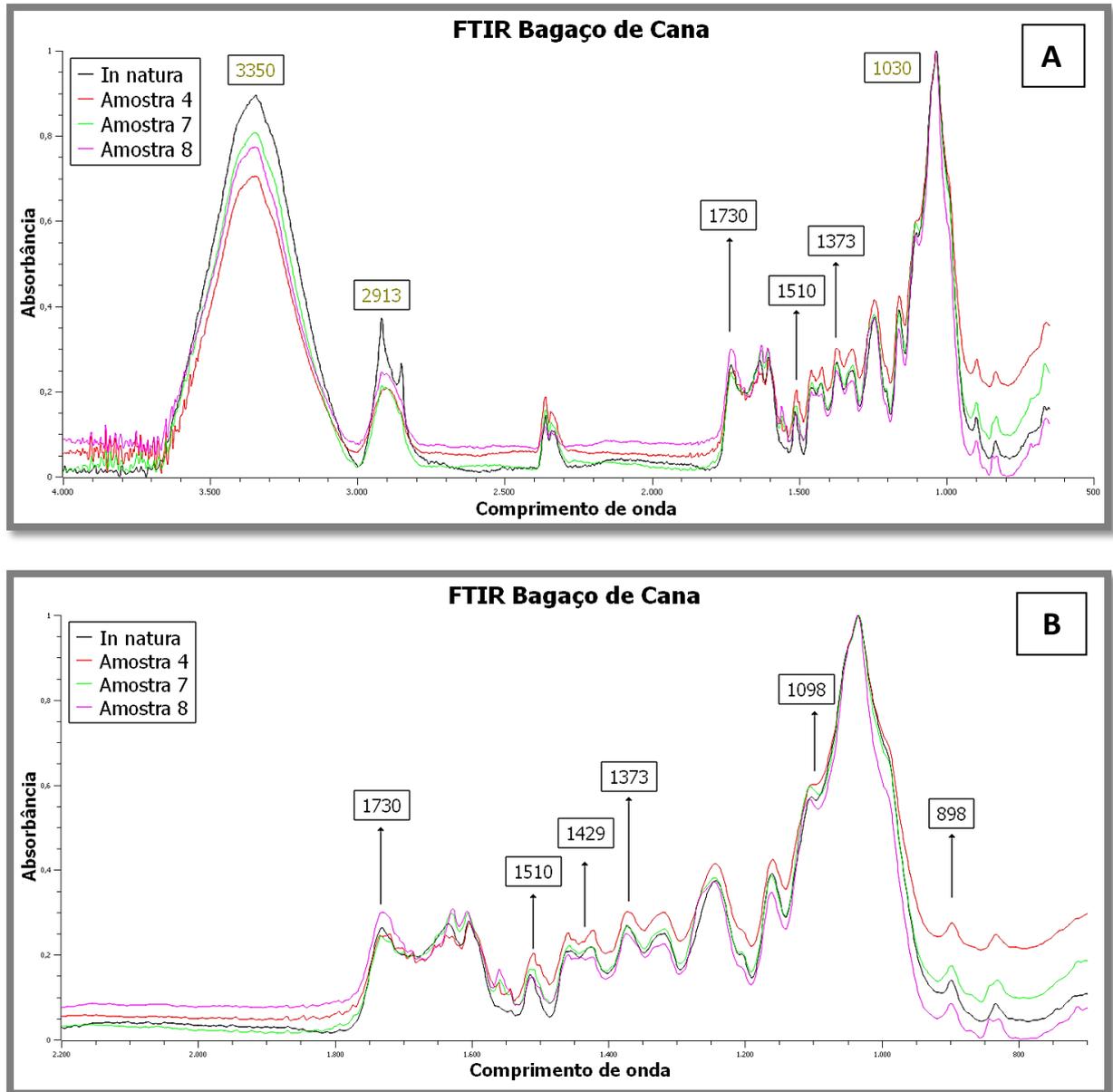
### 5.2.3 Caracterização por FTIR (ATR)

Análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz (*in natura* e pré-tratados), na região entre 600 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , foram efetuadas para se avaliar as modificações na estrutura química destes substratos quanto à etapa de pré-tratamento enzimático. Os resultados desta caracterização estão nas figuras 16 e 17, sendo evidenciado os espectros pertencentes à uma amostra sem tratamento com lacase (4), uma com a presença da enzima (7) e outra amostra contendo todos os fatores experimentais utilizados (8).

Analisando-se a Figura 16, na qual pode-se observar os espectros para o bagaço de cana, nota-se a presença de uma banda acentuada com frequência de vibração em 3350  $\text{cm}^{-1}$  e outra banda próxima em 2913  $\text{cm}^{-1}$ , revelando a existência de estruturas químicas que possuem ligações do tipo O–H e C–H, que aparecem na região entre 2700 e 3800  $\text{cm}^{-1}$  (SILVA, 2009b). E o outro pico mais elevado, em 1030  $\text{cm}^{-1}$ , é referente a deformação C–O em álcoois primários (CHEN et al., 2010).

As principais modificações entre os espectros de bagaço *in natura* para os pré-tratados ocorrem nas bandas de região de absorção entre 1500 e 1900  $\text{cm}^{-1}$ , sendo esta faixa característica de ácidos carboxílicos (C=O) e anéis aromáticos, respectivamente (SILVA, 2009b).

Figura 16 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para o bagaço de cana em um espectro completo (A) e em outro com a região 700 - 2200  $\text{cm}^{-1}$  ampliada (B) (n=2).

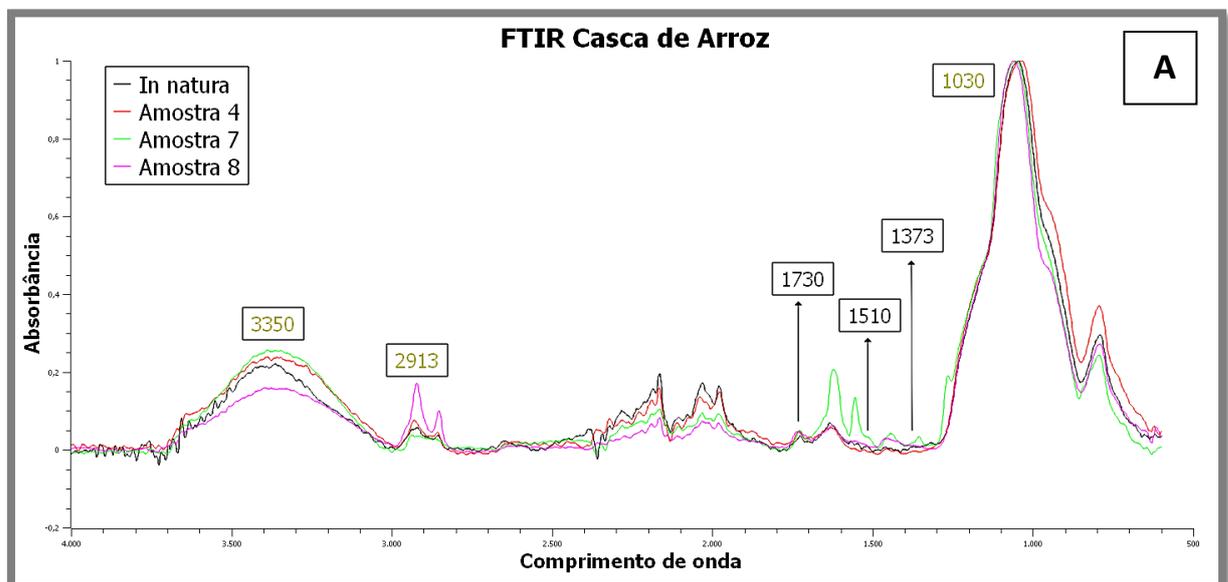


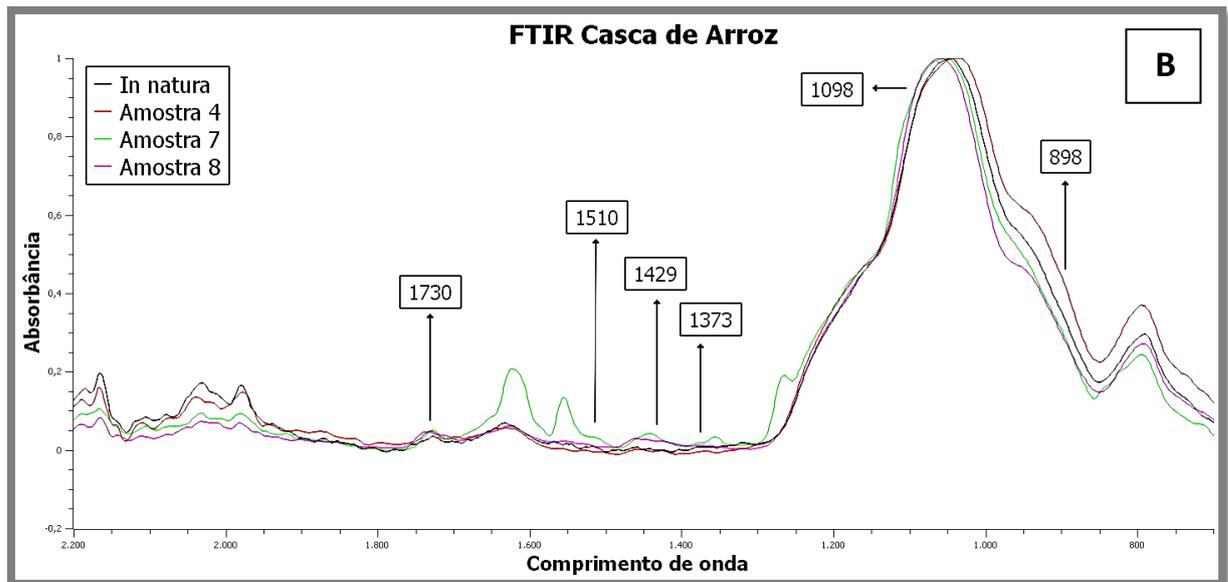
Ao analisar os espectros, é possível observar um aumento do pico 1730  $\text{cm}^{-1}$  na amostra 8, em relação à biomassa *in natura*. Isto pode estar relacionado a uma exposição maior da hemicelulose ocasionada pelo pré-tratamento. Enquanto que, a redução da banda referente ao pico 1429  $\text{cm}^{-1}$  (característica de anéis aromáticos) das amostras 7 e 8 demonstra que houve remoção de parte da lignina durante o tratamento enzimático (ADAPA et al., 2011).

Nos picos 898 e 1373  $\text{cm}^{-1}$ , que são bandas referentes à celulose, não é possível notar uma intensidade maior destas em relação as amostras 7 e 8 quando comparadas com as amostras 4 e *in natura*. Porém, o não desprendimento de celulose não significa que o tratamento com lacase não foi eficiente. Para o espectro da amostra 8, por exemplo, houve uma redução do pico relacionado à celulose cristalina, em 1098  $\text{cm}^{-1}$ , o que pode indicar a conversão do polímero em sacarídeo (CASTOLDI et al., 2014).

Na Figura 17, dividida em A e B, são mostrados os espectros para a casca de arroz *in natura* e amostras após o pré-tratamento. Para este substrato os picos referentes à hemicelulose (1730  $\text{cm}^{-1}$ ), de todas as amostras tiveram um incremento na intensidade em relação à casca de arroz *in natura*. Observando o pico destacado de 1373  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado à celulose, nota-se que apenas as amostras 7 e 8 tiveram um aumento na acessibilidade desta quando comparadas com a amostra 4.

**Figura 17 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para a casca de arroz em um espectro completo (A) e em outro com a região 700 - 2200  $\text{cm}^{-1}$  ampliada (B) (n=2).**





Os picos analisados nos espectros de FTIR junto dos valores obtidos durante a leitura das absorbâncias podem ser vistos na Tabela 06. Nesta, os resultados revelam as diferenças entre as amostras tratadas ou não com o extrato enzimático sob a biomassa inicial.

Analisando-se o pico  $1098\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à celulose cristalina, nota-se que houve um acréscimo nos valores de todos os exemplares, no caso da casca de arroz. Esta cristalinidade é decorrente de cadeias de celulose que agregam-se convertendo-se em fibrilas, possuindo ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila (inter e intracadeias). Desse modo, esta região cristalina pode dificultar a sacarificação impedindo uma hidrólise mais significativa, por causa das fortes ligações entre as unidades de glicose (RAMBO, 2009).

Da mesma forma, para o resíduo de arroz é observado que nas amostras 7 e 8, os valores encontrados no comprimento de onda  $1429\text{ cm}^{-1}$  foram mais elevados se comparados com o substrato original. Evidenciando que, para este substrato, não houve uma remoção maior de lignina, ao passo que este pico é correspondente às unidades siringil e guaiacil condensadas (CASTOLDI et al., 2017).

**Tabela 06 – Picos da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com valores de acréscimo e decréscimo de absorvância sob o substrato *in natura* (n=2).**

Número de onda	Especificação	Amostra	Bagaço de Cana	Casca de Arroz
898	Celulose amorfa	4	+ 0,1347	+ 0,0908
		7	+ 0,0353	- 0,0462
		8	- 0,0540	- 0,0567
1098	Celulose cristalina	4	+ 0,0335	+ 0,0001
		7	+ 0,0207	+ 0,0653
		8	- 0,0146	+ 0,0551
1338	Celulose vibração C-H	4	+ 0,0521	- 0,0124
		7	+ 0,0135	+ 0,0029
		8	- 0,0165	- 0,0062
1373	Celulose estiramento C-O	4	+ 0,0324	- 0,0122
		7	- 0,0031	+ 0,0099
		8	- 0,0195	+ 0,0026
1429	Lignina siringil e guaiacil	4	+ 0,0289	- 0,0019
		7	- 0,0009	+ 0,0294
		8	- 0,0258	+ 0,0219
1510	Lignina esqueleto aromático	4	+ 0,0606	- 0,0105
		7	+ 0,0219	+ 0,0253
		8	+ 0,0033	+ 0,0027
1730	Hemicelulose estiramento C=O	4	- 0,0200	+ 0,0155
		7	- 0,0211	+ 0,0167
		8	+ 0,0370	+ 0,0126

(+) = Valores acrescidos quando comparados com a biomassa inicial

(-) = Valores decrescidos quando comparados com a biomassa inicial

Por outro lado, com base nos dados da Tabela 06, a amostra 7 do bagaço de cana apresentou valores menores no comprimento de onda relacionado a lignina ( $1429\text{ cm}^{-1}$ ) quando comparado com o resíduo “*in natura*”, enquanto que um pequeno acréscimo foi visto no pico  $898\text{ cm}^{-1}$ , que expressa a celulose amorfa.

Sendo assim, com os resultados encontrados da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, tanto para o bagaço de cana-de-açúcar quanto para a casca de arroz, se atesta a contribuição de um pré-tratamento enzimático com lacase para deslignificação parcial das biomassas testadas neste trabalho.

### 5.3 SACARIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Os resultados obtidos na análise de açúcares redutores, realizada após a sacarificação, podem ser observados na Tabela 07. Nesta caracterização notou-se o quão eficiente foi a etapa de pré-tratamento enzimático para o aumento da liberação de açúcares a partir das biomassas, indicando uma exposição maior das fibras pertencentes a celulose e hemicelulose às enzimas hidrolíticas.

**Tabela 07 – Matriz do planejamento experimental do pré-tratamento e resultados da quantificação de açúcares redutores das amostras após sacarificação com Cellic Ctec2 (n=2).**

Amostra	Condições Amostrais do Pré-Tratamento							Açúcares redutores (g/L)	
	A	B	C	D	E	F	G	Bagaço de Cana	Casca de Arroz
<b>Controle 1</b>								0,43 ± 0,01	0,33 ± 0,03
<b>Controle 2</b>								0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02
<b>01</b>	0	0	0	1	1	1	0	3,10 ± 0,18	1,67 ± 0,07
<b>02</b>	1	0	0	0	0	1	1	3,17 ± 0,47	0,43 ± 0,02
<b>03</b>	0	1	0	0	1	0	1	3,58 ± 0,37	0,38 ± 0,01
<b>04</b>	1	1	0	1	0	0	0	3,17 ± 0,06	1,87 ± 0,48
<b>05</b>	0	0	1	1	0	0	1	3,85 ± 0,48	2,84 ± 0,08
<b>06</b>	1	0	1	0	1	0	0	3,68 ± 0,39	2,38 ± 0,43
<b>07</b>	0	1	1	0	0	1	0	4,06 ± 0,03	2,79 ± 0,18
<b>08</b>	1	1	1	1	1	1	1	4,07 ± 0,72	3,39 ± 0,20
<b>Avicel</b>								12,66 ± 1,65	

**Controle 1 = Biomassa tratada com sua água de fervura, com Cellic Ctec. Controle 2 = Biomassa tratada com lacase, sem Cellic Ctec. Onde: (0) = sem adição e (1) = com adição.**

**A = Hidroxibenzotriazol; B = Tween 80; C = Extrato enzimático; D = Tampão acetato de sódio; E = Peróxido de hidrogênio; F = 2,6-Dimetoxifenol; G = Ácido 4-hidroxibenzóico.**

**Avicel = Celulose microcristalina, padrão de sacarificação.**

Com base na Tabela 07 percebe-se que no caso do controle 2 (biomassa tratada com lacase, sem Cellic Ctec) os valores de açúcares redutores (AR) indicam que estes assemelham-se mais ao substrato (conforme Tabela 05), pois o material não foi hidrolisado devido à ausência do coquetel enzimático. Por outro lado, a adição deste composto de enzimas favoreceu uma discreta conversão

da celulose dos resíduos em açúcares no controle 1 (biomassa tratada com água fervente).

Em relação ao padrão de sacarificação (Avicel), percebe-se que o resultado de açúcares redutores obtido (12,6 g/L) foi, considerando a média, ao menos o triplo quando comparado com os melhores resultados alcançados na hidrólise do bagaço de cana (4,07 g/L) e da casca de arroz (3,39 g/L). Isso porque a presença de lignina nos substratos diminui a eficiência da hidrólise enzimática, pois reduz o acesso à celulose. Além disso, a celulose do produto é microcristalina, ou seja, é de uma forma mais organizada do que a celulose existente nos resíduos agroindustriais, que possuem tanto regiões cristalinas quanto amorfas.

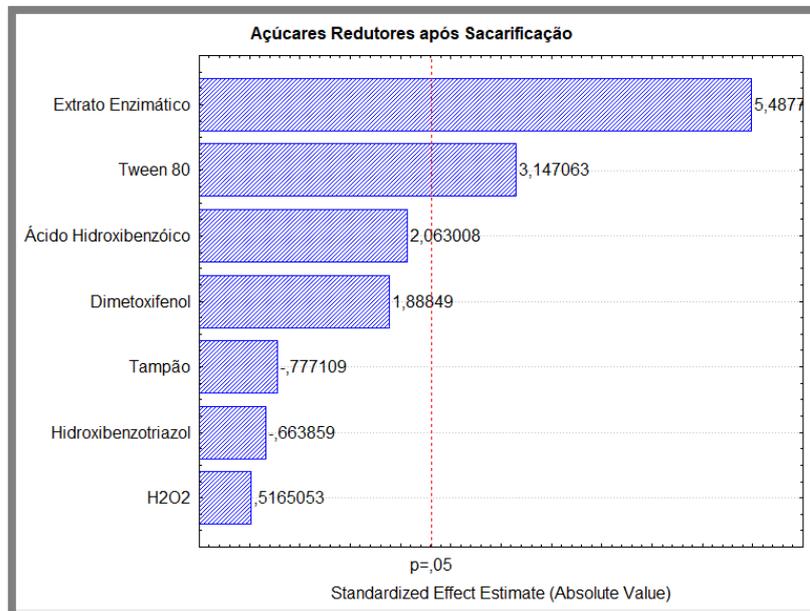
### 5.3.1 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana

Avaliando-se os resultados após hidrólise enzimática, dos controles e das amostras tratadas, é possível ver uma grande diferença na concentração de açúcares liberados. Exemplo disto, pode ser visto comparando-se o controle 1 com a amostra 8 (tratada com lacase) relativa ao bagaço de cana, onde se tem um aumento de pelo menos 9 vezes na produção de AR. Todas as condições de pré-tratamento desse substrato promoveram uma maior acessibilidade e adsorção das enzimas do coquetel enzimático (Cellic Ctec2) à celulose, resultando, assim, em um significativo aumento de glicose procedente da etapa de sacarificação.

Outra consideração que se pode fazer em relação ao bagaço de cana, é que as amostras 7 e 8 tiveram uma produção de 4,06 g/L e 4,07 g/L, respectivamente. Nelas, além do extrato enzimático, houve adição de Tween 80 no pré-tratamento, evidenciando uma possível ação sinérgica, que deve ser melhor estudada futuramente.

A análise estatística (Figura 18) feita nos experimentos com o bagaço de cana demonstrou que o extrato enzimático foi o fator que mais influenciou nos resultados para este substrato, seguido pelo surfactante.

**Figura 18 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática do bagaço de cana.**



A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância da falta de ajuste, do erro e do modelo utilizado (Plackett-Burman design). Os dados estatísticos, que se encontram na Tabela 08, demonstram também que a adição de extrato enzimático e Tween 80 foram positivamente significativos (com  $p \leq 0,05$ ) no experimento com o bagaço de cana, e que o modelo usado ajustou os dados experimentais adequadamente, com coeficiente de determinação de 0,86.

**Tabela 08 – Análise de variância dos resultados da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática do bagaço de cana.**

ANOVA; R-sqr=,86003; Adj:,73755 (Spreadsheet Cana) 7 Factor Screening Design; MS Pure Error=,040712 DV: Açúcares Sacarificação					
Factor	SS	df	MS	F	p
Hidroxibenzotriazol	0,017942	1	0,017942	0,44071	0,525446
Tween 80	0,403212	1	0,403212	9,90401	0,013659
Extrato Enzimático	1,226079	1	1,226079	30,11587	0,000582
Tampão	0,024586	1	0,024586	0,60390	0,459454
H2O2	0,010861	1	0,010861	0,26678	0,619472
Dimetoxifenol	0,145195	1	0,145195	3,56640	0,095648
Ácido Hidroxibenzóico	0,173271	1	0,173271	4,25600	0,073018
Pure Error	0,325696	8	0,040712		
Total SS	2,326842	15			

Segundo Morais (2014) com a redução da lignina, ocorre a abertura dos poros do substrato propiciando o acesso das enzimas celulolíticas às fibras do bagaço, bem como uma ampliação na superfície exposta da celulose e atenuação do grau de polimerização e cristalinidade. Por isso, com os dados obtidos pode-se comprovar que o pré-tratamento com as enzimas ligninolíticas promoveu uma melhora na sacarificação da biomassa.

De acordo com Eriksson et al. (2002), a adição de Tween 80 pode também melhorar a conversão enzimática de celulose em açúcares monoméricos, e muitos mecanismos já foram propostos para explicar tal melhoria. O surfactante pode alterar ou modificar a natureza das propriedades da superfície de celulose, reduzir a ligação irreversível da celulase sobre a celulose, prevenir a desnaturação da enzima assim como a ligação improdutiva das enzimas em resíduos de lignina (TELEBNIA et al., 2010).

Baseado nos resultados obtidos anteriormente, foi realizada uma nova otimização para os melhores parâmetros encontrados no tratamento com o bagaço de cana, usando extrato enzimático e Tween 80. Na Tabela 09 são mostrados os valores encontrados dos açúcares redutores, com base no delineamento experimental utilizando-se os 2 fatores em 3 níveis distintos (Box-Behnken design).

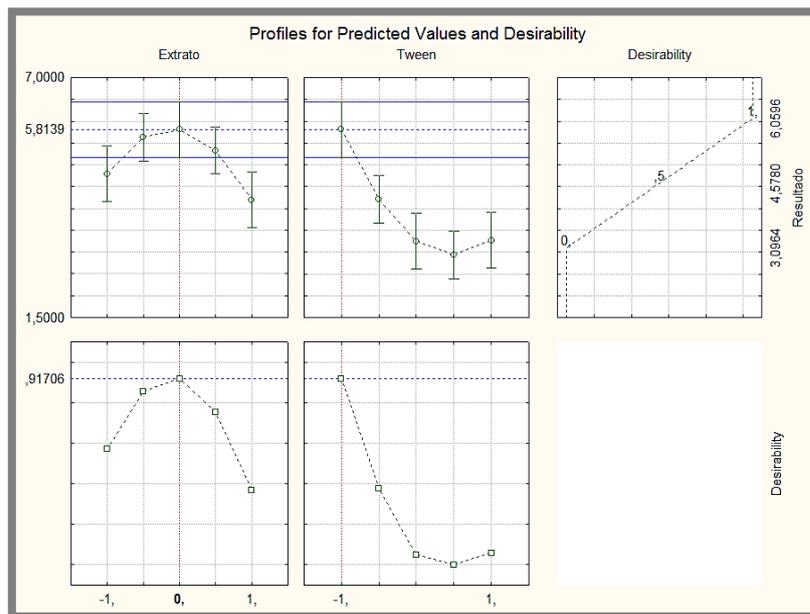
**Tabela 09 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) após sacarificação de bagaço de cana sob efeito de Tween 80 e extrato enzimático (rico em lacase), por delineamento Box-Behnken (n=2).**

Amostra	Condições Amostrais do Pré-Tratamento		Açúcares (g/L)
	Extrato Enzimático* (U/L)	Tween 80 (2,5%) (mL)	
01	32,24	1,0	4,79 ± 0,68
02	32,24	2,5	5,15 ± 0,27
03	32,24	5,0	3,60 ± 0,16
04	64,48	1,0	5,81 ± 0,35
05	64,48	2,5	3,25 ± 0,21
06	64,48	5,0	3,27 ± 0,08
07	96,90	1,0	4,19 ± 0,70
08	96,90	2,5	5,51 ± 0,16
09	96,90	5,0	4,14 ± 0,43

\* Extrato enzimático baseado na concentração de lacase.

A análise estatística dos dados, com o perfil dos valores previstos para este novo experimento, indica que as condições que favorecem a sacarificação de bagaço de cana são: concentração intermediária de enzima e menores adições de Tween 80, como visualizado na Figura 19. Este perfil corresponde à condição 4 mostrada na Tabela 09, cuja produção de AR foi de 5,81 g/L.

**Figura 19 – Perfil estatístico para valores previstos correlacionado ao bagaço de cana.**



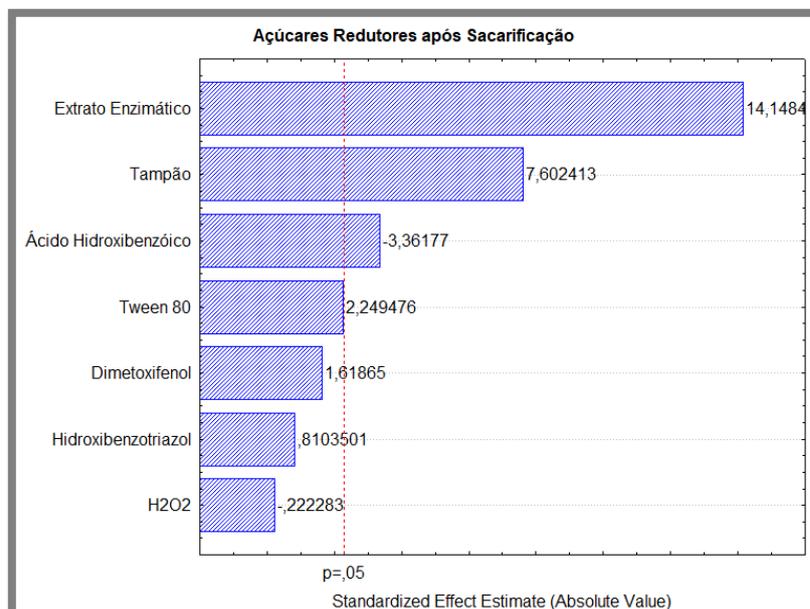
Como já mencionado, o alcance das celulasas às fibras da celulose é primordial, já que a enzima precisa ligar-se à superfície da celulose para ter acesso às ligações  $\beta$ -glicosídicas e promover a hidrólise (ARAÚJO et al., 2013). Porém, a deslignificação total ou parcial do substrato nem sempre está associada aos melhores rendimentos na sacarificação, uma vez que outros fatores pertinentes ao coquetel enzimático empregado também são determinantes na eficiência do processo (VÁRNAI et al., 2010). Da mesma maneira que os mediadores utilizados e a melhor condição de pré-tratamento e sacarificação podem mudar a forma com que ocorre a produção de açúcares redutores nesta última etapa.

### 5.3.2 Hidrólise Enzimática da Casca de Arroz

Em relação aos resultados da sacarificação com casca de arroz, os valores encontrados de açúcares redutores, conforme foi observado na Tabela 07, ficaram entre 0,38 e 3,39 g/L, valores inferiores aos obtidos com o bagaço de cana. Porém, quando comparadas as amostras tratadas com lacase com o controle 1 é possível notar que estas foram melhores do que aquelas que não tiveram adição de extrato enzimático. O contraste de valor da tratada 8, por exemplo, com o controle da água de fervura é no mínimo de 10 vezes.

Na Figura 20, que mostra o resultado da análise estatística dos dados para a casca de arroz, verifica-se que as variáveis significativas nos experimentos para este substrato, de acordo com o experimento inicial de pré-tratamento, foram: extrato enzimático, tampão e o ácido 4-hidroxibenzóico. Nesta circunstância o que pode estar havendo é que o mediador empregado (AHB), por ser uma molécula de energia alta e não específica unicamente à lignina, esteja agindo sobre a holocelulose. As pesquisas realizadas por Rico et al. (2014) e Moilanen et al. (2014) estão em conformidade com esta hipótese.

**Figura 20 – Diagrama de Pareto de efeito padronizado da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática da casca de arroz.**



Conforme os dados estatísticos da análise de variância (ANOVA) em relação à sacarificação da casca de arroz (Tabela 10), com coeficiente de determinação de 0,97, é possível observar que os fatores de maior significância ( $p \leq 0,05$ ) foram de fato aquelas três variáveis mencionadas no parágrafo anterior.

**Tabela 10 – Análise de variância dos resultados da quantificação de açúcares redutores após hidrólise enzimática da casca de arroz.**

ANOVA; R-sqr=,972; Adj:,94749 (Spreadsheet Arroz) 7 Factor Screening Design; MS Pure Error=,062229 DV: Açúcares Sacarificação					
Factor	SS	df	MS	F	p
Hidroxibenzotriazol	0,04086	1	0,04086	0,6567	0,441176
Tween 80	0,31489	1	0,31489	5,0601	0,054612
Extrato Enzimático	12,45696	1	12,45696	200,1793	0,000001
Tampão	3,59663	1	3,59663	57,7967	0,000063
H2O2	0,00307	1	0,00307	0,0494	0,829664
Dimetoxifenol	0,16304	1	0,16304	2,6200	0,144183
Ácido Hidroxibenzóico	0,70328	1	0,70328	11,3015	0,009906
Pure Error	0,49783	8	0,06223		
Total SS	17,77657	15			

Assim como realizado para o bagaço de cana, um delineamento experimental com os fatores mais determinantes no tratamento foi feito para o resíduo de arroz. Para isso, foi utilizado os 3 fatores, extrato enzimático, ácido 4-hidroxibenzóico e tampão acetato de sódio (pH 5,0), em 3 níveis de concentrações. Os resultados obtidos de açúcares redutores para esta nova otimização podem ser visualizados na Tabela 11.

Os maiores resultados de açúcares redutores observados, condições 2 (3,87 g/L) e 3 (3,74 g/L) da Tabela 11, indicam efeito positivo da otimização realizada com os fatores mais influentes, quando comparados com os valores da primeira otimização. Na condição 8 do experimento inicial, cuja condição de pré-tratamento era mais extrema (contendo HBT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dimetoxifenol e AHB), a produção de AR foi de 3,39 g/L (Tabela 07). Ou seja, houve um aumento de 14%, considerando as melhores amostras do primeiro com o segundo delineamento experimental realizado.

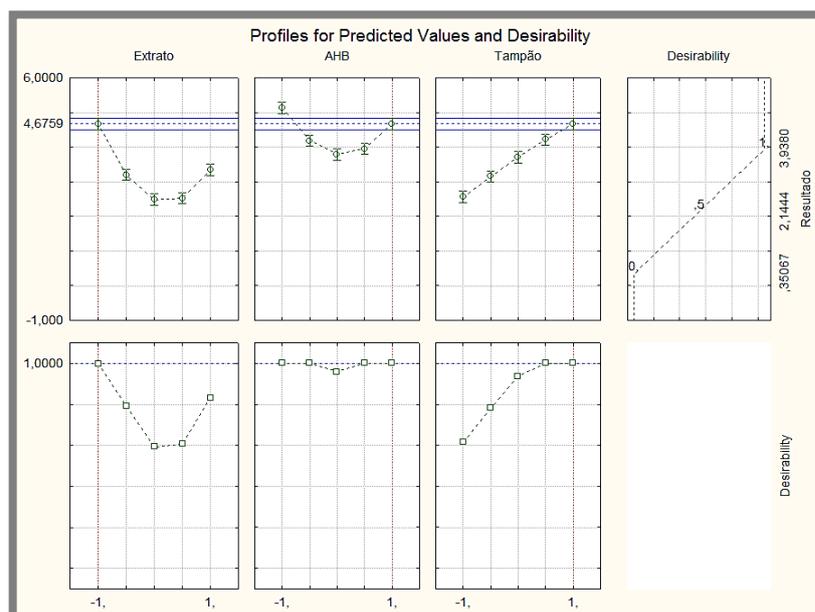
Tabela 11 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) após sacarificação de casca de arroz sob efeito de extrato enzimático (rico em lacase), ácido 4-hidroxibenzoico (AHB) e tampão acetato de sódio (pH 5,0), por delineamento Box-Behnken (n=2).

Amostra	Condições Amostrais do Pré-Tratamento			Açúcares (g/L)
	Extrato Enzimático* (U/L)	AHB (20 mM) (mL)	Tampão (mL)	
01	32,24	1,25	2,36	2,91 ± 0,01
02	32,24	3,12	7,06	3,87 ± 0,06
03	32,24	5,00	4,71	3,74 ± 0,28
04	64,48	1,25	7,06	2,97 ± 0,14
05	64,48	3,12	4,71	0,51 ± 0,03
06	64,48	5,00	2,36	0,44 ± 0,03
07	96,90	1,25	4,71	2,91 ± 0,11
08	96,90	3,12	2,36	0,36 ± 0,01
09	96,90	5,00	7,06	3,23 ± 0,11

\* Extrato enzimático baseado na concentração de lacase.

A análise estatística dos dados, com o perfil dos valores previstos para a segunda otimização (Figura 21), indica que os melhores resultados seriam mesmo obtidos com menores concentrações enzimáticas, maiores quantidades de tampão e que variações do ácido 4-hidroxibenzoico não teriam grande influência no resultado, assim como foi visto na Figura 20, através do diagrama de Pareto.

Figura 21 – Perfil estatístico para valores previstos correlacionado à casca de arroz.



Com o apresentado, notou-se que o processo de hidrólise enzimática que resultou em maiores concentrações de açúcares redutores, após pré-tratamento e sacarificação, foi aquela realizada de forma mais branda. Isto quer dizer que é possível fazer uma melhor sacarificação sem adição de tantos mediadores químicos.

### 5.3.3 Comparação da Sacarificação do Bagaço de Cana e da Casca de Arroz

As concentrações de açúcares redutores alcançadas, nas amostras da segunda otimização, tiveram uma média de 4,41 g/L para o bagaço de cana e 2,32 g/L para a casca de arroz, ou seja, foi possível obter um aumento de 10 e 7 vezes com o pré-tratamento realizado nestes substratos quando comparados com uma amostra não tratada pelo extrato enzimático bruto (controle) (Tabela 7).

Os valores encontrados estão próximos daqueles observados por Shi et al. (2009). Contudo, estudos feitos por diversos autores utilizando outros processos de pré-tratamento enzimático resultaram em valores mais altos na sacarificação, como o caso do trabalho desenvolvido por Wanderley (2012). Este autor usou explosão a vapor como um processo para deslignificação de seus substratos, e com isso, numa hidrólise enzimática de 72 h, conseguiu atingir 16 g/L de glicose do bagaço pré-tratado, mas não-deslignificado e aproximadamente 38 g/L no que foi pré-tratado e deslignificado.

Diferentes pesquisas mostraram a habilidade da lacase agir sozinha para deslignificação, resultando em uma melhora na subsequente hidrólise enzimática. A enzima usada por Mukhopadhyay et al. (2011) para tratar um material moído de mamona (*Ricinus communis*), alcançou um rendimento de aproximadamente 86% na deslignificação do substrato, aumentando os rendimentos dos açúcares redutores em 2,68 vezes.

Em outro trabalho, Rajak e Banerjee (2016), utilizando lacase produzida por *Lentinus squarrosulus*, obtiveram uma remoção de lignina de 81,6% em uma gramínea oriunda da Índia (*Saccharum spontaneum*), resultando em um aumento da produção de açúcar em 7,03 vezes. Por outro lado, uma perda menor de lignina (18%) foi encontrada por Rencoret et al. (2016), quando o material moído de palha de trigo foi tratado com lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*, seguida de

uma extração por peróxido alcalino, que aumentou 25% a liberação de glicose e xilose.

Neste trabalho, a modificação ou remoção parcial de lignina por lacases mostrou-se eficaz para melhorar a hidrólise enzimática de diferentes materiais lignocelulósicos. Além disso, também pode ter ocorrido alterações nas propriedades como porosidade, área superficial e hidrofobicidade dos substratos, resultando na redução de ligação não produtiva das hidrolases (FILLAT et al., 2017).

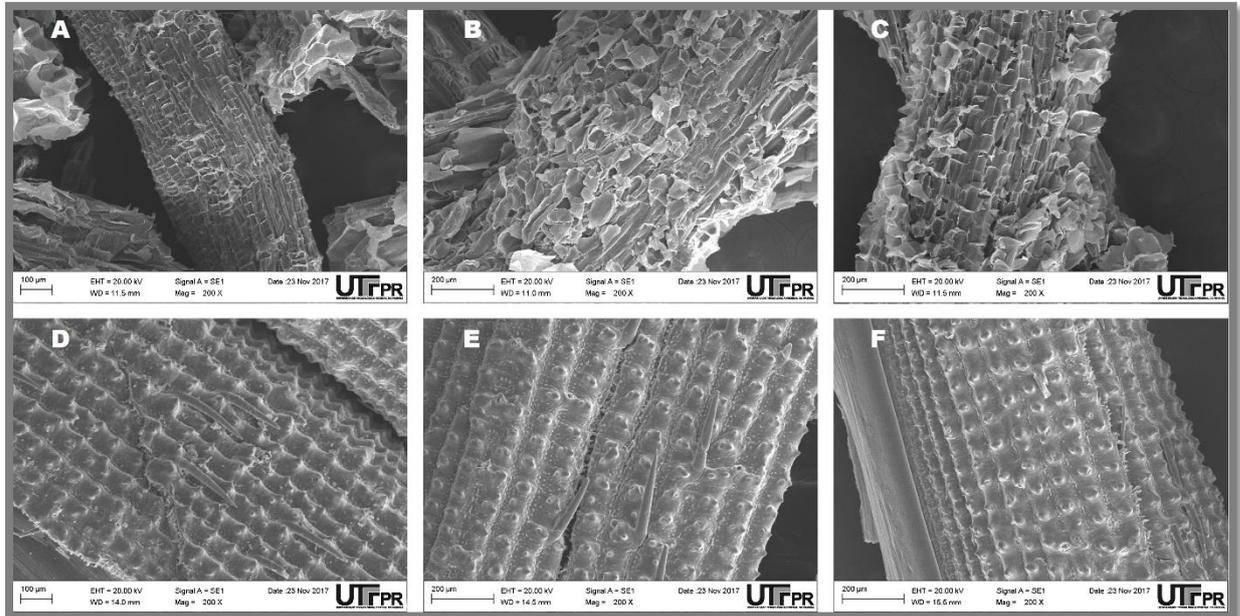
Os valores dos açúcares redutores obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar e para a casca de arroz, após ambos serem sacarificados, sugerem que a diferença de estrutura entre as duas biomassas faz com que o mesmo tratamento enzimático aplicado, no caso do primeiro delineamento experimental, resulte em distintas respostas.

Os resultados de sacarificação para o resíduo da cana foram maiores do que para o arroz, mesmo este possuindo uma quantidade parecida de lignina na sua composição inicial em relação ao outro substrato. As amostras *in natura* apresentaram 1,3% e 1,2% de extrativos, 22% e 21% de lignina, e 0,6% e 18% de cinzas, respectivamente, para bagaço de cana e casca de arroz, possuindo ambos 9% de umidade.

Porém, no caso da casca de arroz o que pode estar dificultando a hidrólise enzimática é a quantidade de cinzas (com sílica) presentes no substrato, que é 36 vezes maior do que a que está no bagaço de cana. Segundo Saha e colaboradores (2005), tanto a presença de lignina quanto de cinzas em grandes proporções pode dificultar a conversão biológica desta biomassa em açúcares e, assim, em etanol.

Através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 22), utilizando um aumento de 200 vezes, é possível perceber o quanto a morfologia da casca de arroz se manteve mais íntegra ao passar pelo pré-tratamento e sacarificação. Diferentemente, ao comparar o bagaço de cana tratado com o não tratado se percebe uma fragmentação maior nas fibras da biomassa.

**Figura 22 – Microscopia eletrônica de varredura para o bagaço de cana e casca de arroz com as melhores condições da segunda otimização.**



**A = Bagaço de cana in natura; B = Bagaço de cana tratado; C = Bagaço de cana sacarificado; D = Casca de arroz in natura; E = Casca de arroz tratada; F = Casca de arroz sacarificada. A, B e C apresentam a amostra 4 da 2ª otimização (64,48 U de lacase com 1 mL de Tween 80). D, E e F apresentam a amostra 2 da 2ª otimização (32,24 U de lacase com 3,12 ml de ácido 4-hidróxibenzóico e 7,06 mL de tampão acetato de sódio em pH 5,0).**

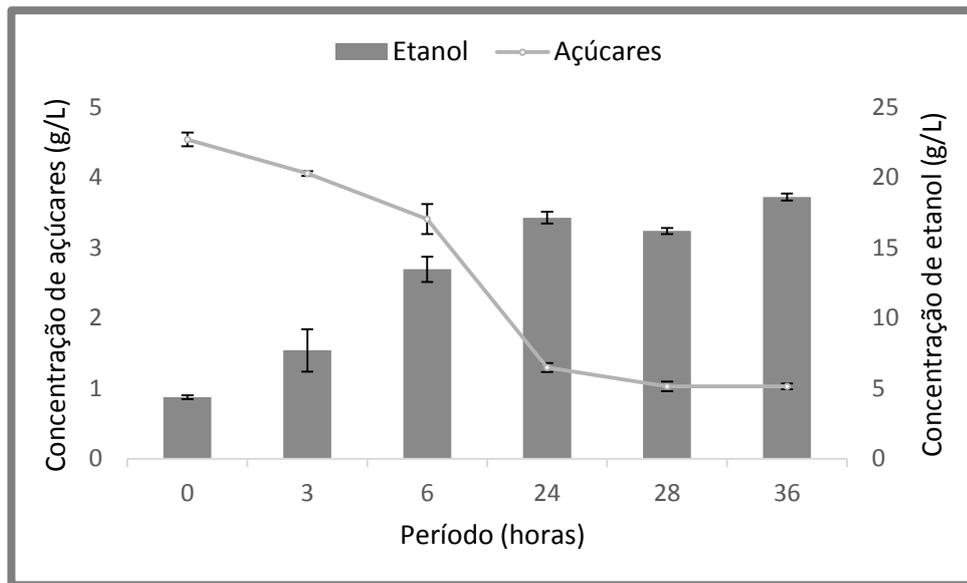
Em suma, diversos fatores podem influenciar os rendimentos da conversão de holocelulose em açúcares e subprodutos, como por exemplo: tamanho de partícula, relação líquido/sólido, tipo de pré-tratamento realizado, coquetel enzimático utilizado, temperatura, tempo de reação, grau de polimerização e configuração da cadeia de celulose, associação desta com outros polímeros de proteção e estruturas dentro da parede celular da planta, como lignina, pectina, hemicelulose, proteínas e elementos minerais (BINOD et al., 2010).

#### 5.4 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

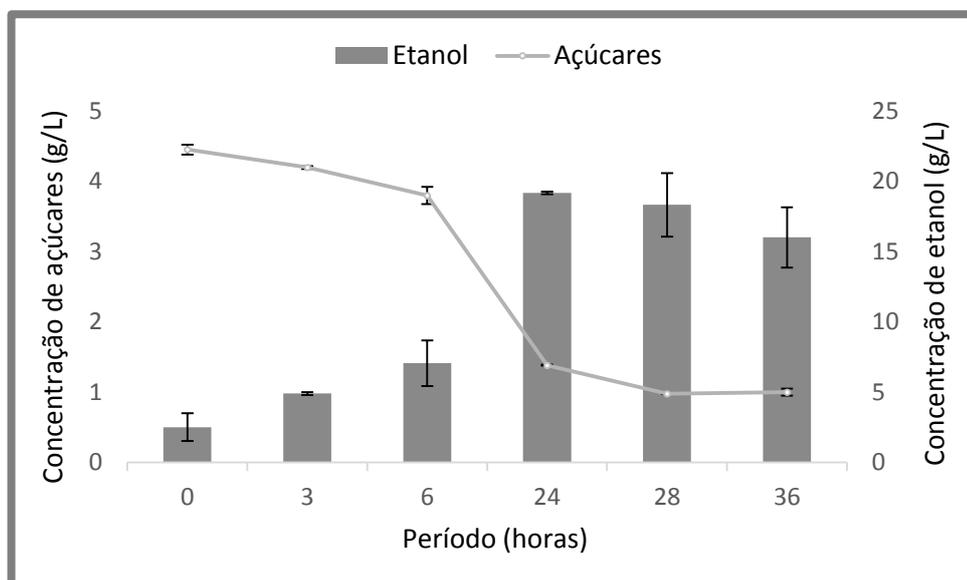
A produção de bioetanol foi conduzida usando o hidrolisado enzimático mais rico em açúcares redutores, que nesse caso, foi oriundo do bagaço de cana-

de-açúcar. A contagem inicial de células foi similar para as duas cepas:  $1,8 \cdot 10^5$  UFC/mL. E o pH manteve-se estável durante todo o processo (pH = 5 - 6). Os Gráficos 1 e 2 mostram os resultados cinéticos obtidos do consumo de açúcares e produção de bioetanol para as leveduras.

**Gráfico 1 – Resultados do consumo de açúcares e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da Sigma-Aldrich (n=2).**



**Gráfico 2 – Resultados do consumo de açúcares e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da Fleischmann (n=2).**



O consumo de açúcares para as duas cepas se deu de maneira semelhante, iniciando com uma concentração em torno de 4,5 g/L e restando, ao final das trinta e seis horas de fermentação, aproximadamente 1,0 g/L, em ambos os ensaios. A estabilidade do pH parece indicar que o consumo de açúcares está relacionado com o crescimento celular e/ou a produção de etanol.

Um aumento do número de células foi observado na amostragem de 12 horas ( $3,0 \cdot 10^6$  UFC/mL para a Sigma e  $2,7 \cdot 10^6$  UFC/mL para a Fleischmann) mantendo-se estável até o final do cultivo (36 horas). O acréscimo dessa biomassa pode ter ocorrido antes de 12 horas, enquanto havia oxigênio disponível no meio; contudo a primeira medição de crescimento celular ocorreu nesse período, não permitindo uma análise mais apurada neste sentido.

O crescimento da quantia de células presentes no meio de apenas um log durante as 36 horas, e a fermentação alcoólica observada nos Gráficos 1 e 2, evidenciam que o sistema se manteve em anaerobiose. Isso porque, na presença de oxigênio o metabolismo da levedura *Saccharomyces* é direcionado para a multiplicação celular, enquanto que na sua ausência há produção de etanol (TORTORA et al., 2016).

Em uma análise qualitativa dos dados, a produção de etanol tem relação com a diminuição de açúcares no meio. Com base nos Gráficos 1 e 2, enquanto estes eram consumidos, o álcool etílico era gerado de forma concomitante.

Na levedura alcoolgênica da Sigma-Aldrich observa-se que um dos picos de produção de etanol (17,15 g/L) ocorreu em 24 horas, coincidindo com uma das menores concentrações de açúcares (1,30 g/L). A partir deste período o consumo de glicose e a geração de álcool se mantiveram próximos entre as amostragens, ou seja, com 24 h o processo já poderia ter sido interrompido, em relação à produção de etanol, talvez até antes.

Um outro adendo que se pode fazer é que, para esta levedura, o processo fermentativo ocorreu de forma mais rápida quando comparado com as amostragens realizadas com a levedura da Fleischmann, conforme observado nos períodos até 6 horas.

Por outro lado, uma análise quantitativa dos dados, buscando o rendimento do processo fermentativo, se mostrou menos concreta devido a contraposição nos resultados. Conforme pode ser observado na Tabela 12, não há correlação estequiométrica coerente nas informações numéricas obtidas. Os

rendimentos finais encontrados para a fermentação, pelas leveduras da Sigma e da Fleischmann, foram de 5,30 e 4,64 g açúcar / g etanol, respectivamente, com uma produtividade em torno de 0,5 g/L.h.

**Tabela 12 – Resultados da quantificação de açúcares redutores (glicose) e etanol, obtidos após fermentação com o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar (n=2).**

Período	<i>S. cerevisiae</i> Sigma-Aldrich		<i>S. cerevisiae</i> Fleischmann	
	Açúcares (g/L)	Etanol (g/L)	Açúcares (g/L)	Etanol (g/L)
0	4,54 ± 0,10	4,38 ± 0,17	4,45 ± 0,07	2,51 ± 0,99
3	4,06 ± 0,03	7,71 ± 1,51	4,20 ± 0,02	4,91 ± 0,10
6	3,41 ± 0,21	13,48 ± 0,89	3,80 ± 0,12	7,07 ± 1,62
24	1,30 ± 0,07	17,15 ± 0,42	1,38 ± 0,00	19,18 ± 2,26
28	1,03 ± 0,04	16,20 ± 0,22	0,98 ± 0,05	18,33 ± 2,15
36	1,03 ± 0,03	18,62 ± 0,25	1,00 ± 0,08	16,02 ± 1,41

Sabendo-se que o rendimento teórico de etanol é 0,511 g/g (SANTOS et al., 2012), era esperado a obtenção de 2,3 g/L de etanol ao considerar a concentração inicial de glicose de 4,5 g/L, alcançada no final da hidrólise enzimática.

A princípio essa discrepância nos dados pode ser tanto devido à técnica utilizada na quantificação de açúcares redutores, quanto daquela usada para determinação do álcool etílico. Para essa afirmação leva-se em conta o fato da *Saccharomyces* ser um gênero que produz etanol unicamente a partir de hexoses (GEDDES et al., 2011); ou seja, o maior rendimento observado não poderia ser decorrente da fermentação de outros açúcares presentes no hidrolisado.

Inclusive, um dos maiores inconvenientes do uso da levedura *S. cerevisiae*, que é o microrganismo mais utilizado na produção de bioetanol, é a sua inaptidão em consumir as pentoses presentes na biomassa lignocelulósica, tais como a xilose e a arabinose (GIRIO et al., 2010; PAES, 2015).

A quantificação de etanol através da análise cromatográfica poderia ter sido influenciada pela eluição de interferentes, como acetaldeído, acetona, metanol e isopropanol. Contudo, isso não foi observado nos cromatogramas cedidos pela empresa (Anexos B e C).

Desse modo, considerando o acima exposto, fica difícil entender onde está o erro da análise quantitativa, no que concerne ao rendimento do processo fermentativo, onde se obteve uma maior produção de etanol do que era esperada estequiometricamente.

Apesar de não ter resultados conclusivos, demandando assim novos estudos, a fermentação revelou alguns dados qualitativos interessantes e mostrou similaridade entre os microrganismos estudados. Foi observado que uma cepa isolada de um material comercial comum (Fleishmann) apresentou comportamento similar àquela sabidamente alcoolgênica (Sigma-Aldrich), tanto em relação a quantificação celular quanto a produção de etanol e consumo de glicose.

O foco principal desta pesquisa era verificar a efetividade do pré-tratamento biológico na produção de um hidrolisado rico em açúcares. Nesse sentido, após a sacarificação, o bagaço de cana apresentou 5,81 g/L de açúcares redutores (Tabela 09) e a casca de arroz 3,87 g/L (Tabela 11), sendo que ambos continham aproximadamente 0,10 g/L de AR no início do estudo (Tabela 05).

Assim, seria possível obter, a partir destes substratos, uma produção de etanol entre 1,9 e 2,9 g/L, considerando a quantidade de açúcares alcançada após hidrólise e tendo como base um rendimento teórico. Ou seja, é possível converter resíduos de baixos valores agregados a um biocombustível que possui um valor mais elevado e com grande destaque atualmente (devido as reservas finitas de petróleo e a vantagem de ser um produto mais ecológico).

Então, utilizando-se um tratamento biológico das biomassas, junto de uma sacarificação exclusivamente enzimática, pode-se melhorar o cenário ambiental através do uso de uma técnica mais sustentável para obtenção do etanol 2<sup>a</sup>G. Diferentemente do que ocorre em muitas usinas, onde se utiliza processos combinados de explosão a vapor e uso de ácidos fracos para o pré-tratamento, a aplicação de uma rota biológica ao longo do processo traz a vantagem de reduzir a presença de inibidores para as etapas de produção do etanol, assim como a redução de subprodutos tóxicos na natureza.

## 6 CONCLUSÃO

A utilização de biomassa lignocelulósica para se produzir bioetanol requer que a tecnologia de produção seja rentável e ambientalmente sustentável desde o começo do processo. Considerando a evolução e a necessidade de biocombustíveis de segunda geração, com o trabalho desenvolvido foi possível chegar as seguintes conclusões:

- Constatou-se que os fungos *Trametes* sp. e *Pleurotus pulmonarius* são potenciais produtores de lacase, e que os demais fungos analisados necessitam de outros meios e condições de cultivo;
- O pré-tratamento realizado com aplicação do extrato enzimático bruto viabilizou e melhorou a sacarificação, em relação a biomassa não tratada;
- A hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose foram mais pronunciadas nas amostras com pré-tratamento, devido a exposição maior de holocelulose;
- A liberação de açúcares redutores foi maior no bagaço de cana-de-açúcar do que na casca de arroz, isto porque esta apresentou uma maior resistência ao pré-tratamento, devido a sua grande composição de cinzas (sílica);
- A produção de bioetanol 2G a partir das duas leveduras testadas foi semelhante, porém a *Saccharomyces cerevisiae* obtida da Sigma-Aldrich se mostrou mais rápida na conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol.

Os resultados deste estudo foram satisfatórios partindo-se do fato de não se ter realizado otimizações de todas as etapas para a produção de biocombustível. Além disso, outro ponto importante, é que não houve um gasto energético elevado e nem a geração de componentes tóxicos na etapa de pré-tratamento da biomassa, ao contrário do que ocorre em pesquisas feitas por outros autores, assim como nas indústrias de bioetanol 2G.

## 7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros são dadas as seguintes sugestões:

- Na produção dos extratos enzimáticos pode ser feita uma otimização dos parâmetros (físicos e químicos) utilizados, assim como pode-se avaliar esta produção diretamente no bagaço de cana e/ou casca de arroz. É importante também fazer a caracterização das enzimas ligninolíticas presentes no extrato bruto, em especial caracterizar a lacase.
- Quanto a etapa de sacarificação, sugere-se um estudo cinético com tempos menores de reação. Uma avaliação de todos os parâmetros físicos relacionados a esta fase seria importante para a otimização da conversão de celulose em açúcares fermentescíveis.
- Por fim, pode ser feito um processo simultâneo tanto da produção enzimática com o pré-tratamento, quanto deste com a hidrólise enzimática (sacarificação).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; ANSUMALI, S. Global potential of rice husk as a renewable feedstock for ethanol biofuel production. **BioEnergy Research**, v. 3, n. 4, p. 328-334, 2010.
- ABBI, M.; KUHAD, R. C.; SINGH, A. Fermentation of xylose and rice straw hydrolysate to ethanol by *Candida shehatae* NCL-3501. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 20-23, 1996.
- ABNT – AGÊNCIA BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7989: pasta celulósica e madeira: determinação de lignina insolúvel em ácido**. 1998.
- ABNT – AGÊNCIA BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13999: papel, cartão, pastas celulósicas e madeira: determinação do resíduo (cinza) após a incineração a 525°C**. 2003.
- ABNT – AGÊNCIA BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14853: madeira: determinação do material solúvel em etanol-tolueno e em diclorometano**. 2002.
- ADAPA, P. K. et al. Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural Science and Technology**, p. 177-188, 2011.
- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.
- ALFANI, F. et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 184-192, 2000.
- ALMEIDA, S. R. **Pirólise rápida de casca de arroz: estudo de parâmetros e caracterização de produtos**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANEEL – AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. Disponível em: < [http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa\(2\).pdf](http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa(2).pdf) > Acesso em: 02/02/2018.
- ANTIZAR-LADISLAO, B.; TURRION-GOMEZ, J. L. Second-generation biofuels and local bioenergy systems. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, 2008.
- ARAÚJO, C. R. de. et al. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, UNIFACS, 2013.

- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 89-91, 2001.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BAK, J. S. et al. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 471–482, 2009.
- BELKACEMI, K.; HAMOUDI, S. Enzymatic hydrolysis of dissolved corn stalk hemicelluloses: reaction kinetics and modeling. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 7, p. 802-808, 2003.
- BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4767-4774, 2010.
- BORJESSON, J.; PETERSON, R.; TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 754-762, 2007.
- BOSSLE, R. **Exclusivo: Custo de produção estimado do etanol celulósico nas 6 maiores usinas do mundo.** Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/custo-producao-etanol-celulosico-usinas-mundo-150316/> > Acesso em: 02/02/2018.
- BRASIL – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. EPE. **Balanco Energético Nacional 2017** – Ano base 2016: Relatório Síntese. Rio de Janeiro, 2017.
- BREEN, A.; SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, 1999.
- BUABAN, B. et al. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 18-25, 2010.
- BURLA, G. et al. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 42, n. 2, p. 89-94, 1992.
- CABANA, H. et al. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, v. 67, p. 770-778, 2007.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, M. L. de. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana de açúcar.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CASTOLDI, R. et al. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: Study of degradation patterns and saccharification kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240-246, 2014.

CASTOLDI, R. et al. Liquid nitrogen pretreatment of eucalyptus sawdust and rice hull for enhanced enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 648-655, 2017.

CASTRO, R. C. de. A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CHEN, H. et al. Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 772-778, 2010.

CHEN, Q. et al. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 186-192, 2012.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo.** Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar.** Safra 2017/18, v. 4, n. 1 – Brasília, 2017a.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos.** Safra 2017/18, v.5, n. 5 – Brasília, 2017b.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A cultura do arroz.** Brasília, 2015.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade.** São Paulo: Blucher, 2010.

CUNHA, G. P. da. **Identificação e análise de empresas internacionais produtoras de etanol 2G.** Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia de

Biocombustíveis e Petroquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidade de *Monascus purpureus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DIAS, A. A. et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6045-50, 2010.

DING, Z. et al. Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 121-129, 2013.

ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353-364, 2002.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Metalresponsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Great Britain Microbiology**, v. 149, p. 2155-2162, 2003.

FERRAZ, F de. O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FILLAT, U. et al. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: a review. **Fermentation**, v. 3, n. 17, 2017.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 529-536, 2002.

GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 312-319, 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

GUTIÉRREZ, A. et al. Demonstration of laccase-based removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 114-122, 2012.

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

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Key world energy statistics**. Disponível em: < <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf> > Acesso em: 02/02/2018.

JEYA, M. et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5155-5161, 2009.

JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 869-883, 2015.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 247-253, 2006.

KIRK, T.; TIEN, M.; FAISON, B. D. Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Advances**, v. 2, n. 2, p. 183-199, 1984.

KRISHNAN, M. et al. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 525-541, 2000.

LORENZO, M. et al. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 109-13, 2002.

MACHADO, A. S. M.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 17-22, 2017.

MACIEL, G. M.; BRACHT, A.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Fundamentals, diversity and application of white-rot fungi. Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. **Nova Science Publishers**, p. 409-458.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-**

**de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTINEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

MIRANDA, I. C de. **Aproveitamento energético a partir de resíduos de biomassa: bagaço e palha de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MOILANEN, U. et al. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 6-7, p. 492-498, 2011.

MOILANEN, U. et al. Mechanisms of laccase-mediator treatments improving the enzymatic hydrolysis of pre-treated spruce. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 177, 2014.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 4, p. 327-330, 2004.

MONIRUZZAMAN, M. Alcohol fermentation of enzymatic hydrolysate of exploded rice straw by *Pichia stipitis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 646-648, 1995.

MORAIS, P. A de. **Produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido por espécimes do gênero *Trichoderma* para sacarificação do bagaço de cana de açúcar tratado com micro-ondas.** Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

MUKHOPADHYAY, M. et al. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3584-3591, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

NILADEVI, K. N. Ligninolytic Enzymes. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, p. 397-414, 2009.

NOVACANA. **GranBio, um ano depois: a evolução da primeira usina de etanol celulósico do Brasil.** Disponível em: < <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/granbio-ano-evolucao-primeira-usina-etanol-celulosico-brasil-101115//?tmpl=component&print=1> > Acesso em: 30/05/2018.

NUNES, R. M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

OECD/FAO (2016). **OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i5778e.pdf> > Acesso em 02/02/2018.

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

OLIVEIRA, F. M. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uréia**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.

PAES, B. G. **Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2015.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2006.

PANDEY, K. K.; PITMAN, A. J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 3, p. 151-160, 2003.

PINTO, P. A da. C. S. B. **Deslenhificação de palha de trigo por fungos da podridão branca: Inibição da lacase de *Fomes fomentarius* pelo íon Cl<sup>-</sup>**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrária) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2010.

PIRES, O. A. B. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos de fungos da podridão branca como pré-tratamento para sacarificação de resíduos agrícolas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

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

RAJAK, R. C.; BANERJEE, R. Enzyme mediated biomass pretreatment and hydrolysis: A biotechnological venture towards bioethanol production. **RSC Advances**, v. 6, n. 66, p. 61301-61311, 2016.

RAMBO, M. K. D. **Aproveitamento da casca de arroz para produção de xilitol e sílica xerogel**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RICO, A. et al. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 6, 2014.

RENCORET, J. et al. Laccase-mediator pretreatment of wheat straw degrades lignin and improves saccharification. **BioEnergy Research**, v. 9, n. 3, p. 917-930, 2016.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **World Fuel Ethanol Production 2016**. Disponível em: < <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643> > Acesso em: 02/02/2018.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 816-822, 2005.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, 2012.

SANTOS, D da. S dos. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. R. A dos.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4748-4750, 2011.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SHI, J. et al. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 1, p. 88-96, 2009.

SILVA, B. N. S da. **Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de tecidos de árvores vivas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVA, E. J da. **Contribuição para utilização de cinza de casca de arroz na construção civil.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2009a.

SILVA, J. J. et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, V. F. N da. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2009b.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SONGULASHVILI, G. et al. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 57-61, 2007.

SOUZA, A. C de. **Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOUZA, J. T de. **Aproveitamento da casca de arroz para fabricação de chapas aglomeradas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SOUZA, M. F. et al. Rice hull-derived silica: applications in portland cement and mullite whiskers. **Materials Research**, v. 3, n. 2, p. 25-30, 2000.

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

TAHERZADE, M. J.; KARIMI, K. **Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects.** *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, p. 287-311, 2011.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744-4753, 2010.

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

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

TYCHANOWICZ, G. K. et al. Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 699-704, 2006.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Indústria química avança em tecnologias enzimáticas para produção de etanol 2G**. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/noticia/3102159920315624493/industria-quimica-avanca-em-tecnologias-enzimaticas-para-producao-de-etanol-2g/> > Acesso em: 26/09/2016.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-193, 2010.

WAN, C.; LI, Y. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 31-36, 2012.

WANDERLEY, M. C de. A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processos SHF**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

WANG, W. et al. Investigating lignin and hemicellulose in white rot fungus-pretreated wood that affect enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 381-385, 2013.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.

WEN, X. et al. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. **Chemosphere**, v. 75, p. 1003-1007, 2009.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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

WORLD ENERGY COUNCIL. **World energy resources 2016**. Disponível em: < <https://www.worldenergy.org/wp-content/uploads/2016/10/World-Energy-Resources-Full-report-2016.10.03.pdf> > Acesso em: 02/02/2018.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p.54-60, 2011.

XU, F. et al. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801-809, 2013.

YOUNES, S. B.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1033-1042, 2007.

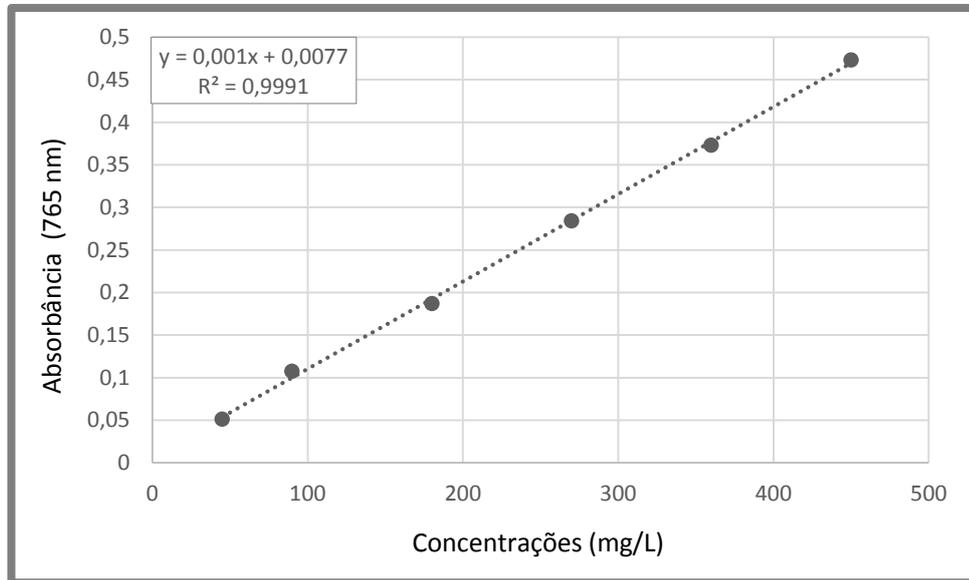
YU, J. et al. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 903-908, 2009.

ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, n. 0, p. 38-45, 2014.

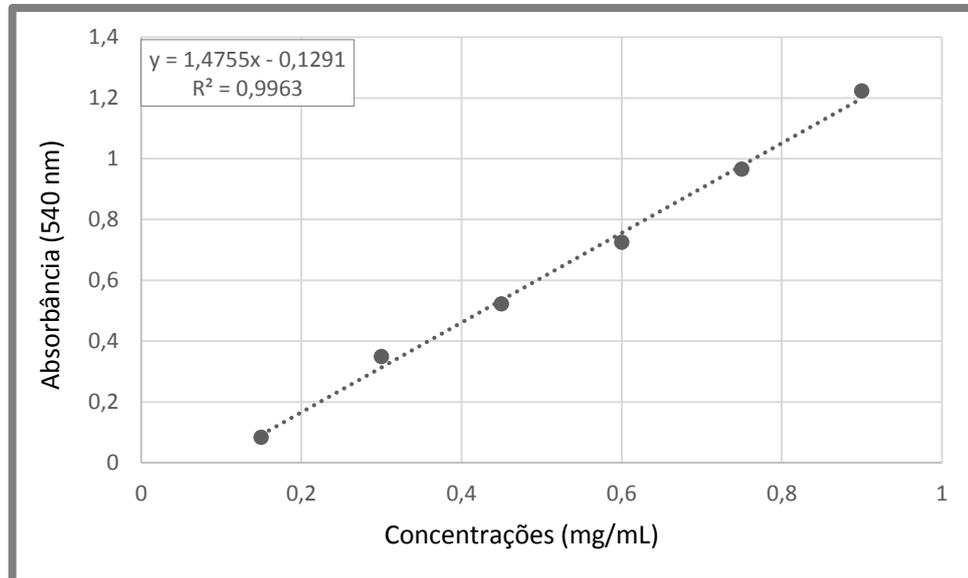
ZHANG, X. et al. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 3, p. 159-164, 2007.

ZOUARI, N. et al. Production of deltaendotoxin by several *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various entomocidal activities towards Lepidoptera and Diptera in gruel and fish-meal media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 411-418, 2002.

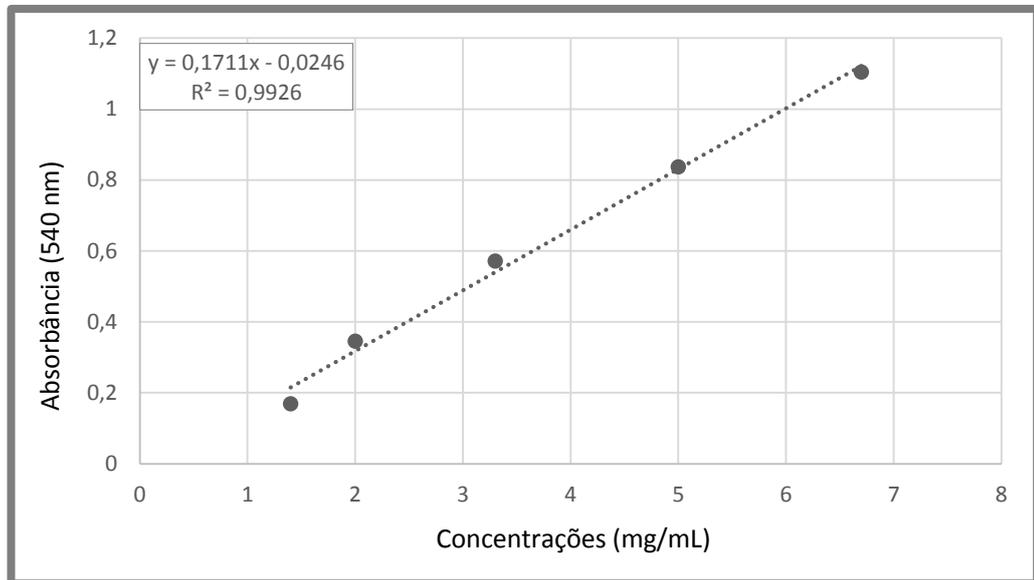
**APÊNDICE A – Curva padrão de fenólicos totais medindo ácido gálico de 50 a 450 mg/L, através da metodologia por reagente de Folin**



**APÊNDICE B – Primeira curva padrão de açúcares redutores medindo glicose de 0,15 a 0,90 mg/mL, através da metodologia por ácido 3,5 dinitrossalicílico**



**APÊNDICE C – Segunda curva padrão de açúcares redutores medindo glicose de 1 a 7 mg/mL, através da metodologia por ácido 3,5 dinitrossalicílico**



## ANEXO A – Curva padrão de etanol cedida pelo Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais



**LATAM**<sup>®</sup>

Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais

---

AMOSTRA	CODIGO	CODIGO LATAM	AREA
1	F001	A-002818	2756164
2	F002	A-002718	4818333
3	F003	A-002818	7232415
4	F032	A-002918	7434811
5	F061	A-003018	8829071
6	F062	A-003118	1220648
7	F121	A-003218	2785842
8	F122	A-003318	2806088
9	F241	A-003418	25047836
10	F242	A-003518	30717140
11	F281	A-003618	2498728
12	F282	A-003718	29393910
13	F361	A-003818	25213764
14	F362	A-003918	539259
15	S001	A-004018	6399259
16	S002	A-004118	6696518
17	S031	A-004218	13051919
18	S032	A-004318	9890250
19	S061	A-004418	20922492
20	S062	A-004518	19657624
21	S122	A-004618	2885078
22	S241	A-004718	24985674
23	S242	A-004818	25854578
24	S281	A-004918	24243842
25	S282	A-005018	23787122
26	S361	A-005118	27845742
27	S362	A-005218	27325090

CONCENTRAÇÃO	AREA
2	5695
5	10356
10	19356
25	52694
50	87194
100	152701
250	530723
500	918588
1000	1671305
5000	7895239
10000	14569836
20000	2969785

mg/L  
1  
0,76237

µg/L  
1000  
762,37

1,1364

1mg/L = 1000 µg/L

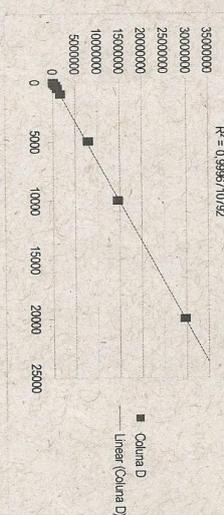
$f(x) = y$   
 $y = A \cdot Bx$

A=	80279,400923	80279,400923	automatico
B=	1477,2107409	1477,21074086	
R²=	0,9995728826	0,9995728826	

CONCENTRAÇÃO

X=	Y=
1811,4	1477,21074086
3207,4	
4841,6	
4978,7	
5922,5	
8208,8	
18804,6	
18841,0	
17578,8	
20776,6	
16807,7	
19843,9	
17014,1	
15018,5	
4277,6	
4478,9	
6640,9	
8781,2	
14109,2	
12346,7	
1905,5	
16859,3	
17447,9	
16357,4	
16048,4	
18795,9	
18443,4	



$f(x) = 1475,7452949752x + 101176,88944986$   
 $R^2 = 0,999570792$

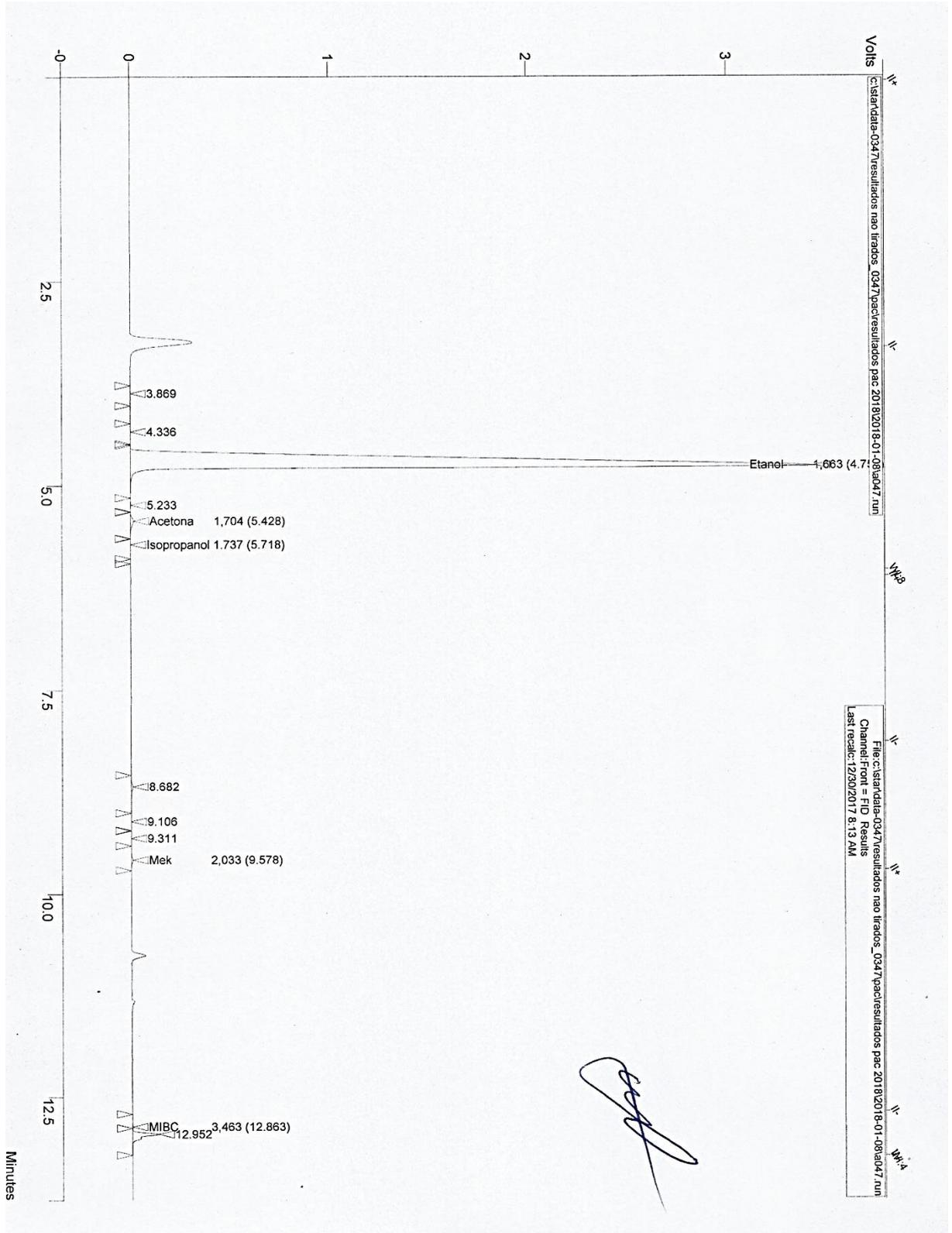
  

**LATAM - Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais Ltda.**  
 Av. Senador Salgado Filho, 3207 - Uberaba - CEP 81570-000 - Curitiba - Paraná  
 CNPJ: 01.509.200/0001-37      Inscrição Municipal: 04 02 475.535-5  
 Fone/Fax (41) 3014-3953 - www.lablatam.com.br - e-mail: lablatam@lablatam.com.br



F-089\_Rev. 04

### ANEXO B – Perfil cromatográfico para a amostra do período de 24 horas da fermentação pela levedura da Sigma-Aldrich



### ANEXO C – Perfil cromatográfico para a amostra do período de 24 horas da fermentação pela levedura da Fleischmann

