

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA

BRUNO CÉSAR DA SILVA COELHO

PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
POSTERIOR ASSOCIAÇÃO AO TRATAMENTO ÁCIDO OU HIDROTÉRMICO
PARA A OBTENÇÃO DE GLICOSE

Rio de Janeiro

2019

BRUNO CÉSAR DA SILVA COELHO

**PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
POSTERIOR ASSOCIAÇÃO AO TRATAMENTO ÁCIDO OU
HIDROTÉRMICO PARA A OBTENÇÃO DE GLICOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientação:

Dr^a Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Dr^a Ayla Sant'Ana da Silva

Rio de Janeiro

2019

CIP - Catalogação na Publicação

C672p Coelho, Bruno César da Silva
PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR
E POSTERIOR ASSOCIAÇÃO AO TRATAMENTO ÁCIDO OU
HIDROTÉRMICO PARA A OBTENÇÃO DE GLICOSE / Bruno
César da Silva Coelho. -- Rio de Janeiro, 2019.
84 f.

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão.
Coorientadora: Ayla Sant'Ana da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, 2019.

1. Palha de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento
biológico. 3. *Pleurotus ostreatus*. 4. *Phanerochaete*
chrysosporium. 5. *Gloeophyllum trabeum*. I. Ferreira
Leitão, Viridiana Santana, orient. II. da Silva,
Ayla Sant'Ana, coorient. III. Título.

BRUNO CÉSAR DA SILVA COELHO

PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
POSTERIOR ASSOCIAÇÃO AO TRATAMENTO ÁCIDO OU HIDROTÉRMICO
PARA A OBTENÇÃO DE GLICOSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química
da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ,
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências (Bioquímica).

Aprovada em 22 de março de 2019



Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT



Ayla Sant'Ana da Silva, D.Sc., INT



Maria Cristina Diez Jerez, D.Sc., UFRO



Fabio Cesar Souza Nogueira, D.Sc., UFRJ



Andrew Macrae, D.Sc., UFRJ

Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a toda minha família: meu pai Paulo César, minha mãe Maria de Lourdes, meu irmão César Paulo, meus tios, tias, padrinhos, prima e primo. Muito obrigado por estarem ao meu lado durante toda a minha vida, me dando amor, os mais valiosos ensinamentos e por apoiarem minhas escolhas. Vocês são os grandes responsáveis por quem me tornei e por todas as minhas conquistas. Independente de para onde a vida me levar, estarei sempre com todos vocês!

Aos amigos que fiz durante a faculdade: Ana Flávia, Maria Soares, Lucas Cruz, Lucas do Nascimento e Joana Feital, por todos os momentos vividos, sejam eles os felizes enquanto bebíamos e conversávamos ou os tristes enquanto bebíamos e conversávamos, pois o importante é sempre estarmos juntos. Um agradecimento especial ao Lucas Cruz e a sua esposa Luciana que, mesmo com “pouco tempo” me conhecendo, me confiaram sua filha Camila como afilhada. Espero continuar com a amizade de todos vocês nessa e em outras vidas. A vida fica mais leve ao lado de vocês. Talvez eu não agradeça e diga o quanto são importantes para mim, mas sabem que estou tentando melhorar esse meu lado e que demonstro todo esse amor e carinho de outras maneiras.

A todos do Laboratório de Biocatálise (LABIC), aos que passaram menos tempo e aos que tive contato por um período maior, vocês fizeram do dia-a-dia do trabalho um momento prazeroso e descontraído. Esses quatro anos em que trabalhei com vocês foram de muito aprendizado, tanto profissional como pessoal. Agradecimento especial à Mariana Faber, pelas conversas e conselhos para apresentações, ao Leonardo Belo pelas análises de cromatografia e por depois ter me ensinado a operar o HPLC e continuar me salvando quando necessário, à Aline Ramalho, ao Javier Molina e ao Alessandro Garritano, por todas as conversas e experiências trocadas, e aos que compõem atualmente a equipe do laboratório, todos vocês, sem exceção, fizeram desses dias momentos maravilhosos. Irei carregar cada um no coração com muito carinho. Obrigado por tudo.

À Adriana Pequeno e ao Davi Marconi, que foram meus alunos de iniciação científica, obrigado pela ajuda nos experimentos, esse trabalho tem um pouco de cada um, espero ter contribuído para o crescimento de vocês assim como vocês contribuíram com o meu. Obrigado pelas conversas, pelas trocas de ensinamentos, experiência e risadas durante esse tempo, sempre que precisarem podem contar comigo. Continuem

assim que vocês dois tem um futuro promissor e maravilhoso a conquistarem, tenho certeza que serão muito felizes.

Um agradecimento mais que especial à Ingrid Miguez, uma das responsáveis por me receber e ensinar tudo que aprendi e fiz no LABIC. Obrigado por dividir o calor da nossa sala sem ar condicionado durante esse tempo, pelas nossas conversas sobre a vida pessoal e sobre o dia-a-dia do laboratório, pelas ajudas, besteiras faladas, risadas e a gaveta de comida dividida. Um agradecimento super especial à Taísa Nogueira por todo o ensinamento me passado no laboratório, além de toda a amizade que fomos construindo com o passar desse tempo. Obrigado por todos os sambas, cervejas e conversas trocadas, que me fizeram crescer e tornaram meus dias melhores. E desculpa pelos momentos de perturbação, faço isso por gostar e me sentir bem ao lado de vocês. Vocês duas são maravilhosas e espero que nossa amizade continue crescendo, estão no meu coração.

À professora Elba e a todos do Laboratório Bioetanol, Lucas, Rodrigo, em especial ao Raul e Ricardo pelas as ajudas com os pré-tratamentos hidrotérmicos realizados.

Às minhas orientadoras, Dr^a Ayla Sant'Ana e Dr^a Viridiana Ferreira-Leitão. Muito obrigado pelas oportunidades que me deram, pelos esforços feitos para conseguirem bolsa para eu continuar no laboratório e pelos ensinamentos profissionais e pessoais passados. Desculpa por todos os relatórios entregues em cima da hora para serem corrigidos. Mas podem ter certeza que nesses anos eu aprendi mais do que consigo contar e sou extremamente grato, mais do que consigo expressar. Vocês são as grandes responsáveis pelo grande profissional que irei me tornar e tem grande contribuição na pessoa que estou me tornando. Irei carregar vocês no meu coração, muito obrigado!

À Capes pela bolsa de mestrado, ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica e à FAPERJ pelo financiamento do projeto junto a Universidade de La Frontera-Chile.

RESUMO

As principais etapas para a produção de etanol de segunda geração são: pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, fermentação dos açúcares a etanol e destilação. O pré-tratamento tem como objetivo aumentar a disponibilidade e a digestibilidade enzimática da celulose, acarretando em uma maior obtenção de glicose. Sua efetividade pode ser analisada através da alteração da composição química da biomassa pré-tratada e do aumento da concentração de glicose obtida durante a hidrólise enzimática. Os pré-tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH), já utilizados industrialmente, têm como finalidade hidrolisar e solubilizar a fração hemicelulósica, enquanto o pré-tratamento biológico (PTB) tem como objetivo remover a lignina da biomassa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o PTA, PTH e PTB da palha de cana-de-açúcar para posterior associação entre os mesmos. A associação tem como finalidade promover a remoção combinada da hemicelulose e lignina, aumentando a disponibilidade da celulose na amostra pré-tratada. Nas condições realizadas no presente trabalho, foi observado que entre o PTA e o PTH, o PTH foi mais eficiente em aumentar a digestibilidade enzimática da celulose. Ao avaliarmos amostras de palha corta e moída, resultados comparativos foram obtidos, tanto em relação à composição química das amostras pré-tratadas, quanto em relação à digestibilidade enzimática. Com isso, todos os experimentos posteriores foram realizados com a palha cortada e o PTH foi selecionado para associação com o PTB. Em seguida, sete linhagens fúngicas foram avaliadas para a promoção do PTB, através da quantificação da perda mássica proporcionada por cada fungo, uma vez que a perda mássica pode ser relacionada à remoção de componentes estruturais da parede celular. Dentre os fungos avaliados, as linhagens *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium*, e *Pleurotus ostreatus* foram selecionados por terem proporcionado perda mássica de 26%; 24,8% e 13,3%, respectivamente. Durante o PTB, *P. chrysosporium* e *G. trabeum* apresentaram maior seletividade para remoção dos polissacarídeos do que para a lignina, enquanto que *P. ostreatus* apresentou elevada seletividade para remoção da lignina, em relação à celulose. Além disso, a amostra tratada com *P. ostreatus* resultou em maior rendimento de glicose na hidrólise enzimática. Análises de microscopia confocal de fluorescência corroboraram os resultados obtidos, pois foi possível observar o aumento dos poros e a maior disponibilidade de celulose nas amostras tratadas com *P. ostreatus*. Sendo assim, *P. ostreatus* foi selecionado a ser associado ao PTH (PTBH). Ao realizar a associação do PTB seguido do PTH (170 °C

por 40 min), foi observado que a remoção da hemicelulose foi potencializada após a remoção da lignina proporcionada pelo PTB. Após constatar o benefício da associação, um conjunto de experimentos foi avaliado para determinar se, através da associação PTBH, seria possível diminuir a severidade da etapa de PTH, através do uso de condições mais brandas de tempo e temperatura. Com isso, ao realizar o PTH a 160 °C por 40 min, após a realização do PTB, foi possível obter um rendimento em glicose equivalente a 78%, sendo superior aos rendimentos obtidos com o PTH realizado isoladamente por 40 min a 170°C e 160°C, que resultaram em rendimento de 68,3% e 65,7%, respectivamente. Assim, realizar a associação do PTB seguido do PTH se mostrou uma alternativa para a redução da severidade do PTH e para aumentar o rendimento de conversão de celulose em glicose.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica, Pré-tratamento biológico, Palha de cana-de-açúcar, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Gloeophyllum trabeum*.

ABSTRACT

The main steps for the production of second generation ethanol are: pretreatment of lignocellulosic biomass, enzymatic hydrolysis of pretreated biomass, fermentation of sugars to ethanol and distillation. The pretreatment aims to increase the availability and enzymatic digestibility of the cellulose, leading to higher glucose yields. Its effectiveness can be analyzed by modifications on the chemical composition of the pretreated biomass and the increase on glucose yields in the enzymatic hydrolysis. The acid (APT) and hydrothermal (HPT) treatments, already industrially used, aim to hydrolyze and solubilize the hemicellulosic fraction, while the biological pretreatment (BPT) goal is to remove the lignin from the biomass. This study had as objective to evaluate the APT, HPT and BPT of the sugarcane straw for their subsequent association. The association aims to promote the combined removal of hemicellulose and lignin, increasing the availability of cellulose in the pretreated sample. Under the conditions performed in this study, between APT and HPT, the HPT was more efficient in increasing the enzymatic digestibility of cellulose. When evaluating samples of straw cut and milled, comparative results were obtained for the chemical composition and enzymatic digestibility of the pretreated samples. Thus, all subsequent experiments were performed with cut samples and HPT was selected for association with the BPT. Then, seven fungal strains were evaluated for the promotion of BPT by quantifying the mass loss provided by each fungus, as this parameter can be related to the removal of structural components of the cell wall. Among the evaluated fungi, the strains *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium*, and *Pleurotus ostreatus* were selected because they provided a mass loss of 26%; 24.8% and 13.3%, respectively. During the BPT, *P. chrysosporium* and *G. trabeum* showed higher selectivity for the removal of polysaccharides than for lignin, while *P. ostreatus* showed high selectivity for lignin removal, in comparison to cellulose. In addition, the sample treated with *P. ostreatus* resulted in a higher glucose yield in the enzymatic hydrolysis. Analysis of confocal fluorescence microscopy corroborated the results obtained, as it was possible to observe an increase of the pores and the greater availability of cellulose in samples treated with *P. ostreatus*. Thus, *P. ostreatus* was selected to be associated with HPT (BHPT). When performing the association of BPT followed by HPT (170 °C for 40 min), the removal of hemicellulose was potentiated after removal of the lignin provided by BPT. After establishing the benefit of the association, a set of experiments was conducted to evaluate if, through the association BHPT, it would be possible to

decrease the severity of the HPT, through the use of milder conditions of time and temperature. Thus, when HPT was performed at 160 °C for 40 min after BPT, a glucose yield equivalent to 78% was obtained, being higher than the yields obtained with HPT carried out alone for 40 min at 170 °C and 160 °C, which resulted in yield of 68.3% and 65.7%, respectively. Thus, the association of BPT followed by HPT was shown to be an alternative for the reduction of PTH severity and to increase the yield of cellulose to glucose conversion.

Keywords: Lignocellulosic biomass, Biological pretreatment, Sugarcane straw, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Gloeophyllum trabeum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modificações proporcionadas na biomassa, vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos mais estudados.....	31
Tabela 2: Características dos tipos de fungo degradadores de madeira.	33
Tabela 3: Fungos aplicados no pré-tratamento biológico de diferentes biomassas.....	34
Tabela 4: Composição do meio de cultura líquido Gorbatova com modificações.....	40
Tabela 5: Composição química de dois diferentes lotes de palha de cana-de-açúcar in natura utilizados no presente trabalho.	48
Tabela 6: Composição química para as amostras in natura e após os tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH) da palha de cana-de-açúcar para as amostras cortadas (C) e moídas (M).	51
Tabela 7: Perda de massa proporcionada na palha de cana-de-açúcar pelos fungos <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i> , <i>G. trabeum</i> , <i>P. estuarinu</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>W. dispersa</i> após 20 dias de pré-tratamento biológico.	57
Tabela 8: Composição química para as amostras pré-tratadas, a perda de massa e o percentual de remoção dos componentes proporcionada pelos fungos <i>Gloeophyllum trabeum</i> (P.Gt), <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (P.Pc) e <i>Pleurotus ostreatus</i> (P.Po) após o PTB e a seletividade relativa de remoção apresentada pelos fungos.	59
Tabela 9: Atividade das enzimas celulolíticas (FPase e β -glicosidase) e ligninolíticas (Lacase e Manganês Peroxidase (MnP)) secretadas pelos fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Gloeophyllum trabeum</i> após 20 dias de tratamento biológico.	64
Tabela 10: Composição química para as amostras após o tratamento biológico com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> (PTB), com o tratamento hidrotérmico (PTH) e a associação do tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico (PTBH).	67
Tabela 11: Composição química para as amostras após o tratamento hidrotérmico (PTH) nas condições de 160 °C/10 minutos, 160 °C/40 minutos, 170 °C/40 minutos e a associação do tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico (PTBH).	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica, destacando a parede celular vegetal composta por celulose, hemicelulose e lignina.	19
Figura 2: Representação da molécula de celulose.....	20
Figura 3: Esquema clássico demonstrando a hidrólise enzimática da celulose.	21
Figura 4: Esquema mais atualizado demonstrando a hidrólise enzimática da celulose, a ação em conjunto das enzimas celulolíticas e das oxidativas.....	22
Figura 5: Monômeros que podem compor a hemicelulose.	22
Figura 6: Estruturas dos precursores da lignina. A) Alcoóis precursores e B) Unidades estruturais da lignina.....	24
Figura 7: Mecanismo de ação da enzima ligninolítica lacase com o auxílio do mediador	25
Figura 8: Mecanismo de ação das enzimas ligninolíticas lignina peroxidase (A) e manganês peroxidase (B).....	26
Figura 9: Ilustração da cana-de-açúcar evidenciando suas estruturas: colmo, folhas secas, folhas verdes e ponteiros.....	27
Figura 10: Esquema demonstrando os experimentos realizados no presente trabalho. PTA, pré-tratamento ácido; PTH, pré-tratamento hidrotérmico; PTB, pré-tratamento biológico; PTBH, associação do pré-tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico.	38
Figura 11: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar in natura provenientes dos lotes 1 e 2, e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲).	49
Figura 12: Amostra de palha de cana-de-açúcar in natura nas duas granulometrias analisadas, A) cortada (aproximadamente 2 cm) e B) moída (850 - 180 µm)	51
Figura 13: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar in natura e após os tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH), para as amostras cortadas (C) e moídas (M), e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲). *Concentrações de glicose estatisticamente iguais ($p > 0,05$).	53
Figura 14: Amostras de palha de cana-de-açúcar in natura e após o PTH, cortadas e moídas. A) in natura cortada; B) in natura moída; C) PTH cortado; D) PTH moído. ...	54
Figura 15: Crescimento dos fungos em placa de Petri contendo o meio Agar batata após 7 dias de incubação.	56

Figura 16: Esquema determinando a composição química das biomassas pré-tratadas com os fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Gloeophyllum trabeum</i>	60
Figura 17: Microscopia confocal de fluorescência da amostra de palha de cana-de-açúcar in natura (A) e após os PTB com os fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (B), <i>Pleurotus ostreatus</i> (C) e <i>Gloeophyllum trabeum</i> (D).....	63
Figura 18: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar in natura dos lotes 1 e 2 e após o PTB com os fungos <i>Gloeophyllum trabeum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i> , e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲).....	66
Figura 19: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática das palhas de cana-de-açúcar “in natura 1” e após o tratamento biológico com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> (PTB), com o tratamento hidrotérmico (PTH) (170 °C por 40 minutos) e a associação biológico seguido do hidrotérmico (PTBH), além do rendimento de conversão de celulose em glicose (▲).* liberações de glicose estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).....	68
Figura 20: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática das palhas de cana-de-açúcar o tratamento hidrotérmico em diferentes condições (PTH) e a associação biológico seguido do hidrotérmico (PTBH), e o fator de severidade combinada (▲). ^{a, b} Concentrações de glicose estatisticamente iguais ($p > 0,05$).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

LPMO - *Lytic polysaccharide mono-oxygenases*

SUCRE - *Sugarcane Renewable Electricity*

CNPq - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

PROALCOOL - Programa Nacional do Alcool

ABTS - 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina

FPU - Filter paper unit

DNS - Ácido Dianitrosalicílico

NREL - *National Renewable Energy Laboratory*

PRA - Padrão de recuperação de açúcares

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

PTA - Pré-tratamento ácido

PTB - Pré-tratamento biológico

PTH - Pré-tratamento hidrotérmico

PTBH - Associação do tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico

C – Amostra cortada

M – Amostra moída

Cel – Celulose

Hem – Hemicelulose

Lig - Lignina

SRel - Seletividade relativa

P.Gl - Palha pré-tratada com o fungo *Gloeophyllum trabeum*.

P.Pc - Palha pré-tratada com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

P.Po - Palha pré-tratada com o fungo *Pleurotus ostreatus*

MnP - Manganês Peroxidase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	19
2.1.1.	CELULOSE	20
2.1.1.1.	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO	20
2.1.1.2.	HIDRÓLISE DA CELULOSE	20
2.1.2.	HEMICELULOSE	22
2.1.2.1.	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO	22
2.1.2.2.	HIDRÓLISE DA HEMICELULOSE	23
2.1.3.	LIGNINA	23
2.1.3.1.	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO	23
2.1.3.2.	OXIDAÇÃO DA LIGNINA	25
2.2.	CANA-DE-AÇÚCAR	27
2.3.	ETANOL LIGNOCELULÓSICO OU DE SEGUNDA GERAÇÃO	28
2.4.	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR	29
2.4.1.	PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	32
3.	JUSTIFICATIVA	35
4.	OBJETIVOS	36
4.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1.	PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS E ETAPAS EXPERIMENTAIS DO TRABALHO	37
5.2.	PRÉ-TRATAMENTOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR	38
5.2.1.	PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO	38
5.2.2.	PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	39
5.2.3.	PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	39
5.2.3.1.	PERDA DE MASSA MEDIADA PELA AÇÃO DOS FUNGOS DURANTE O TRATAMENTO BIOLÓGICO	40

5.2.3.2.	ENZIMAS EXTRACELULARES SECRETADAS PELOS FUNGOS DURANTE O TRATAMENTO BIOLÓGICO	41
5.2.3.2.1.	LIGNINOLÍTICAS	41
5.2.3.2.1.1.	LACASE	41
5.2.3.2.1.2.	MANGANÊS PEROXIDASE.....	41
5.2.3.2.2.	CELULOLÍTICAS.....	42
5.2.3.2.2.1.	CELULASES TOTAIS (FPASE)	42
5.2.3.2.2.2.	B-GLICOSIDASE	43
5.2.4.	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS BIOLÓGICO E HIDROTÉRMICO ..	43
5.3.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i> E PRÉ-TRATADA	43
5.3.1.	DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	44
5.3.2.	DETERMINAÇÃO DOS EXTRATIVOS NA BIOMASSA	44
5.3.3.	DETERMINAÇÃO DA LIGNINA E CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS	44
5.3.3.1.	HIDRÓLISE ÁCIDA COM H ₂ SO ₄ 72%	44
5.3.3.2.	DETERMINAÇÃO DA LIGNINA SOLÚVEL EM ÁCIDO.....	45
5.3.3.3.	DETERMINAÇÃO DA LIGNINA E CINZAS INSOLÚVEL EM ÁCIDO.....	45
5.4.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i> E PRÉ-TRATADA.....	46
5.5.	QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	46
5.6.	MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA LIBERAÇÃO DE GLICOSE DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i> ..	48
6.2.	AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDO (PTA), HIDROTÉRMICO (PTH) E BIOLÓGICO (PTB) DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i>	50
6.2.1.	PTA E PTH: SELEÇÃO DO TRATAMENTO MAIS EFICIENTE.....	50
6.2.2.	PTB DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i>	55
6.2.2.1.	SELEÇÃO DE POTENCIAIS FUNGOS A SEREM APLICADOS NO PTB.....	55
6.2.2.2.	PTB COM OS FUNGOS SELECIONADOS	58

6.3.	ASSOCIAÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO COM O TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	67
6.3.1.	AVALIAÇÃO DO PTH EM DIFERENTES CONDIÇÕES, DA ASSOCIAÇÃO DO PTB COM PTH E O FATOR DE SEVERIDADE COMBINADA	69
7.	CONCLUSÕES	73
8.	PERSPECTIVAS.....	75
9.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	76

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol celulósico é uma das tecnologias mais pesquisadas atualmente visando o aproveitamento da biomassa da cana-de-açúcar. A rota de transformação da biomassa em etanol é constituída das seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, fermentação dos açúcares a etanol e destilação do produto final. Entre os obstáculos tecno-econômicos para a implantação da tecnologia está à etapa de pré-tratamento, que é responsável por até 33% dos custos de processamento (YANG; WYMAN, 2008).

O pré-tratamento é uma etapa crucial porque os materiais lignocelulósicos nativos são altamente resistentes à hidrólise enzimática. Deste modo, para que ocorra uma conversão eficiente da biomassa em açúcares, é importante que as propriedades físico-químicas sejam modificadas através da etapa de pré-tratamento, já que a hidrólise de substratos nativos leva a menos de 20% de conversão da celulose em glicose (HIMMEL et al., 2007a).

Nos últimos 30 anos, diversos métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, incluindo processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (ALVIRA et al., 2010). Durante a conversão de biomassa lignocelulósica, a etapa de pré-tratamento é o passo considerado limitante, já que direciona os rendimentos de conversão e os custos dos produtos finais. Quando se considera pré-tratamentos que visam à remoção da fração de lignina, métodos físico-químicos convencionais, como a explosão com amônia, requer grande quantidade de energia e gera efluentes tóxicos. Portanto, o pré-tratamento biológico de biomassa é considerado uma alternativa interessante quando objetiva-se a remoção de lignina, com menor impacto ambiental e de baixo custo (WAN; LI, 2012).

O efeito principal de pré-tratamentos biológicos é a degradação da lignina por micro-organismos, através da ação de enzimas extracelulares. As principais vantagens deste processo são o baixo custo de capital, pouca demanda de energia, nenhum requerimento de produtos químicos, menor formação de inibidores de hidrólise e fermentação e condições de operação ambientais amenas (ALVIRA et al., 2010). No entanto, os processos biológicos exigem um tempo de residência longo, quando

comparados com outras técnicas de pré-tratamento, além de resultarem em biomassas pré-tratadas que possuem baixas taxas de hidrólise enzimática.

O pré-tratamento hidrotérmico, um dos métodos de pré-tratamento mais pesquisados, utiliza temperaturas entre 150-240 °C, sendo realizado em suspensão aquosa em reator pressurizado, com tempos de retenção de 10-50 minutos. Já o uso de ácidos inorgânicos para o pré-tratamento da biomassa é conduzido com ácido sulfúrico ou clorídrico, concentrado ou diluído, em temperaturas de 60-220 °C e pressões de até 10 atm. Os dois pré-tratamentos tem como objetivo a remoção ou redução da hemicelulose (BENSAH; MENSAH, 2018; KUCHARSKA et al., 2018; ROMERO et al., 2010) e ambos são atualmente os processos implementados em plantas piloto e comerciais de produção de etanol de segunda geração (LYND et al., 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar dois métodos de pré-tratamento convencionais, o ácido e o hidrotérmico, e a associação destes com o tratamento biológico mediado por fungos. Os pré-tratamentos ácido e hidrotérmico são promissores no contexto de uma biorrefinaria, pois levam a separação da fração hemicelulósica em uma corrente líquida, enquanto a lignina e a celulose conservam-se no resíduo sólido, o que permite uma abordagem diversificada. Já o pré-tratamento biológico pode levar ao consumo parcial das frações, porém sua associação com pré-tratamentos ácidos e hidrotérmicos é uma abordagem promissora. Essa estratégia tem como finalidade realizar uma etapa de pré-tratamento biológico mais curta, que conseqüentemente levará a uma menor degradação biológica da lignina, porém suficiente para facilitar a remoção da hemicelulose pelos tratamentos ácidos ou hidrotérmicos e possibilitar sua condução em condições mais amenas. Dessa forma, a proposta do presente estudo foi a avaliação comparativa entre os pré-tratamentos e suas associações.

A biomassa em que será realizado os pré-tratamentos será a palha de cana-de-açúcar, pois após a lei que condena a prática da queima das plantações de cana-de-açúcar como método facilitador da colheita, a disponibilidade dessa biomassa aumentou. Deste modo, crescem estudos visando o aproveitamento desse resíduo agroindustrial. Atualmente, a palha está sendo deixada nas plantações com o objetivo de recompor os nutrientes do solo, além de ser utilizada para cogeração de energia. Estudos relatam aspectos negativos em grandes quantidades de palha presentes no solo das plantações (BORDONAL et al., 2018; CARVALHO et al., 2017). Com isso, a

disponibilidade se torna ainda maior e um método visando seu aproveitamento se faz necessário.

Este documento está dividido em tópicos para facilitar o entendimento do assunto abordado. Ele se inicia com uma revisão bibliográfica, onde serão abordados temas necessários ao entendimento dos resultados que serão apresentados. Em seguida, é apresentada toda a metodologia dos experimentos realizados no presente trabalho. Depois, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Será discutida a escolha entre o pré-tratamento ácido e hidrotérmico; a seleção do fungo com potencial a ser aplicado no tratamento biológico; os resultados obtidos após a realização do pré-tratamento biológico; a associação do tratamento biológico com o tratamento hidrotérmico e a possibilidade de realizá-lo em diferentes condições após a associação. Por último, serão apresentadas as conclusões obtidas a partir dos experimentos realizados e as perspectivas para a continuação do trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As biomassas lignocelulósicas constituem a maior fonte de carboidratos naturais do mundo, apresentam grande disponibilidade na natureza e são um recurso renovável. Por esses motivos, cresce o número de estudos visando o aproveitamento total do seu potencial energético (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Existem diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, entre elas: plantas, madeiras, resíduos municipais sólidos e resíduos agroindustriais. Neste último, podemos citar como exemplo a palha de trigo, palha de arroz, sorgo, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar. A parede celular dessas biomassas vegetais é composta majoritariamente por celulose (38%-50%), hemicelulose (17%-32%) e lignina (15%-30%) (Figura 1), variando suas quantidades de acordo com o tipo de material estudado (MCMILLAN, 1994; RITTER, 2008).

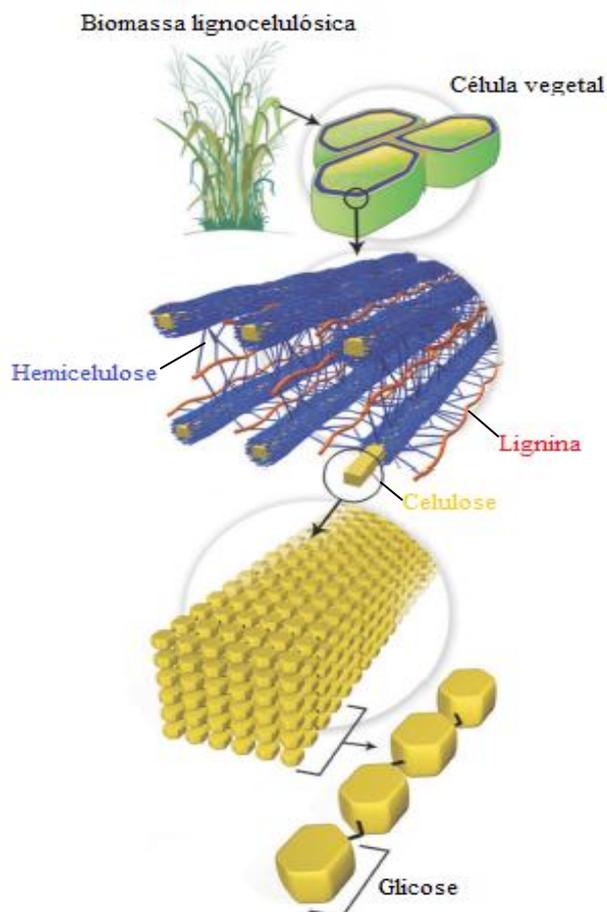


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica, destacando a parede celular vegetal composta por celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de RITTER, 2008.

2.1.1. CELULOSE

2.1.1.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

A celulose é o componente mais abundante da biomassa vegetal, sendo o principal polissacarídeo estrutural das plantas. Trata-se de um homopolímero linear, cuja as unidades repetitivas são moléculas de celobiose (dímeros de glicose), com ligações glicosídicas β -(1,4), de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Figura 2) (SANTOS et al., 2012). Na celulose existem regiões com maior organização estrutural, denominadas regiões cristalinas, e com menor organização, chamadas regiões amorfas, sendo as regiões cristalinas menos susceptíveis à hidrólise mediada por ácidos e enzimas (IOELOVICH, 2016).

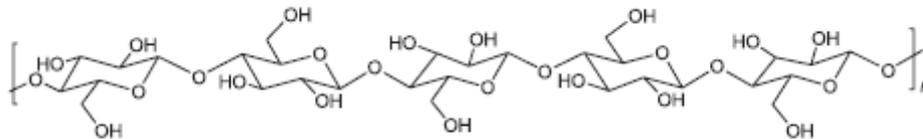


Figura 2: Representação da molécula de celulose (SANTOS et al., 2012)

A celulose é a estrutura alvo de diversos estudos que visam o aproveitamento da biomassa vegetal, pois a partir de sua hidrólise é obtida a glicose, molécula plataforma para produção de diversos produtos de interesse industrial.

2.1.1.2. HIDRÓLISE DA CELULOSE

A hidrólise da celulose para obtenção de glicose pode ser realizada de duas maneiras diferentes, através da hidrólise ácida ou pela hidrólise enzimática. A hidrólise ácida da celulose geralmente utiliza ácido sulfúrico ou clorídrico. O ácido empregado no processo penetra pela estrutura da celulose rompendo as ligações de hidrogênio, o que leva ao inchaço da celulose, quebra das ligações glicosídicas e liberação dos monômeros de glicose. A aplicação do ácido na hidrólise da celulose apresenta algumas desvantagens, como a toxicidade do ácido, poder de corrosão, necessidade de tratamento do efluente, impacto ambiental e a possibilidade de gerar produtos de desidratação da xilose e glicose, que irão afetar o rendimento global do processo e são inibidores do processo fermentativo. Por esses motivos, a hidrólise enzimática vem se destacando e sua aplicação se difundindo dentre os processos de conversão do material lignocelulósico (DE SOUZA et al., 2016).

A hidrólise enzimática da celulose depende principalmente do sinergismo de três enzimas, dentre elas as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as exoglucanases ou celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4). Sua ação gera terminais redutores e oligossacarídeos que servirão como substrato para as celobioidrolases. As celobioidrolases atuam nos terminais redutores e não redutores das cadeias de celulose, liberando celobiose e mais regiões específicas para a atuação da endoglucanase, através da redução da cristalinidade da celulose. Por último, a β -glicosidase hidrolisa a celobiose e pequenos oligossacarídeos, liberando unidades monoméricas de glicose (Figura 3) (DE SOUZA et al., 2016; OGEDA; PETRI, 2010).

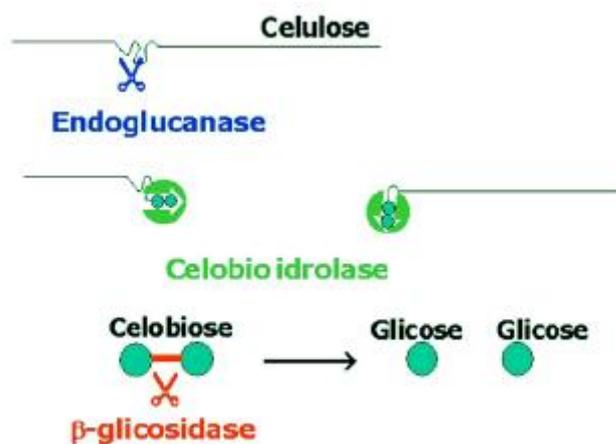


Figura 3: Esquema clássico demonstrando a hidrólise enzimática da celulose. Adaptado de OGEDA; PETRI, 2010.

Atualmente já se sabe que além do sinergismo dessas três enzimas é necessária a atuação de outras enzimas (Figura 4), como as LPMO (“lytic polysaccharide mono-oxygenases”). Ainda se sabe pouco sobre a forma de atuação dessas enzimas, mas acredita-se que atuem na celulose cristalina, oxidando as ligações glicosídicas e gerando novos terminais para as celulasas, aumentando a taxa e velocidade de hidrólise da celulose (VERMAAS et al., 2015). Para atuar com elevada eficiência as LPMO precisam de um doador de elétrons, podendo ser um agente redutor presente no substrato ou uma enzima auxiliadora, a celobiose desidrogenase, responsável por reduzir e ativar as LPMO (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

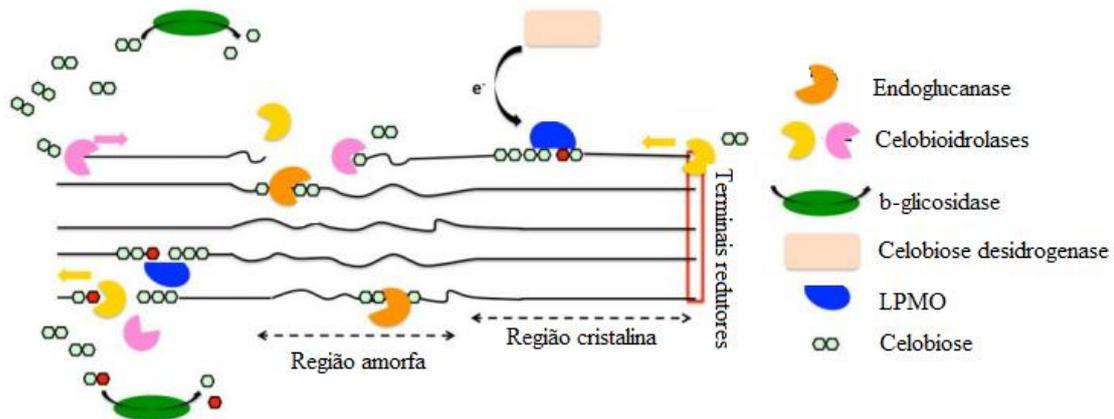


Figura 4: Esquema mais atualizado demonstrando a hidrólise enzimática da celulose, a ação em conjunto das enzimas celulolíticas e das oxidativas. Adaptado de DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012.

2.1.2. HEMICELULOSE

2.1.2.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

As hemiceluloses são genericamente classificadas como um grupo de polímeros heterogêneos formado pela combinação de vários tipos de monossacarídeos. É o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular. As hemiceluloses podem conter pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e/ou ácidos urônicos (ácidos glucurônico e galacturônico) (Figura 5), que se ligam uns aos outros essencialmente por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), sendo também possível encontrar ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) (SANTOS et al., 2012).

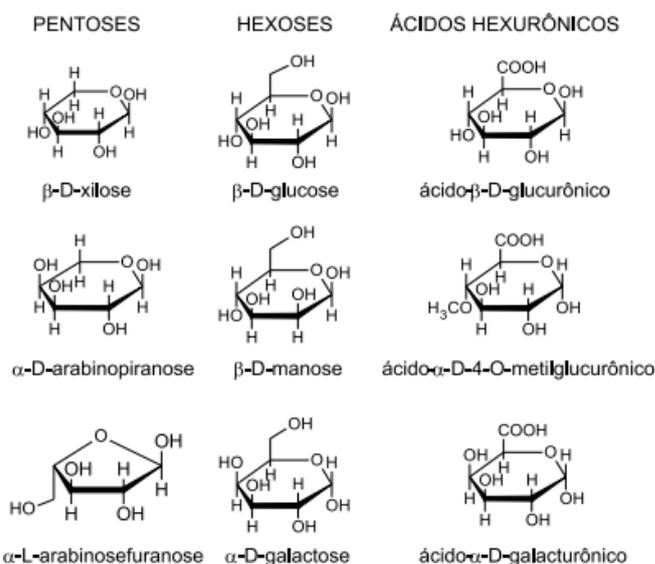


Figura 5: Monômeros que podem compor a hemicelulose (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005).

A hemicelulose presente na biomassa da cana-de-açúcar é denominada glucoarabinosilana, que contém uma cadeia principal de xilana (80%), que é composta por monômeros de xilose. Comparada à celulose, a hemicelulose apresenta maior susceptibilidade à hidrólise mediada por ácidos, devido à falta de regiões com alto grau de organização. A dificuldade da utilização industrial da xilose está relacionada com a formação de furfural e ácido acético, durante o processo de hidrólise ácida utilizado para a sua liberação, e o limitado número de micro-organismos capazes de fermentar as pentoses liberadas. A partir da hidrólise da hemicelulose e obtenção dos seus monômeros, podem ser produzidos diversos produtos, entre eles: xilitol, butanodiol, diversos biopolímeros e emulsificantes (CANILHA et al., 2013).

2.1.2.2. HIDRÓLISE DA HEMICELULOSE

A extração da hemicelulose presente nas biomassas lignocelulósicas geralmente é realizada pela hidrólise ácida. A hidrólise ácida apresenta elevados rendimentos de solubilização, mas sua utilização pode gerar compostos inibitórios dos processos fermentativos subsequentes. A hidrólise ácida é capaz de clivar a ligação glicosídica, fracionando os polissacarídeos em oligossacarídeos ou monossacarídeos. As ligações β -1,4 contidas na xilana são susceptíveis ao ataque ácido e ao hidrolisá-las são liberados os monômeros de xilose (BRIENZO et al., 2016). A hemicelulose também pode ser hidrolisada por processos hidrotérmicos, através do hidrônio (H_3O^+) da água na sua forma gasosa ou líquida. O processo ocorre em condições ácidas, pois o ácido acético liberado após a clivagem do grupo acetila da cadeia de xilana torna o meio ácido. O ácido acético é liberado através da quebra da ligação éster, devido sua instabilidade em elevadas temperaturas. Em comparação com a hidrólise ácida, os processos hidrotérmicos apresentam como vantagem a não utilização de reagentes químicos. A fração líquida após a hidrólise ácida da hemicelulose apresenta elevada quantidade de monossacarídeos solubilizados, ao contrário da hidrólise hidrotérmica, que apresenta os açúcares na forma de oligômeros (BRIENZO et al., 2016; VÁZQUEZ et al., 2000).

2.1.3. LIGNINA

2.1.3.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

A lignina é um material polifenólico e um dos principais componentes da parede celular da planta. Sua biossíntese ocorre por meio da desidrogenação enzimática de três monômeros de fenilpropanóides: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool

sinapílico, formando ligações C-O e C-C, levando a uma estrutura heterogênea e tridimensional. A partir desses monômeros são formadas as três unidades de construção da lignina: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), sendo suas quantidades variadas dependendo do vegetal analisado (Figura 6) (WONG, 2009).

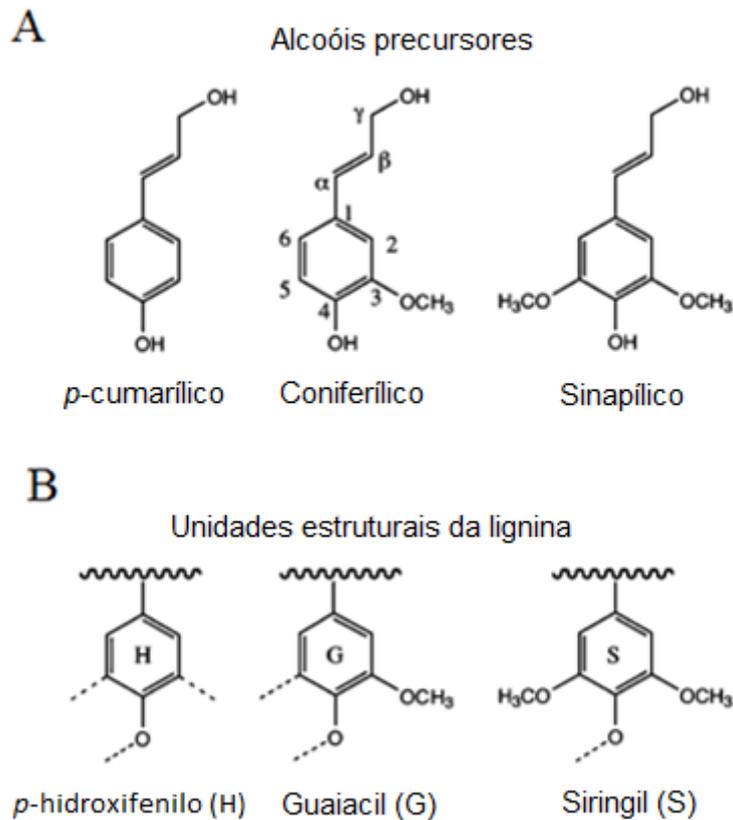


Figura 6: Estruturas dos precursores da lignina. A) Alcoóis precursores e B) Unidades estruturais da lignina. Adaptado de WONG, 2009.

A lignina tem vários grupos funcionais, tais como: hidroxila fenólica, hidroxila alifática, álcool benzílico, éter benzílico não cíclico, grupamentos carbonila e grupamentos metoxil. Esses grupos funcionais afetam diretamente a reatividade da lignina em várias reações químicas (KATAHIRA; ELDER; BECKHAM, 2018).

A lignina está diretamente ligada aos carboidratos da biomassa. Estudos observaram que esta molécula se liga a hemicelulose através de ligações éster entre o ácido carboxílico do ácido ferúlico e o álcool primário na posição C5 com a arabinose e esse ácido ferúlico se liga ao monômero da lignina. Isso demonstra um ponto interessante visando à redução da recalcitrância da lignina, pois pode representar um alvo de estudos para sua degradação (KATAHIRA; ELDER; BECKHAM, 2018).

2.1.3.2. OXIDAÇÃO DA LIGNINA

Na natureza, apenas alguns tipos de fungos degradam a lignina com alta eficiência, através da sua mineralização ou transformação em moléculas menores solúveis em água. Para isso, é necessário que os fungos apresentem diversas enzimas ligninolíticas, dentre estas as mais pesquisadas são: lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (MESTER; VARELA; TIEN, 2004)

A lacase (EC 1.10.3.2) é a principal enzima do sistema ligninolítico fúngico, presente no metabolismo secundário dos fungos. Estas enzimas são capazes de oxidar compostos fenólicos e aromáticos através da redução do oxigênio molecular a água (POLLEGIONI; TONIN; ROSINI, 2015). Em sua estrutura estão presentes 4 átomos de cobre, T1, T2 e T3 (par de átomos), sendo o sítio catalítico formado pelos átomos T2 e T3, os responsáveis pela ação da enzima. Baseado nos cobres T1 e T3 pode-se separar as lacases em dois grupos: com alto ou baixo potencial redox, estando diretamente ligado a eficiência catalítica da enzima. Por apresentar menor potencial redox que as enzimas peroxidases, sua ação é restrita a fração fenólica da lignina (< de 20% dos polímeros presentes na lignina). As lacases atacam as subunidades fenólicas da lignina, levando à oxidação do carbono α e clivando a ligação entre os carbonos α e β . A especificidade por compostos fenólicos, o acesso restrito a lignina presente na fibra lignocelulósica e o baixo potencial redox, podem limitar a ação de algumas lacases em oxidar a lignina. Entretanto, compostos não fenólicos com alto potencial redox que não são diretamente oxidados por lacases podem ser oxidados através desta enzima com o auxílio de um mediador (Figura 7). Os mediadores são compostos de baixa massa molecular com maior potencial redox do que a lacase, agindo como um transportador de elétrons entre a enzima e o substrato (PERALTA et al., 2017).

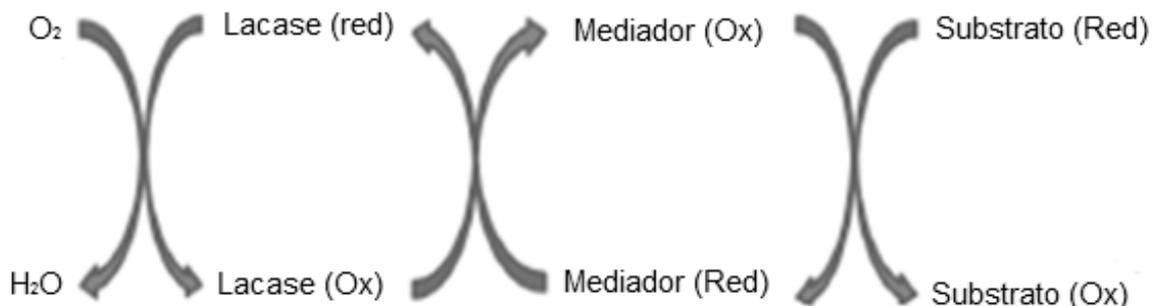


Figura 7: Mecanismo de ação da enzima ligninolítica lacase com o auxílio do mediador (PERALTA et al., 2017)

A Figura 8 mostra o mecanismo de ação das enzimas lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13), respectivamente; seus ciclos catalíticos são parecidos, apenas diferem quanto ao substrato que podem ser oxidados. A LiP tem a capacidade de oxidar tanto compostos fenólicos como não fenólicos, enquanto que a MnP apenas oxida compostos fenólicos (FARIA, 2010). As duas enzimas são ativadas através da sua oxidação por H_2O_2 levando a formação do composto I (C_1), que é deficiente de 2 elétrons. A redução de C_1 até a enzima nativa (C_0) ocorre pela abstração de 1 elétron a cada etapa e é responsável pela oxidação da lignina. A LiP apresenta um resíduo de triptofano na sua cadeia proteica atuando como agente de transferência de elétrons com o substrato, que não pode ter um contato direto com o grupo heme oxidado da enzima. Por outro lado, a MnP necessita de Mn^{+2} para a redução de C_{II} a C_0 , podendo C_1 ser reduzido a C_2 pela oxidação direta de estruturas fenólicas ou de Mn^{+2} . O Mn^{+2} é substrato preferencial para a transferência de elétrons, visto que as MnP não possuem o resíduo de triptofano presente na LiP, sendo esse a principal diferença entre essas enzimas. O Mn^{+3} formado na oxidação da molécula da Mn^{+2} pode atuar como mediador da MnP e normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico, podendo esse complexo ser reduzido através da oxidação de uma estrutura fenólica (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

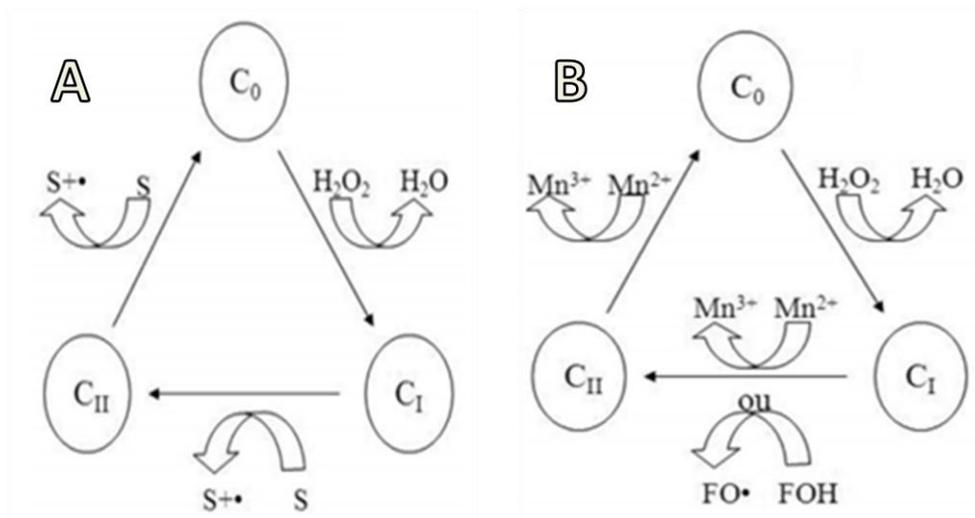


Figura 8: Mecanismo de ação das enzimas ligninolíticas lignina peroxidase (A) e manganês peroxidase (B) (AGUIAR; FERRAZ, 2011)

2.2. CANA-DE-AÇÚCAR

A produção estimada de cana-de-açúcar para a safra de 2018/2019 é de 615 milhões de toneladas. Toda essa produção dará origem a aproximadamente 31 milhões de toneladas de açúcar e 32 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2018). Os resíduos dessa produção são denominados bagaço, obtido após a moagem do colmo para obtenção do caldo de cana e palha, constituída pelos ponteiros, folhas verdes e secas após a colheita da cana-de-açúcar (Figura 9).

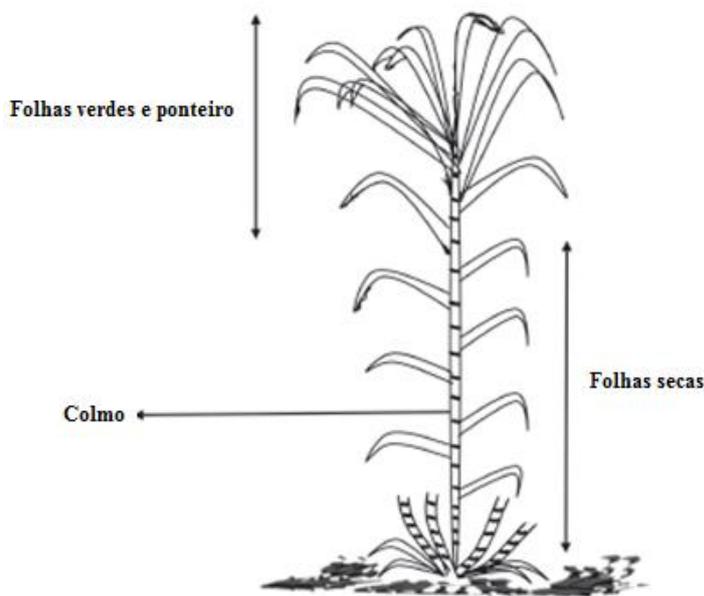


Figura 9: Ilustração da cana-de-açúcar evidenciando suas estruturas: colmo, folhas secas, folhas verdes e ponteiros. Adaptado de Menandro, 2017.

Dentre os resíduos da cana-de-açúcar, o bagaço atualmente vem sendo utilizado para a geração de bioeletricidade, aumentando a receita das usinas que a produzem e tornando viável o seu funcionamento durante a entressafra. Além disso, o bagaço também pode ser utilizado para a produção do etanol de segunda geração, como realizado pela empresa brasileira Raízen (CARPIO; SIMONE DE SOUZA, 2017).

Até 2002, antes de realizarem a colheita da cana-de-açúcar toda a plantação era queimada para facilitar seu corte. A queimada tinha como objetivo aumentar a segurança do trabalhador, o rendimento do corte manual, melhorar o cultivo e os novos plantios de cana-de-açúcar. No entanto, os impactos gerados pelas queimadas eram inúmeros, dentre eles: contribuição para o aumento do aquecimento global, redução da biodiversidade animal e vegetal e aumento da incidência de doenças respiratórias da

população ao entorno das plantações (RONQUIM, 2010). Por isso, a tradicional prática de queimar a área plantada para realizar a colheita manual está sendo eliminada gradativamente e a colheita mecanizada vem sendo implementada gradualmente ao longo da última década (Lei do Estado de São Paulo N8 11241 datada de 19/09/2002). Com isso, a quantidade de palha disponível para ser utilizada é cada vez maior, seja para geração de bioeletricidade ou outra finalidade (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010b).

A palha de cana-de-açúcar costumava ser deixada, em sua totalidade, na área plantada para a recomposição dos nutrientes no solo. No entanto, estudos como os realizados no âmbito do projeto SUCRE (Sugarcane Renewable Electricity), realizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) que integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), visam identificar a quantidade de palha necessária a ser deixada no solo (CARVALHO et al., 2017). Resultados preliminares mostram que dependendo do tipo de solo, não remover a palha pode ser prejudicial à manutenção da umidade, no reciclo de nutrientes, na propagação de pragas e no crescimento da cana-de-açúcar. Assim, vem sendo recomendado o estudo das características do solo e da palha a ser deixada no campo, para determinar a quantidade de palha que pode ser removida. Deste modo, a disponibilidade de palha para ser aproveitada para outros fins deve aumentar nos próximos anos (BORDONAL et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; MENANDRO et al., 2017).

2.3. ETANOL LIGNOCELULÓSICO OU DE SEGUNDA GERAÇÃO

O aumento do preço do petróleo durante a crise mundial do petróleo na década de 70 fez com que os países buscassem alternativas ao uso dessa matéria-prima para a produção de combustíveis. Para diminuir a dependência do país frente à importação do petróleo, o Brasil aumentou a produção do etanol de primeira geração, proveniente da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar, como alternativa à gasolina. Após alguns anos, foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), responsável por aumentar os investimentos no cultivo da cana-de-açúcar e na construção de novas usinas para a produção do etanol de primeira geração (CRUZ et al., 2015; DE CARVALHO; ANTUNES; FREIRE, 2016). Mais recentemente, em dezembro de 2017 o Senado aprovou a lei do projeto RenovaBio, uma política nacional de biocombustíveis que tem como um de seus objetivos a expansão da produção e uso de biocombustíveis,

como o bioetanol, impondo metas de utilização a serem cumpridas (LEI N° 13.576, 2017).

Além de ser uma alternativa aos elevados preços do petróleo, o etanol também apresenta a característica de ser menos poluente que a gasolina, combustível fóssil derivado do petróleo. Com isso, a utilização do etanol também apresenta uma importância ambiental, sendo considerado uma fonte de energia renovável.

Visando reduzir o conflito entre a indústria alimentícia e a de combustíveis pela utilização da cana-de-açúcar, estudos começaram a ser realizados para a produção de etanol a partir dos resíduos da indústria sucroalcooleira, denominado etanol de segunda geração ou lignocelulósico. Para se produzir o bioetanol, são necessárias quatro principais etapas: 1) pré-tratamento da biomassa, para tornar a celulose mais disponível e acessível; 2) hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, para converter a celulose em glicose; 3) fermentação, utilização de leveduras para metabolizar a glicose em etanol; e 4) destilação, separação e purificação do etanol (MARGEOT et al., 2009).

Atualmente existem seis empresas que produzem o etanol de segunda geração em escala comercial, Abengoa (EUA), BetaRenewables (Itália), DuPont (EUA), Poet-DSM (EUA), Granbio e Raízen (Brasil). A maior diferença entre elas é a matéria-prima utilizada para a produção. As brasileiras Granbio e Raízen utilizam os resíduos da cana-de-açúcar, a palha e o bagaço, respectivamente. A maior dificuldade encontrada por todas essas empresas é a etapa de pré-tratamento, responsável por direcionar os rendimentos da produção (NETO; GUIMARÃES; FREIRE, 2018).

2.4. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Durante a produção do etanol de segunda geração, um dos gargalos tecnológicos é a etapa de pré-tratamento. Essa etapa é necessária para reduzir a recalcitrância da biomassa vegetal utilizada, aumentando a obtenção de açúcares fermentáveis durante a hidrólise enzimática e a produção de etanol. Para a redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica é necessário que ocorram algumas mudanças estruturais na amostra, como: redução da cristalinidade da celulose, remoção total ou parcial da hemicelulose e/ou lignina, aumento da porosidade, entre outros (HIMMEL et al., 2007b; ISHIZAWA et al., 2007; PARK et al., 2010).

Um pré-tratamento eficaz deve ter baixo custo operacional com elevada recuperação de sólidos, aumentar a disponibilidade e digestibilidade da celulose, resultar em baixa formação de compostos de degradação de açúcares C5 e C6, que baixam o rendimento global do processo e atuam como inibidores das etapas fermentativas subsequentes. Dependendo das características do tratamento, estes podem ser classificados em pré-tratamento físico, químico, físico/químico ou biológico (SUN; CHENG, 2002).

Como exemplo de pré-tratamento físico pode-se citar a moagem, ultrassom e extrusão; de tratamentos químicos o ácido, alcalino e líquidos iônicos; de tratamentos físico/químicos o AFEX, explosão a vapor e hidrotérmico; e de pré-tratamento biológico a utilização de fungos (DA SILVA et al., 2013; KUSTER MORO et al., 2017a; MACHADO; FERRAZ, 2017; MOUTTA et al., 2013; MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014a).

Todos os pré-tratamentos discutidos na literatura apresentam vantagens e desvantagens, sendo importante destacar que não existe um tratamento universal, ou seja, que possa ser amplamente aplicado sem avaliação prévia do processo e biomassa utilizada. A Tabela 1 apresenta alguns tipos de pré-tratamentos, suas vantagens e desvantagens (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Tabela 1: Modificações proporcionadas na biomassa, vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos mais estudados (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017)

Pré-tratamento	Modificação na biomassa lignocelulósica	Vantagens	Desvantagens
Hidrotérmico	Solubilização da hemicelulose	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada recuperação dos açúcares • Baixa formação de inibidores • Não necessita de reagentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta demanda energética • Elevada utilização de água • Baixa concentração de açúcar na fração líquida
Explosão a vapor	Auto-hidrólise da hemicelulose	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo impacto ambiental • Elevada concentração de açúcares • Viável aplicação industrial 	<ul style="list-style-type: none"> • Formação de inibidores • Degradação parcial da hemicelulose e lignina, • Elevado custo
AFEX	Redução da cristalinidade da celulose	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da acessibilidade das enzimas • Baixa formação de compostos inibitórios 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa efetividade para amostras com elevado teor de lignina • Elevado custo com reagentes • Baixa remoção da hemicelulose
Acido	Solubilização da hemicelulose e lignina	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da taxa de hidrólise • Elevada concentração de açúcares na fração líquida 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado gasto energético • Necessidade de reatores resistentes a corrosão • Formação de inibidores
Alcalino	Alteração na estrutura da lignina, redução da cristalinidade da celulose e solubilização parcial da hemicelulose	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção eficiente da lignina • Aumento da acessibilidade das enzimas • Redução da polimerização e cristalinidade da celulose 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado custo após o processo • Não é eficiente em escala industrial
Biológico	Degradação da lignina através das enzimas secretadas pelos micro-organismos	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo custo, • Não utiliza reagentes químicos • Baixo gasto energético • Condições ambientais 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo rendimento em glicose • Necessidade micro-organismos mais eficientes para a remoção da lignina • Elevado tempo de processo

Dentre os tratamentos mais discutidos na literatura poucos apresentam aplicabilidade em escala industrial, sendo os tratamentos ácido e hidrotérmico normalmente escolhidos a serem utilizados nas indústrias de produção de etanol de segunda geração.

O pré-tratamento ácido geralmente utiliza ácidos diluídos (1-5%) como ácido sulfúrico ou clorídrico, em elevadas temperaturas por um determinado período de tempo (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017). Esse tratamento apresenta alta eficiência em solubilizar a fração hemicelulósica, hidrolisando os açúcares presentes na biomassa em monômeros, que podem vir a ser utilizados para diferentes fins. Por outro lado, produz efluentes tóxicos, dependendo das condições do processo gera elevadas concentrações de inibidores dos processos fermentativos subsequentes, além de precisar de reatores resistentes a corrosão, elevando o custo do processo (DA SILVA et al., 2013)

O pré-tratamento hidrotérmico não utiliza reagentes químicos, apenas água. O processo é realizado em elevadas pressões para que em elevada temperatura a água se mantenha no seu estado líquido e promova a autólise da biomassa lignocelulósica. Esse tratamento promove a solubilização da hemicelulose, mas diferentemente do ácido, os açúcares hidrolisados se encontram na forma de oligossacarídeos, apresenta baixa formação de inibidores e não necessita de uma etapa de lavagem da biomassa. Como pontos negativos a sua utilização, este tratamento acarreta em um elevado gasto de energia (AGBOR et al., 2011).

2.4.1. PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

O pré-tratamento biológico utiliza fungos para proporcionar modificações na estrutura da biomassa lignocelulósica, tais como: remoção da lignina e redução da cristalinidade da celulose. Devido à estrutura dos materiais lignocelulósicos e da lignina, sabe-se que a remoção é realizada por enzimas extracelulares oxidativas, em vez de hidrolíticas, para que ocorra a remoção da lignina sem reduzir o conteúdo de celulose (HATAKKA; HAMMEL, 2011a).

Diversos trabalhos veem sendo desenvolvidos com a utilização de fungos basidiomicetos, não somente para aplicação no pré-tratamento de resíduos agroindustriais, mas também com o tratamento de efluentes e remoção de compostos tóxicos, como corantes e pesticidas. Devido à similaridade desses compostos com a estrutura da lignina, os fungos

utilizam as mesmas enzimas para degradá-los (MARTINS et al., 2003; PEREIRA et al., 2016).

Os fungos basidiomicetos aplicados no tratamento biológico podem ser classificados em fungos da podridão branca e da podridão parda, dependendo do aspecto macroscópico da degradação causada na madeira e do complexo enzimático secretado (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos tipos de fungo degradadores de madeira. Adaptado de MARTÍNEZ *et al.*, 2005

	Podridão branca	Podridão parda
Aspecto da degradação	Madeira fica com a cor mais clara, úmida e macia.	Coloração da madeira fica mais escura, seca e quebradiça.
Degradação dos compostos da biomassa	Celulose, hemicelulose e lignina. Existindo os seletivos para lignina.	Celulose e hemicelulose.
Fungos	<i>T. versicolor</i> , <i>Irpex lactus</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Pleurotus spp.</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i>

Os fungos da podridão branca apresentam aparato enzimático para degradar todos os componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina, existindo fungos da podridão branca que são mais seletivos para a degradação da lignina (MARTÍNEZ et al., 2005). Entretanto, os fungos da podridão parda degradam mais rapidamente a hemicelulose e a celulose, através da ação das enzimas hidrolíticas secretadas. Após a decomposição pelos fungos da podridão branca, a madeira decomposta fica com um aspecto de cor mais claro, devido à remoção da lignina. Por outro lado, após a decomposição pelos fungos de podridão parda, a madeira fica com a cor mais escura, por causa da remoção da hemicelulose e do aumento da exposição da lignina, visto que, a lignina é a responsável pela cor escurecida das biomassas (HATAKKA; HAMMEL, 2011a).

A Tabela 3 apresenta alguns fungos utilizados para o pré-tratamento de diferentes biomassas, dentre os quais os mais estudados são os fungos da podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora*, visto que, estudos com a utilização de fungos da podridão parda como *Gloeophyllum trabeum* e *Serpula lacrymans* são menos comuns (SALVACHÚA et al., 2011; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Tabela 3: Fungos aplicados no pré-tratamento biológico de diferentes biomassas.

Fungo	Biomassa	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Algodão	(SHI et al., 2009)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palha de trigo	(TANIGUCHI et al., 2005)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Postia placenta</i>	Lascas de madeira	(GILES et al., 2015)
<i>Rhodonía placenta</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Bamboo	(MÖLLER; MILD, 2019)
<i>P. chrysosporium</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>Trametes sp.</i>	Eucalipto	(CASTOLDI et al., 2014)
<i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>C. subvermispora</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	(MACHADO; FERRAZ, 2017)
<i>Ganoderma lobatum</i> , <i>Gloeophyllum trabeum</i>	Palha de trigo	(HERMOSILLA et al., 2018)
<i>Serpula lacrymans</i> , <i>Coniophora puteana</i> , <i>G. trabeum</i>	Madeira	(HOWELL et al., 2009)

Devido ao tratamento biológico ser pouco efetivo em aumentar a digestibilidade da celulose, não sendo utilizado como único método de pré-tratamento no processamento de biomassas vegetais, surgem estudos visando sua associação com diferentes tratamentos, como o ácido, alcalino, explosão a vapor e hidrotérmico (MA et al., 2010; SHIRKAVAND et al., 2016; WANG et al., 2012). Wang e colaboradores (2012) associaram o tratamento biológico utilizando o fungo *Lenzites betulina* com o tratamento hidrotérmico a 200 °C por 30 minutos aumentando o rendimento de glicose obtido em 2,6 vezes, quando comparado com o tratamento hidrotérmico isolado. Ao realizar o tratamento hidrotérmico antes do tratamento biológico com *C. subvermispora* foi observado maior remoção de lignina pelo fungo e maior rendimento em glicose obtido após a hidrólise enzimática de diferentes biomassas (WAN; LI, 2011). Assim, a estratégia de associar o tratamento biológico com outro tratamento, como o hidrotérmico, se mostra promissora e vem sendo abordada na literatura.

3. JUSTIFICATIVA

O aumento da demanda pelos produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar faz com que sua produção esteja em constante crescimento. Devido à obrigatoriedade da colheita mecanizada, a palha se tornou um resíduo ainda mais disponível e que necessita ter seu potencial aproveitado. Estudos relatam que manter a palha em sua totalidade na plantação para recomposição do solo pode ser prejudicial, com isso, vem sendo estudado sua aplicação para a produção de etanol de segunda geração. Por conta da sua estrutura, essa biomassa vegetal apresenta elevada recalcitrância à ação enzimática. Para diminuir essa recalcitrância e aumentar o rendimento de conversão de celulose em glicose durante a hidrólise enzimática, é necessária a etapa de pré-tratamento da biomassa. Atualmente, a maioria das empresas produtoras de etanol de segunda geração utiliza os tratamentos ácido ou hidrotérmico, sendo que esses tratamentos apresentam características que elevam o custo do processo. Apesar do grande número de estudos relacionados com pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, ainda não existe um consenso sobre o tratamento que possa ser amplamente utilizado. Por isso, para viabilizar a utilização desse resíduo na produção de etanol de segunda geração e de todas as frações da biomassa no conceito de biorrefinaria, a proposta do presente trabalho é reduzir a severidade dos processos de pré-tratamento que vêm sendo utilizados ao associá-los ao tratamento biológico, um tratamento ambientalmente seguro e com baixo custo para ser realizado.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo realizar a associação do pré-tratamento ácido ou hidrotérmico com o tratamento biológico, visando o aumento da disponibilidade e digestibilidade da celulose presente na biomassa pré-tratada.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a efetividade dos tratamentos ácido, hidrotérmico e biológico, realizados separadamente, quanto ao aumento da disponibilidade e digestibilidade da celulose;
- Avaliar a composição química e a obtenção de glicose a partir das biomassas de palha de cana-de-açúcar *in natura* e após os pré-tratamentos;
- Avaliar e selecionar os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermu*, *Gloeophyllum trabeum*, *Paraconiothyrium estuarinu*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Westerdykella dispersa* quanto à perda mássica proporcionada à palha de cana-de-açúcar;
- Avaliar as modificações estruturais proporcionadas pelos fungos durante o tratamento biológico através da microscopia confocal de fluorescência;
- Avaliar as atividades enzimáticas das enzimas celulolíticas (FPase e β -glicosidase) e ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase) secretadas pelo fungo durante o pré-tratamento biológico;
- Avaliar a efetividade da associação do tratamento hidrotérmico com o biológico;
- Avaliar a possibilidade de reduzir o tempo e a temperatura do tratamento hidrotérmico ao associá-lo ao tratamento biológico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS E ETAPAS EXPERIMENTAIS DO TRABALHO

No presente trabalho as amostras de palha de cana-de-açúcar utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Complexo Bioenergético Itarumã S.A (Lote 1) e Raízen (Lote 2). Amostras da palha *in natura* foram cortadas (aproximadamente 2 cm) ou moídas em moinho de facas e peneiradas (180 – 850 μm) para a realização dos experimentos de pré-tratamento.

Os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermu*, *Paraconiothyrium estuarinu*, e *Westerdykella dispersa* foram isolados de manguezais brasileiros (GHIZELINI et al., 2019) e o fungo *Phanerochaete chrysosporium* é uma cepa comercial registrada como ATCC 34541; todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo professor Andrew Macrae do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (Instituto de Microbiologia Paulo de Goés - UFRJ). O fungo *Pleurotus ostreatus* foi cedido pela Universidade Federal de Lavras e depositado na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária da FIOCRUZ com número INCQS 40310. O fungo *Gloeophyllum trabeum* foi obtido juntamente ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (Universidad de La Frontera – Chile), estando depositado na *Chilean Culture Collection of Type Strains* – CCCT/UFRO da *Universidad de La Frontera*, Temuco, Chile, sob número CCCT16.04.

A Figura 10 apresenta a sequência de experimentos realizados no presente trabalho. Na primeira etapa foram realizados os pré-tratamentos e a avaliação dos diferentes lotes de palha *in natura*, além da avaliação e seleção entre os pré-tratamentos ácido e hidrotérmico, quanto à remoção da fração hemicelulósica e o aumento da digestibilidade enzimática da celulose. Na segunda etapa foram avaliados potenciais fungos a serem aplicados no tratamento biológico, através da perda mássica da palha proporcionada pelas linhagens avaliadas, e realizado o pré-tratamento com os fungos selecionados. Na terceira etapa foi realizada a associação do pré-tratamento biológico com o tratamento hidrotérmico.

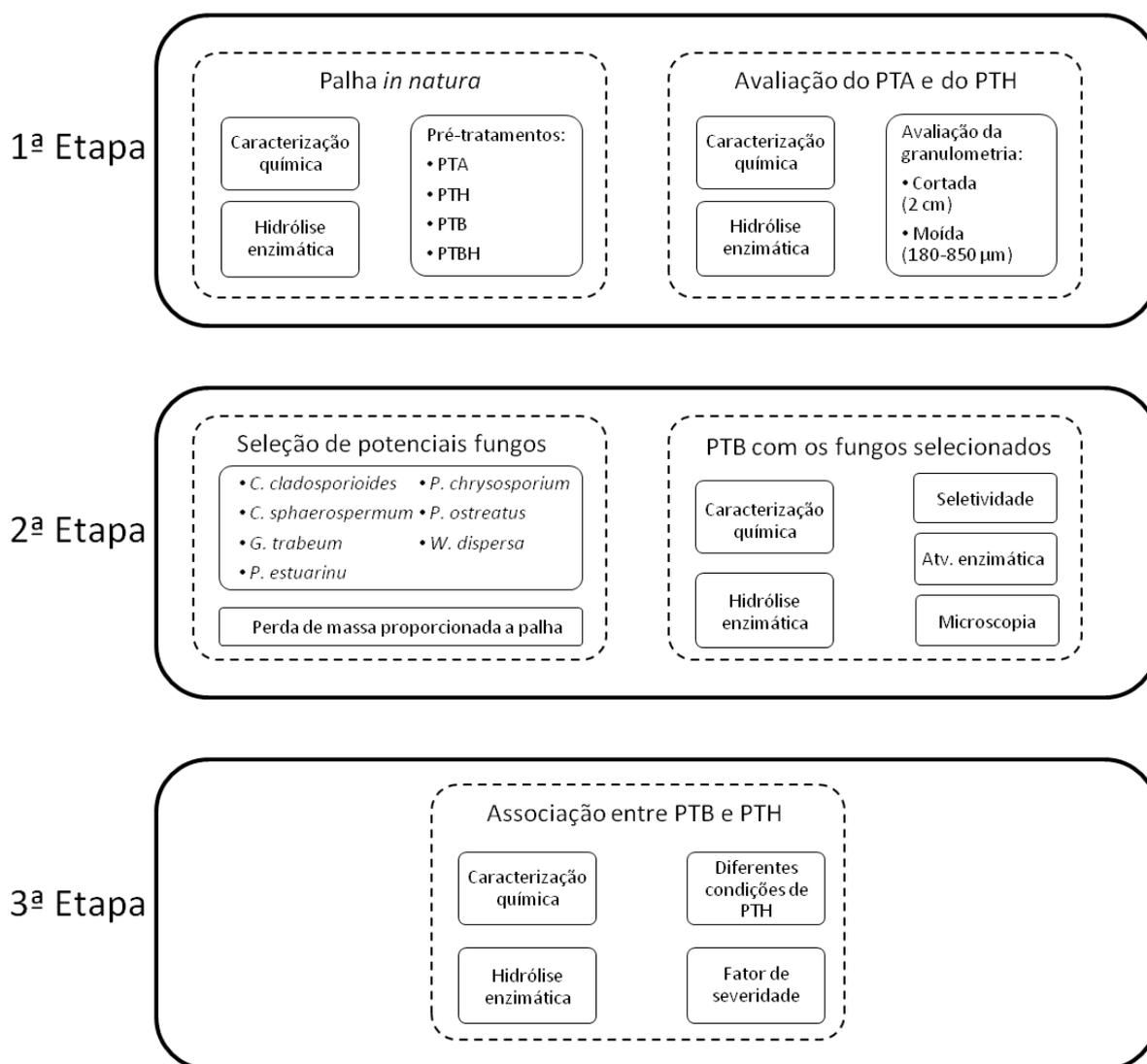


Figura 10: Esquema demonstrando os experimentos realizados no presente trabalho. PTA, pré-tratamento ácido; PTH, pré-tratamento hidrotérmico; PTB, pré-tratamento biológico; PTBH, associação do pré-tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico.

5.2. PRÉ-TRATAMENTOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

No presente estudo foram realizados os tratamentos ácido, biológico e hidrotérmico, além de suas associações.

5.2.1. PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

O tratamento ácido foi realizado com ácido sulfúrico a 2,9% (m/v). Quatro gramas de palha foram adicionadas em um frasco juntamente com 16 mL de ácido sulfúrico, a fim de manter uma proporção de 1:4 (biomassa:ácido), e foram autoclavados por 30 minutos a 121 °C. Após, a palha foi lavada com aproximadamente 2 litros de água destilada para que seu pH

se aproximasse do neutro e a fração sólida foi armazenada para futuras análises (MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014b).

5.2.2. PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

O tratamento hidrotérmico foi realizado em um reator Parr 4848 a 160 ou 170 °C, por 10 ou 40 minutos, 100 rpm e 20 bar inicial em atmosfera de nitrogênio. Foram adicionados ao reator 10 gramas de palha e 100 mL de água destilada, mantendo uma proporção de 1:10 (biomassa:água). Ao terminar, a biomassa foi filtrada e lavada com aproximadamente 2 litros de água destilada, para remoção dos açúcares residuais. As frações líquida e sólida foram armazenadas para futuras análises (DE SOUSA PAREDES et al., 2015).

5.2.3. PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

Os experimentos de tratamento biológico foram realizados com cada fungo sendo inoculado separadamente na biomassa e em triplicata. Para isso, o fungo a ser avaliado foi inoculado no meio Gorbatova (GORBATOVA et al., 2006) com modificações (PEREIRA et al., 2013) (Tabela 4) a 30 °C, 200 rpm por 7 dias. Passado esse tempo, o micro-organismo foi repicado para placas de Petri contendo ágar batata dextrose e incubado a 30 °C por 7 dias. Na sequência, *plugs* de ágar contendo o micélio fúngico foram retirados, com o auxílio de ponteiros estéreis, e inoculados em uma concentração de 10 mg de micélio/grama de biomassa em frascos previamente autoclavados contendo 5 g de palha e 25 mL de água destilada, sendo incubados a 30 °C por 20 dias, sem agitação. Após este período, foram adicionados 25 mL de tampão malonato de sódio 0,176 mM, pH 4,5 e homogeneizados por 2 h a 150 rpm para extração das enzimas produzido pelo fungo durante o tratamento. A biomassa foi filtrada, a fração sólida foi armazenada para a quantificação da perda mássica e a fração líquida para a quantificação das atividades enzimáticas. Com a adição do tampão os fungos sofrerão osmólise, deste modo, se desprendendo da palha e sendo solubilizados. Frascos contendo palha sem a adição do fungo foram submetidos aos mesmos procedimentos para serem utilizados como controle.

Tabela 4: Composição do meio de cultura líquido Gorbatova com modificações (PEREIRA et al., 2013).

Reagente	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Peptona	3,0
KH ₂ PO ₄	0,6
K ₂ HPO ₄	0,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0005
MnSO ₄	0,005
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,25

5.2.3.1. PERDA DE MASSA MEDIADA PELA AÇÃO DOS FUNGOS DURANTE O TRATAMENTO BIOLÓGICO

Após a filtração do conteúdo do frasco onde se deu o tratamento biológico, a palha foi posta para secar a temperatura ambiente e, de acordo com a Equação 1, foi determinada a perda mássica proporcionada pelos fungos durante o tratamento, onde “ m_0 ” é a massa inicial de palha, “ m ” é a massa de palha após o PTB e “ C ” é a massa relacionada a perda mássica do controle sem inoculo fúngico pelo mesmo período, nas mesmas condições de incubação.

$$\text{Perda mássica (\%)} = \frac{[m_0 - (m - C)]}{m_0} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O percentual de remoção de cada componente foi calculado de acordo com as Equações 2 e 3, onde “ a ” é o teor do componente após o balanço de massa, “ $m_{in\ natural}$ ” é o teor do componente na biomassa *in natura* e “ $m_{pré-tratada}$ ” é o teor do componente na biomassa pré-tratada.

$$a = \frac{m_{pré-tratada} \times \text{sólido recuperado (\%)}}{100} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Porcentagem de remoção (\%)} = 100 - \left(\frac{a \times 100}{m_{in\ natural}} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

A seletividade relativa quanto a remoção de um determinado componente foi calculada conforme a Equação 4, onde “ $m_{in\ natural}$ ” é o teor do componente na biomassa *in natura*, “ a ” teor do componente após o balanço de massa, “ $R_{\Sigma\text{cel,hem,lig}}$ ” é o somatório das remoções dos polissacarídeos e lignina.

$$\text{Seletividade relativa} = \frac{m_{in\ natural} - a}{R_{\Sigma\text{cel,hem,lig}}} \quad (\text{Equação 4})$$

5.2.3.2. ENZIMAS EXTRACELULARES SECRETADAS PELOS FUNGOS DURANTE O TRATAMENTO BIOLÓGICO

Após a filtração do conteúdo do frasco onde se deu o tratamento biológico, a fração líquida foi utilizada para determinar as atividades das enzimas extracelulares produzidas pelos fungos durante o tratamento. Foram avaliadas as atividades celulolíticas (celulases totais (FPase) e β -glicosidase) e ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase).

5.2.3.2.1. LIGNINOLÍTICAS

5.2.3.2.1.1. LACASE

A atividade enzimática de lacase foi determinada utilizando metodologia descrita por Niku-Paavola e colaboradores (NIKU-PAAVOLA; RAASKA; ITÄVAARA, 1990) com modificações (PEREIRA et al., 2013). Esta metodologia é baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'-azino-bis-etilbentiazolina). Para isso, 100 μ L do extrato enzimático foram adicionados juntamente com 1500 μ L de tampão succinato de sódio pH 4,5 e 400 μ L de ABTS em uma cubeta de espectrofotômetro e a leitura do ensaio foi realizada com o comprimento de onda de 420 nm durante 90 segundos. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto, considerando ϵ - para o ABTS de 36.000 M⁻¹cm⁻¹.

5.2.3.2.1.2. MANGANÊS PEROXIDASE

A atividade enzimática de manganês peroxidase foi determinada segundo metodologia proposta por Kuwahara e colaboradores (KUWAHARA et al., 1984) com modificações (PEREIRA et al., 2013). Esta metodologia se baseia na oxidação do vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio. Para isso, 500 μ L do extrato enzimático foram adicionados juntamente com 100 μ L de lactato de sódio 0,25M; 200 μ L de albumina bovina 0,5%; 50 μ L de M_nSO_4 ; 100 μ L de vermelho de fenol 0,1% e 500 μ L de peróxido de hidrogênio 0,075 mM e incubados por 5 minutos a 30 °C. Após a incubação do meio reacional foi adicionado 40 μ L de NaCl 2N e a leitura do ensaio foi realizada com o comprimento de onda de 610 nm.

5.2.3.2.2. CELULOLÍTICAS

5.2.3.2.2.1. CELULASES TOTAIS (FPASE)

O procedimento seguiu a metodologia descrita pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) adaptada por Adney e Baker (ADNEY; BAKER, 1996) de maneira a determinar a atividade da celulase em FPU (filter paper unit) sobre o papel de filtro. A quantificação dos açúcares liberados foi determinada com auxílio do método DNS descrito por Miller (MILLER, 1959) e adaptado conforme Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA et al., 2012).

Primeiramente, foi preparada uma curva padrão de glicose. Para isso, foram feitas diluições de 1:1,5; 1:2; 1:3 e 1:5 a partir de uma solução de glicose padrão com concentração de 10 mg/mL de tampão citrato. Adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato em um tubo de ensaio e aproximadamente 5 minutos depois, adicionou-se 0,5 mL da diluição. Para a determinação enzimática, o substrato utilizado foi uma tira de papel de filtro de 50 mg Whatman N°1 (1,0 x 6,0cm). As tiras foram enroladas nos tubos de ensaio. As análises foram feitas em triplicata. As diluições da amostra e as da curva padrão foram então encubadas em banho a 50 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de DNS (Ácido Dianitrosalicílico) e transferiu-se todos os tubos para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após esse tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo com o objetivo de parar a reação. Por fim, diluiu-se 0,2 mL do conteúdo de cada tubo a 2,5 mL de água destilada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores equivalentes à glicose foi determinada através da curva padrão, cujas concentrações de glicose eram previamente conhecidas.

Para a atividade de FPase, uma unidade de enzima (FPU) foi baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose, seguindo a Equação 5 a seguir:

$$\text{FPU} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60) \times [\text{enzima diluída}]} \text{ unidades/mL} \quad (\text{Equação 5})$$

5.2.3.2.2. B-GLICOSIDASE

As dosagens da atividade enzimática de β -glicosidase foram realizadas conforme metodologia descrita pela IUPAC por Ghose (GHOSE, 1987), com adaptações descritas a seguir, utilizando como substrato uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de β -glicosidase (BGU). Primeiramente preparou-se uma solução de celobiose 15 mM. Em seguida, as amostras foram preparadas com 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de celobiose, sendo esta última adicionada após 5 minutos que as diluições das soluções enzimáticas ficaram em banho-maria. Para o preparo do branco da reação, adicionou-se num tubo de ensaio 0,5 mL de tampão citrato e 0,5 mL de celobiose. No preparo do branco da diluição, foram adicionados 0,5 mL de tampão citrato e 0,5 mL da solução enzimática. Todos os tubos foram mantidos em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos. Logo após, a reação foi parada colocando-se os tubos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e em seguida, lidas no bioanalisador para a quantificação da concentração de glicose. Uma unidade de atividade (IU) corresponde à liberação de um μ mol de produto por minuto. Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata e os resultados obtidos segundo a Equação 6 a seguir:

$$\frac{\text{IU}}{\text{mL}} = \frac{\text{Diluição} \times \text{Fator de correção} \times \text{Volume total do ensaio (mL)}}{\text{Tempo (min)} \times \text{Volume da enzima (mL)}} \quad (\text{Equação 6})$$

Obs.: Fator de correção = 5,55(μ mol/mL)

5.2.4. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS BIOLÓGICO E HIDROTÉRMICO

As associações foram realizadas nas mesmas condições descritas nos itens 5.2.2. e 5.2.3 para os tratamentos hidrotérmico e biológico.

5.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA* E PRÉ-TRATADA

A metodologia para a caracterização química da palha *in natura* e das amostras pré-tratadas foi realizada de acordo com o procedimento descrito pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory) por Sluiter e colaboradores (SLUITER et al., 2005, 2012). Nesta etapa, foram determinados os seguintes componentes: cinzas, extrativos, carboidratos estruturais, lignina solúvel e insolúvel em ácido.

5.3.1. DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

Amostras de 0,5 g de palha foram adicionados em cadinhos de porcelana previamente pesados após ficarem na mufla a 575 °C *overnight*, para determinação de seu peso seco. Os cadinhos contendo a palha retornaram para a mufla a 575 °C por 24 horas para sua calcinação. Após isso, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas foi determinada pela diferença entre a massa final e a massa inicial dos cadinhos, em peso seco.

5.3.2. DETERMINAÇÃO DOS EXTRATIVOS NA BIOMASSA

Para a determinação dos extrativos foram utilizados cartuchos de celulose, que foram previamente pesados. A cada cartucho, foram adicionados 1 g de amostra em peso seco e cada massa foi devidamente anotada. Os cartuchos foram inseridos no sistema do extrator soxhlet. A primeira extração foi feita utilizando 95 mL de água destilada, com um ajuste de aquecimento que gerasse no mínimo 4 a 5 sifonações por hora, durante um período de aproximadamente 6 h. Ao fim da primeira etapa de extração, as amostras foram submetidas a uma segunda extração com 95 mL de etanol 95%, novamente por aproximadamente 6 h. Ao término do período de extração, o cartucho foi levado para secagem na estufa a 105 °C *overnight*, resfriado em dessecador, pesado e determinado o teor dos extrativos. O teor de extrativos foi determinado pela diferença entre a massa inicial de amostra e a massa de amostra após a extração. Simultaneamente, uma amostra (em triplicata) passou pelo mesmo processo de extração, e foi seca em estufa a 40 °C até apresentar umidade inferior a 10% para ser utilizada na etapa de hidrólise ácida para a quantificação dos carboidratos presente na biomassa.

5.3.3. DETERMINAÇÃO DA LIGNINA E CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS

5.3.3.1. HIDRÓLISE ÁCIDA COM H₂SO₄ 72%

Antes de iniciar o procedimento, foi preparada uma solução padrão de recuperação de açúcares (PRA), a fim de determinar o efeito do ácido ao longo do procedimento em autoclave, sobre soluções de açúcar de concentrações previamente conhecidas, fazendo uma estimativa do teor de açúcares que deveria ser recuperado na amostra, para que se pudesse fazer um fator de correção nos cálculos procedentes. Para o preparo do PRA, foram pesados 0,15 g de glicose, 0,10 g de xilose, 0,05 g de galactose e 0,05 g de arabinose em balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se água destilada.

Previamente, a umidade da palha foi determinada utilizando uma balança Mettler Toledo HE53 Moisture Analyzer. Amostras de aproximadamente 0,3 g da palha livre de extrativos e com umidade inferior a 10% foram pesadas e colocadas em tubos de hidrólise. Foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ 72% às amostras nos tubos de hidrólise e foram incubados e homogeneizados durante uma hora a 30 °C . Após esse período, foram adicionados 84 mL de água ultrapura, diluindo a concentração do ácido para 4%. Simultaneamente, foram preparados tubos de hidrólise com PRA em triplicata. Em cada um deles foram adicionados 10 mL de PRA juntamente a 348 µL de H₂SO₄ 72%, para que a concentração do ácido fosse igual a das amostras. Os tubos foram autoclavados a pressão de 1 bar (121°C) por uma hora. Após esse período, os tubos foram resfriados, e com o auxílio de uma bomba de vácuo as amostras foram filtradas em cadinhos de Gooch, com seu peso seco previamente determinado. A fração sólida foi lavada com água destilada até que a água de lavagem apresentasse aproximadamente pH 6,5 para posteriormente ser determinado o teor de lignina e cinzas insolúveis em ácido. A fração líquida resultante da primeira filtração foi neutralizado com CaCO₃ até atingir pH entre 5 e 6. Em seguida foi filtrada em filtro Millex de 0,45 µm e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação da concentração dos açúcares, e por espectrofotometria, para a determinação de lignina solúvel.

5.3.3.2. DETERMINAÇÃO DA LIGNINA SOLÚVEL EM ÁCIDO

A quantificação da lignina solúvel em ácido foi realizada através da medida da absorbância no espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution com comprimento de onda de 240 nm. A leitura foi realizada utilizando o hidrolisado da etapa 5.3.3.1 diluindo-se o mesmo até que a leitura ficasse entre 0,7-1,0 de absorbância.

5.3.3.3. DETERMINAÇÃO DA LIGNINA E CINZAS INSOLÚVEL EM ÁCIDO

Os cadinhos de Gooch com o material insolúvel obtidos na filtração da hidrólise ácida foram colocados na estufa a 105 °C e, posteriormente, resfriados em dessecador por 15 min e pesados. Depois, foram colocados na mufla a 575 °C para calcinação por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados. O teor de cinzas insolúveis em ácido foi determinado pela diferença de massa entre o cadinho pós estufa e pós mufla. O teor de lignina insolúvel em ácido foi determinado pela diferença gravimétrica.

5.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA* E PRÉ-TRATADA

Foi preparada uma solução-mãe da mistura enzimática a ser utilizada na hidrólise através da diluição das enzimas Celluclast 1.5 L e Novozym 188 (Novozymes) em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, a fim de adicionar à biomassa volumes dessa mistura que correspondessem a uma dosagem de FPase de 20 FPU/g de biomassa e uma relação de FPase/ β -glicosidase de 1FPU/3BGU. As amostras foram pesadas diretamente em erlenmeyers de 50 mL com tampa onde foram acrescidas as devidas proporções da solução mãe além de azida de sódio 0,02%, para evitar o crescimento de micro-organismos, de modo que o meio reacional fosse de 20 g. Com isso, os erlenmeyers foram fechados e incubados em shaker a 200 rpm, aclimatizado a 50 °C, e alíquotas foram retiradas com tempos de reação de 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h, desde que o volume retirado não ultrapassasse 20% do inicial. Cada ponto foi armazenado em eppendorfs, os quais foram levados a banho-maria a 100 °C por 5 min, com o objetivo de inativar as enzimas, e em seguida centrifugados para posterior análise do sobrenadante. As concentrações de glicose de cada amostra foram determinadas no bioanalisador, e com base nisso e no volume recuperado, foi estabelecido uma proporção de diluição a ser feita para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência. O rendimento de conversão de celulose em glicose foi calculado de acordo com a Equação 7, onde C_{glicose} é a concentração de glicose obtida (g/L); f é o fator de conversão de glicose para celulose (0,9); m_t é a massa total do experimento (g); V é o volume líquido do experimento (L); m_{biomassa} é a massa da biomassa no experimento (g); m_{celulose} é a porcentagem de celulose na biomassa determinada no processo de caracterização.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{C_{\text{glicose}} \times f}{\frac{m_t}{V} \times m_{\text{biomassa}} \times m_{\text{celulose}}} \quad (\text{Equação 7})$$

5.5. QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os dissacarídeos e monossacarídeos das amostras obtidas nas etapas de caracterização química e hidrólise enzimática das biomassas *in natura* e pré-tratadas foram quantificados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipado com um detector de índice de refração, utilizando uma coluna Aminex HPX-87P (7,8 mm I.D. x 30 cm, Bio-Rad, EUA) equipada com uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad, EUA) e um sistema de remoção de cinzas (deashing system, Bio-Rad, EUA). O durante o método isocrático foi

utilizado como fase móvel água deionizada em um fluxo constante de 0,6 mL/min e a temperatura do forno da coluna a 80 °C. Os resultados foram obtidos através do software Chromaleon ao comparar os cromatogramas das amostras com a curva analítica contendo faixas de concentrações dos açúcares previamente conhecida: 3 a 0,1875 g/L de glicose, 2 a 0,125 g/L de xilose, 1 a 0,0625 g/L de celobiose, arabinose e galactose.

5.6. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

As análises de microscopia confocal de fluorescência foram realizadas no Centro de caracterização em nanotecnologia (CENANO/INT) utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 710. As amostras foram coradas com safranina (BOND et al., 2008) e vermelho congo (VERBELEN; KERSTENS, 2000) para a identificação da lignina e celulose, respectivamente. Para isso, as amostras foram coradas com 0,1% de Safranin O por 5 minutos e descoradas através de sucessivas lavagens com etanol 50% a 30 °C por 3 minutos, até o desaparecimento da coloração da água de lavagem. Depois a amostra foi corada com 1% de Vermelho Congo e descorada na mesma condição descrita anteriormente. Após a etapa de impregnação dos corantes a amostra foi posta a secar em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, a amostra foi posta em uma lâmina de microscópio e adicionado o reagente *Fluoromount-G*. As imagens de microscopia confocal de celulose e lignina foram coletadas nas regiões espectrais de 497-544 nm e 561-603 nm, respectivamente. As amostras foram observadas usando uma objetiva LD Plano-Neofluar 40x/0,6 Korr M27, com um tamanho de imagem de 1024x1024 pixels. As imagens foram tratadas usando o software Image J.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA LIBERAÇÃO DE GLICOSE DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

Ao longo deste trabalho, foram utilizados dois lotes distintos de palha de cana-de-açúcar, que serão denominados ao longo do texto de “lote 1” (Complexo Bioenergético Itarumã S/A) e “lote 2” (Raízen). De forma a garantir que os resultados obtidos com lotes distintos de uma mesma matéria-prima sejam comparativos entre si, se faz necessário verificar algumas características dos materiais. Isso é especialmente importante quando se trabalha com biomassas vegetais, como a palha de cana-de-açúcar, uma vez que diversos fatores podem interferir na composição e recalcitrância dessas matérias-primas, dependendo da localização da plantação, tempo de colheita, tipo de solo, entre outros (DE VASCONCELOS, 2015). Para tal, ambos os lotes foram caracterizados quimicamente e ensaios de hidrólise enzimática com celulases foram conduzidos, a fim de comparar os percentuais dos principais componentes estruturais e avaliar a recalcitrância nativa das biomassas frente a ação enzimática, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta a composição química quanto às porcentagens de glucana, xilana, galactana, arabinana, lignina solúvel e insolúvel, cinzas e extrativos para os dois lotes de palha de cana-de-açúcar utilizados.

Tabela 5: Composição química de dois diferentes lotes de palha de cana-de-açúcar *in natura* utilizados no presente trabalho.

Componente (%)	lote 1 ^a	lote 2 ^b
Glucana	37,4 ± 1,4	31,5 ± 0,6
Xilana	22,2 ± 1,0	19,0 ± 0,3
Galactana	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Arabinana	2,5 ± 0,1	3,3 ± 0,5
Lignina solúvel	1,3 ± 0,0	3,0 ± 0,2
Lignina insolúvel	18,1 ± 2,2	16,8 ± 0,3
Cinzas	0,5 ± 0,1	8,5 ± 0,5
Extrativos	12,7 ± 0,8	14,4 ± 1,9

^a Palha cedida pelo Complexo Bioenergético Itarumã S/A, ^b Palha cedida pela empresa Raízen.

Ao comparar o lote 1 e o lote 2 pode-se observar que os percentuais de hemicelulose (xilana, galactana e arabinana) e lignina são semelhantes entre amostras, enquanto foi detectada diferença, acima de 5%, entre os percentuais de celulose quantificados. Os resultados obtidos para ambos os lotes estão de acordo com os dados reportados na literatura, uma vez que já foram reportados para a palha de cana-de-açúcar teores de celulose variando de 31 a 44%, de 24 a 31% para a hemicelulose e 16 a 23% para a lignina (HERNÁNDEZ-PÉREZ; DE ARRUDA; FELIPE, 2016; KUSTER MORO et al., 2017b; PRATTO et al., 2016; SANTOS et al., 2012).

Como se observou uma diferença no teor de celulose entre os dois lotes utilizados, um experimento de hidrólise enzimática comparativo de amostras de ambos os lotes foi realizado (Figura 11).

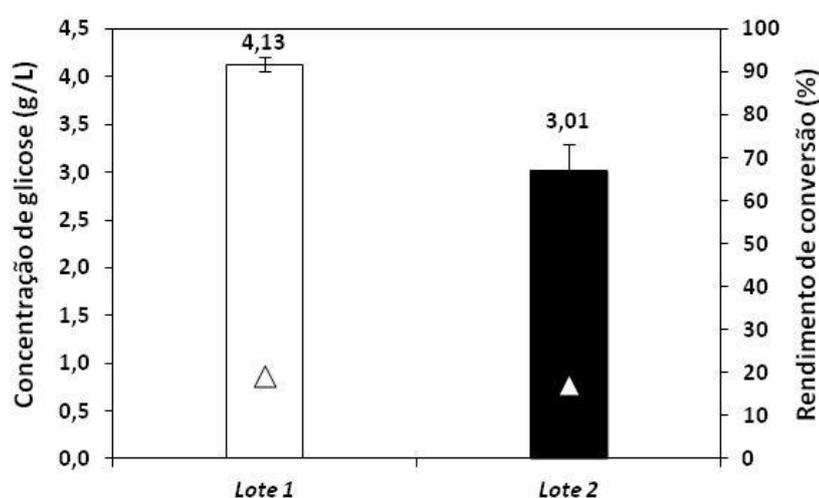


Figura 11: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* provenientes dos lotes 1 e 2, e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲).

Como esperado, a concentração de glicose liberada a partir do lote 1 (4,1 g/L) foi maior que do lote 2 (3,0 g/L), uma vez que o conteúdo de celulose disponível no primeiro lote é maior. No entanto, se compararmos os rendimentos de conversão da celulose em glicose, observa-se que níveis semelhantes foram atingidos, equivalentes a 19% e 17% para o lote 1 e 2, respectivamente. Desse modo, concluiu-se que, apesar dos teores de glicose serem distintos entre os dois lotes, a recalcitrância das amostras frente a ação enzimática foi semelhante. Tais resultados estão coerentes com outros estudos que reportaram a hidrólise da palha de cana-de-açúcar *in natura*, visto que a hidrólise de biomassas lignocelulósicas *in natura* não apresentam rendimentos de conversão de celulose em glicose superiores a 20%, devido à recalcitrância da amostra.

6.2. AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDO (PTA), HIDROTÉRMICO (PTH) E BIOLÓGICO (PTB) DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

No presente trabalho primeiramente foram avaliados os tratamentos ácido (PTA), hidrotérmico (PTH) e biológico (PTB) da palha de cana-de-açúcar. O PTA e o PTH têm como características solubilizar a fração hemicelulósica, enquanto o PTB tem a como objetivo a remoção da lignina presente na biomassa (SILVEIRA et al., 2015). Deste modo, em uma segunda etapa do trabalho, foi avaliada a associação de tais métodos de pré-tratamento, com a motivação de aumentar a disponibilidade e a digestibilidade enzimática da celulose na palha pré-tratada, através da remoção combinada de lignina e hemicelulose. Para isso, primeiro foi realizado a seleção entre PTA e PTH. Na sequência, foi selecionado um fungo potencial para ser aplicado no PTB e, em seguida, foi realizada a associação do tratamento biológico com o método de remoção de hemicelulose selecionado.

6.2.1. PTA E PTH: SELEÇÃO DO TRATAMENTO MAIS EFICIENTE

O PTA e o PTH foram realizados com amostras de palha de cana-de-açúcar do lote 1. As condições de tempo e temperatura do PTH foram baseadas nos estudos de Paredes e colaboradores (DE SOUSA PAREDES et al., 2015). As condições usadas no PTA seguiram o trabalho de Moutta e colaboradores, tais como: tempo, relação sólido:líquido e concentração de ácido (MOUTTA et al., 2012). Deste modo, o presente trabalho conduziu os experimentos nas mesmas condições anteriormente reportadas. A avaliação desses tratamentos teve como objetivo selecionar o mais efetivo quanto à remoção da hemicelulose e aumento da digestibilidade enzimática da palha de cana-de-açúcar para sua posterior associação ao PTB. Além disso, foram avaliadas duas diferentes granulometrias da palha de cana-de-açúcar, cortada (aproximadamente 2 cm) e moída (850 - 180 μ m) (Figura 12), com o intuito de analisar a possibilidade do tamanho do material de partida interferir na efetividade dos tratamentos e na hidrólise enzimática. Para isso, foi realizada a caracterização química e a hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas.



Figura 12: Amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* nas duas granulometrias analisadas, A) cortada (aproximadamente 2 cm) e B) moída (850 - 180 μm)

A Tabela 6 apresenta a composição química quanto às porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina para as amostras *in natura* e após o PTA e o PTH das amostras cortadas e moídas.

Tabela 6: Composição química para as amostras *in natura* e após os tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH) da palha de cana-de-açúcar para as amostras cortadas (C) e moídas (M).

Amostra	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
<i>in natura</i> ¹	37,4 \pm 1,4	25,5 \pm 1,3	19,4 \pm 2,4
PTA-C	55,3 \pm 0,4	9,7 \pm 0,3	30,8 \pm 1,3
PTA-M	56,4 \pm 0,2	10,0 \pm 0,4	30,1 \pm 0,6
PTH-C	55,4 \pm 0,9	8,0 \pm 0,4	30,4 \pm 1,0
PTH-M	60,9 \pm 2,0	8,1 \pm 0,3	30,5 \pm 1,9

¹ Amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* do lote 1.

Ao comparar a composição da amostra *in natura* com as pré-tratadas pode-se observar a redução do conteúdo da fração hemicelulósica, indicando que os dois tratamentos foram eficientes na remoção desta fração. Tal resultado já era esperado, visto que, ambos os tratamentos apresentam como característica hidrolisar a hemicelulose e solubilizar os açúcares provenientes da mesma (TEIXEIRA et al., 2014). Para realizar a comparação entre os tratamentos e compará-los com os já descritos na literatura, é necessário calcular sua composição baseado na porcentagem de sólidos recuperados após os pré-tratamentos. Como

tal recuperação não foi quantificada no presente estudo, não foi possível calcular o percentual de hemicelulose solubilizada pelos pré-tratamentos, sendo encontradas remoções na literatura entre 80% e 95% de hemicelulose após o PTA e o PTH (MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014b; SANTOS et al., 2014). Apenas com a análise composicional não é possível pressupor qual amostra apresentará a maior liberação de glicose durante a hidrólise enzimática, devido à influência de outros fatores na digestibilidade da celulose. Um estudo avaliou as modificações proporcionadas por diferentes pré-tratamentos da biomassa de palha de cana-de-açúcar; os autores observaram que o PTH foi capaz de reduzir a cristalinidade da celulose de forma mais efetiva quando comparado com o PTA (CARVALHO et al., 2015). Como tal análise não foi realizada, seria interessante futuramente avaliar a cristalinidade das amostras pré-tratadas com o objetivo de confirmar se a hipótese proposta por Carvalho se aplica as nossas condições de tratamento.

Vale destacar, que após avaliar a composição das biomassas pré-tratadas, observou-se que apenas o teor de celulose foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre as amostras cortadas e moídas submetidas ao mesmo tratamento, sendo os conteúdos de hemicelulose e lignina iguais ($p > 0,05$). Tal fato nos indica que a remoção da hemicelulose não é influenciada pelo tamanho do material de partida nas condições estudadas. Assim, não haveria a necessidade de gasto energético para a moagem da biomassa em granulometria mais fina. Tal resultado é de extremo interesse do ponto de vista industrial por poder proporcionar uma economia de energia empregada na moagem (VIDAL et al., 2011). Kim e Lee (2002) (KIM, 2002) relataram que, dependendo do tempo de reação, a difusão do ácido pode influenciar na composição da biomassa pré-tratada de forma mais expressiva que a granulometria da amostra em si. Além disso, o mesmo estudo relatou uma relação entre o tamanho crítico, a partir do qual a granulometria passa a influenciar nos resultados, com o valor da difusão do ácido durante o tratamento. Os fenômenos observados por Kim e Lee podem estar relacionados com os resultados obtidos no presente trabalho, visto que, não foram observadas diferenças composicionais entre o tamanho da amostra, tudo indica que o tamanho de partícula crítico não foi alcançado.

Após constatar que a composição química das biomassas pré-tratadas foram semelhantes, a hidrólise enzimática das amostras foi realizada com o objetivo de avaliar o aumento da digestibilidade enzimática da celulose proporcionada pelos tratamentos. Para isso,

foi quantificada a concentração de glicose liberada após 72 horas de hidrólise enzimática das amostras *in natura* e após o PTA e o PTH (Figura 13).

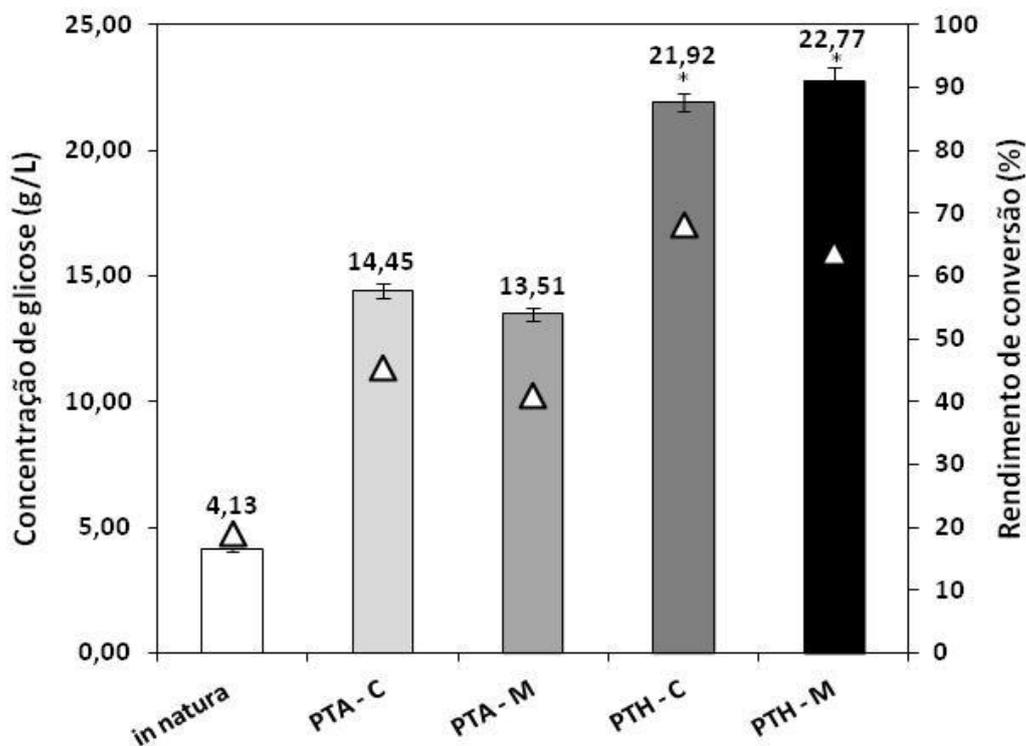


Figura 13: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* e após os tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH), para as amostras cortadas (C) e moídas (M), e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲). *Concentrações de glicose estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Concentrações superiores de glicose foram obtidas na hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas em relação à palha *in natura*. Isso confirma que ambos os tratamentos foram eficazes em deixar a celulose mais disponível à ação enzimática. Foram obtidos diferentes rendimentos de conversão para o PTH e para o PTA, 68% e 45%, respectivamente. O PTH apresenta características semelhantes ao pré-tratamento com explosão a vapor, assim, podemos comparar os resultados obtidos por Rocha e colaboradores (2015) (ROCHA et al., 2015). Os autores obtiveram maiores rendimentos ao comparar o tratamento com explosão a vapor ao PTA no bagaço de cana-de-açúcar, 71% e 56%, respectivamente, corroborando com os resultados do presente trabalho. Como apresentado na Tabela 2, a disponibilidade de celulose entre os tratamentos foi semelhante, entretanto maiores concentrações de glicose foram obtidas com o PTH, tal fato está relacionado ao observado por Carvalho (2015), ao verificar que o PTH tem a capacidade de promover maior redução da cristalinidade da celulose, quando comparado com o PTA, aumentando a digestibilidade da fração celulolítica e a efetividade das enzimas durante a hidrólise enzimática.

A concentração de glicose obtida a partir das duas granulometrias do PTH foi estatisticamente igual ($p > 0,05$). Ao hidrolisar a palha de trigo após o tratamento “wet oxidation” realizado com diferentes tamanhos de partículas, foi observado que maiores concentrações de glicose foram obtidas a partir de tamanhos de partículas menores. Ao compararem as amostras com tamanhos de 53-149 μm , 250-500 μm e 707-1000 μm com a amostra de referência de 2-4 cm, maiores concentrações de glicose foram obtidas nas duas menores granulometrias analisadas. Entretanto, os autores relataram que tamanhos de partículas próximos uma das outras não alteraram a concentração de glicose obtida (PEDERSEN; MEYER, 2009). Durante o PTH além da solubilização da fração hemicelulósica também ocorre à redução do tamanho do material (BEHERA et al., 2014). Podemos observar na Figura 14 que as amostras pré-tratadas visualmente apresentam o mesmo tamanho, assim, o material a ser hidrolisado apresenta a mesma granulometria, não interferindo na obtenção de glicose.



Figura 14: Amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* e após o PTH, cortadas e moídas. A) *in natura* cortada; B) *in natura* moída; C) PTH cortado; D) PTH moído.

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o PTH apresentou maior eficiência dentre os dois tratamentos analisados, por isso, foi selecionado a ser associado ao PTB. Em relação à granulometria das amostras, foi observado que, tanto para a composição das amostras como para a liberação de glicose durante a hidrólise enzimática, não foi observado diferença entre as amostras cortadas e moídas, logo, os experimentos subsequentes foram realizados com amostras cortadas.

6.2.2. PTB DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

6.2.2.1. SELEÇÃO DE POTENCIAIS FUNGOS A SEREM APLICADOS NO PTB

Nesta etapa do trabalho foram avaliados sete fungos com potencial a serem aplicados no PTB, entre eles: *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Paraconiothyrium estuarinu*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Westerdykella dispersa* (Figura 15).

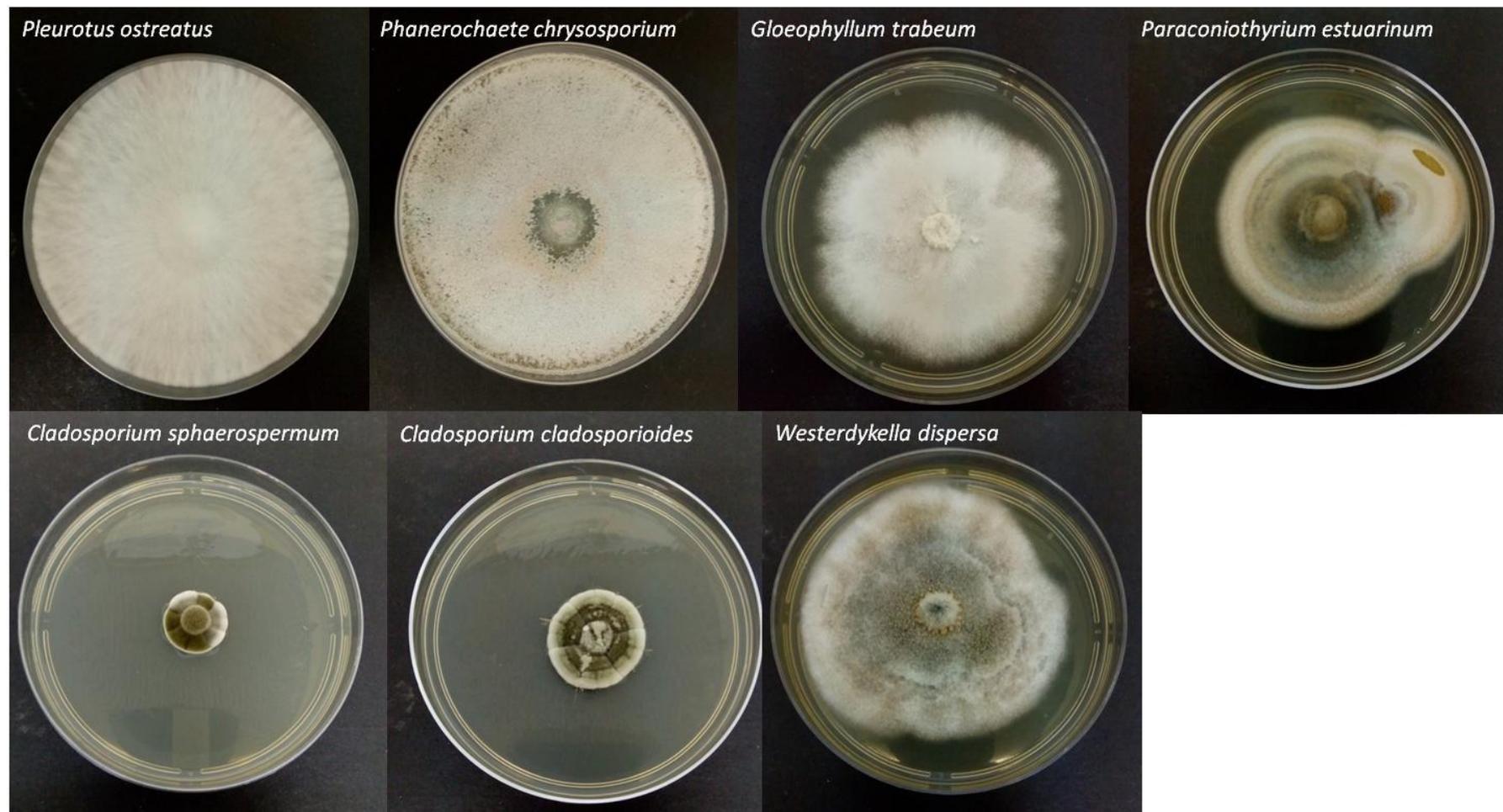


Figura 15: Crescimento dos fungos em placa de Petri contendo o meio Agar batata após 7 dias de incubação.

A seleção foi realizada com base na perda de massa da palha de cana-de-açúcar proporcionada pelos fungos após 20 dias de incubação. Esta perda mássica está diretamente relacionada ao consumo dos componentes da biomassa, sendo assim, quanto maior a perda mássica maior a remoção dos constituintes da amostra. A Tabela 7 apresenta os resultados de perda mássica proporcionada pelos fungos avaliados.

Tabela 7: Perda de massa proporcionada na palha de cana-de-açúcar pelos fungos *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *G. trabeum*, *P. estuarinu*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* e *W. dispersa* após 20 dias de pré-tratamento biológico.

Fungo	Perda mássica (%)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2,7 ± 0,1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3,0 ± 0,9
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	26,0 ± 3,1
<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	1,7 ± 1,7
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	24,8 ± 1,8
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13,3 ± 0,7
<i>Westerdykella dispersa</i>	2,6 ± 0,8

Com base nos resultados apresentados na Tabela 8, as linhagens *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Paraconiothyrium estuarinu* e *Westerdykella dispersa* não foram utilizados nas etapas subsequentes por terem proporcionado perdas mássicas inferiores a 3%, pois resultariam em uma baixa remoção dos componentes da biomassa. Por outro lado, *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* foram selecionados para serem utilizados no PTB por terem proporcionado perdas mássicas superiores, equivalentes a 26%; 24,8% e 13,3%, respectivamente. Diferente de *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*, os fungos não selecionados para o PTB foram avaliados por serem pouco descritos na literatura e por serem utilizados para estudos de degradação de corantes. Corantes apresentam estrutura complexa e devem ser estáveis, química e termicamente. Estas características se assemelham à lignina e para sua degradação são necessárias enzimas extracelulares oxidativas, tais como as ligninases, que são também de interesse para o PTB (MARTINS et al., 2003). Por isso, em um primeiro momento, a avaliação desses fungos se mostrou interessante. Entretanto, esses micro-organismos pertencem à divisão dos ascomicetos e os maiores decompositores de material

vegetal são os basidiomicetos, divisão a qual pertencem os fungos selecionados, *G. trabeum*, *P. chrysosporium* e *P. ostreatus* (HATAKKA; HAMMEL, 2011b; MARTÍNEZ et al., 2005).

6.2.2.2. PTB COM OS FUNGOS SELECIONADOS

O PTB utilizando os fungos *G. trabeum* e *P. chrysosporium* foi realizado na palha *in natura* do lote 2 e com o fungo *P. ostreatus* realizado na palha *in natura* do lote 1. As amostras pré-tratadas foram submetidas à caracterização química para determinar o teor de carboidratos e lignina presentes nas amostras e o percentual de remoção dos componentes durante o PTB. Para ser possível determinar o percentual de redução de cada componente foi necessário levar em conta a quantidade de sólidos recuperada após o PTB. A Tabela 8 apresenta os resultados quanto à composição das amostras tratadas, a perda mássica e o percentual de remoção dos componentes proporcionada por cada fungo e a seletividade relativa para a remoção de cada componente da biomassa. A Figura 16 apresenta um esquema para facilitar a compreensão dos dados de composição das amostras pré-tratadas.

Tabela 8: Composição química para as amostras pré-tratadas, a perda de massa e o percentual de remoção dos componentes proporcionada pelos fungos *Gloeophyllum trabeum* (P.Gt), *Phanerochaete chrysosporium* (P.Pc) e *Pleurotus ostreatus* (P.Po) após o PTB e a seletividade relativa de remoção apresentada pelos fungos.

Amostra	Perda mássica (%)	Composição (g/100 g biomassa)			Composição (g/100 g palha <i>in natura</i>)			Percentual de remoção (%)			Seletividade relativa (SRel)*		
		Cel ^a	Hem ^b	Lig ^c	Cel ^a	Hem ^b	Lig ^c	Cel ^a	Hem ^b	Lig ^c	Cel ^a	Hem ^b	Lig ^c
<i>in natura</i> ¹	-	37,4 ± 1,4	25,5 ± 1,3	19,4 ± 2,4	37,4 ± 1,4	25,5 ± 1,3	19,4 ± 2,4	-	-	-	-	-	-
P.Po	17,9 ± 0,7	43,3 ± 0,3	25,6 ± 0,5	18,9 ± 0,5	35,6 ± 0,2	21,0 ± 0,3	15,5 ± 0,5	4,8	17,6	20,2	0,18	0,44	0,38
<i>in natura</i> ²	-	31,5 ± 0,6	23,8 ± 1,1	19,8 ± 0,5	31,5 ± 0,6	23,8 ± 1,1	19,8 ± 0,5	-	-	-	-	-	-
P.Gt	25,3 ± 4,1	30,5 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,2 ± 0,3	22,8 ± 0,1	15,3 ± 0,2	14,3 ± 0,2	27,6	35,3	27,5	0,38	0,37	0,24
P.Pc	38,2 ± 1,6	36,4 ± 1,0	27,9 ± 0,7	19,0 ± 0,4	22,5 ± 0,7	17,2 ± 0,4	11,8 ± 0,2	28,4	27,3	40,5	0,38	0,28	0,34

^a Celulose; ^b Hemicelulose; ^c Lignina; ¹ Amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* do lote 1; ² Amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* do lote 2.* A seletividade relativa (SRel) foi calculada baseado nas porcentagens de remoção dos polissacarídeos e lignina. P.Gt, palha pré-tratada com o fungo *Gloeophyllum trabeum*. P.Pc, palha pré-tratada com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. P.Po, palha pré-tratada com o fungo *Pleurotus ostreatus*.

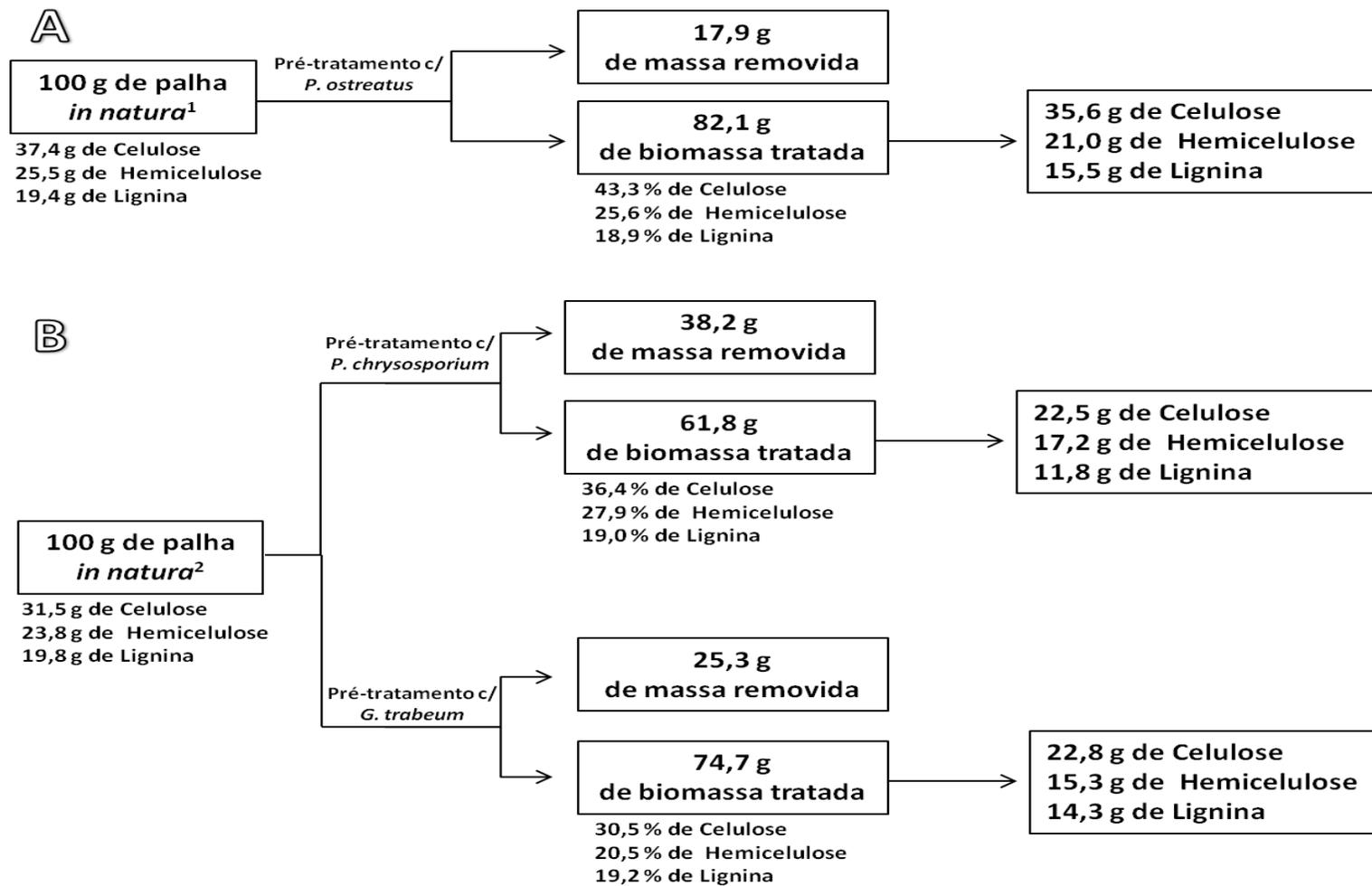


Figura 16: Esquema determinando a composição química das biomassas pré-tratadas com os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Gloeophyllum trabeum*.

Podemos observar que após os 20 dias de PTB os três fungos avaliados foram capazes de reduzir o teor de todos os componentes da biomassa, em diferentes proporções. Era esperado que *P. chrysosporium* e *P. ostreatus* removessem de forma seletiva a lignina, visto que, são fungos da podridão branca e que *G. trabeum* apresentasse remoção majoritária de hemicelulose, por se tratar de um fungo da podridão parda (MARTÍNEZ et al., 2005). Por ter proporcionado a maior perda mássica após o PTB, *P. chrysosporium* promoveu elevada remoção dos componentes da amostra, mas sem elevada seletividade para a lignina, visto que, também removeu 28,6% de celulose. O fungo *G. trabeum* não apresentou seletividade para um determinado componente da amostra, pois removeu 27,7% de celulose, 35,7% de hemicelulose e 27,6% de lignina. *P. ostreatus* foi o fungo avaliado a proporcionar a menor perda mássica e, por consequência, removeu a menor quantidade dos componentes da palha. Contudo, foi o fungo que apresentou os resultados mais promissores, mesmo proporcionando a menor remoção de lignina (20%), visto que, consumiu apenas 4,9% de celulose, deixando a amostra pré-tratada com o maior conteúdo de celulose entre as analisadas. A diferença da efetividade dos fungos durante o PTB foi devido à diferença das seletividades apresentadas. Ao comparar o fungo *P. chrysosporium* com *P. ostreatus*, que proporcionaram a maior e a menor remoção de lignina, respectivamente, observa-se que mesmo removendo menor porcentagem de lignina, *P. ostreatus* apresentou maior seletividade a este componente. A diferença entre esses dois micro-organismos se deu pela seletividade aos polissacarídeos, visto que, *P. ostreatus* apresentou maior seletividade para a hemicelulose e baixa seletividade a celulose, enquanto *P. chrysosporium* não apresentou maior seletividade a um composto específico. O consumo de todos os componentes da palha pelo *P. chrysosporium* foi um resultado inesperado, visto que ele é um fungo de podridão branca e deveria apresentar seletividade para a remoção da lignina da amostra. Tal fato pode ser explicado pela divisão dentro dos fungos da podridão branca. Nela existem os chamados “podridão branca simultânea” que degradam a celulose, hemicelulose e a lignina de forma relativamente igual, e os “podridão branca seletivo” que apresentam seletividade para degradar a hemicelulose e a lignina, causando pouca alteração no conteúdo de celulose (GOODELL; QIAN; JELLISON, 2008).

A Figura 17 apresenta as microscopias confocais de fluorescência para as amostras *in natura* (A), e após o PTB com *P. chrysosporium* (B), *P. ostreatus* (C) e *G. trabeum* (D). Estruturas com predominância da cor vermelha indicam maior quantidade de lignina, enquanto a cor verde representa a celulose presente na amostra. Assim, a amostra tratada com *P. chrysosporium* apresenta maior conteúdo de lignina exposto e baixo teor de celulose. Em contrapartida, *P. ostreatus* removeu a lignina deixando a celulose exposta, como observado na região com verde intenso. Observa-se que os fungos apresentam mecanismos distintos para a degradação da amostra. Enquanto *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* causam poros na parede celular da palha para acessar o interior da célula e promoverem sua degradação, *G. trabeum* modificou a estrutura da parede causando desorganização com a criação de poucos poros. Observa-se também que *P. chrysosporium* foi o fungo a consumir mais regiões da amostra, visto que, foram observadas grandes lacunas na estrutura, indicando que todo aquele material foi removido pelo fungo.

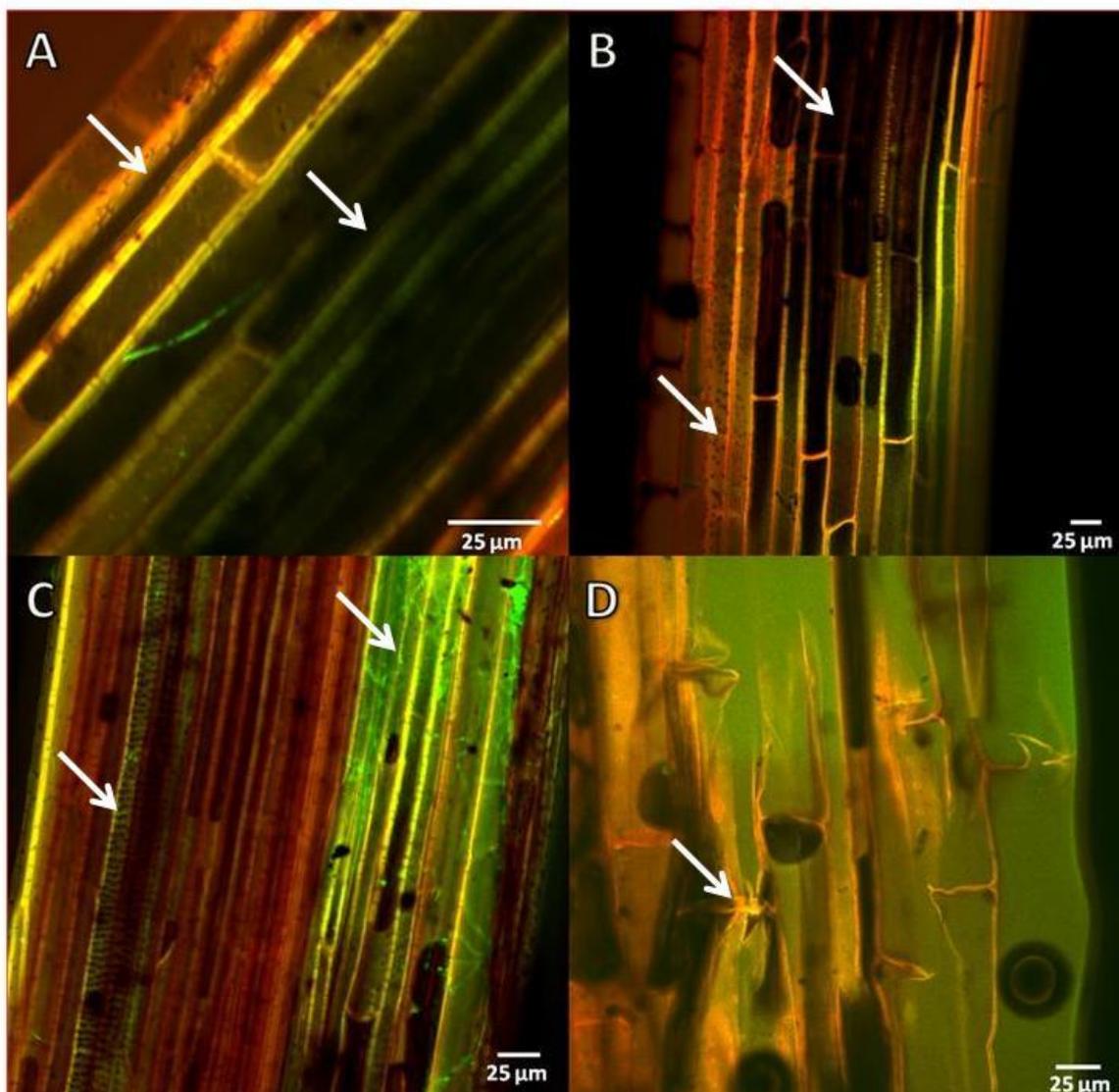


Figura 17: Microscopia confocal de fluorescência da amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* (A) e após os PTB com os fungos *Phanerochaete chrysosporium* (B), *Pleurotus ostreatus* (C) e *Gloeophyllum trabeum* (D).

A remoção dos constituintes da palha é realizada através das enzimas secretadas pelos fungos durante o PTB, que degradam os compostos a substâncias de menor massa molecular para suprir a necessidade nutricional dos fungos durante seu desenvolvimento. Se tratando de biomassas lignocelulósicas, as enzimas necessárias para a sua degradação são as pertencentes aos complexos celulolítico e ligninolítico. A Tabela 9 apresenta as atividades enzimáticas das enzimas celulolíticas (FPase e β -glicosidase) e ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase) secretadas pelos fungos durante o PTB.

Tabela 9: Atividade das enzimas celulolíticas (FPase e β -glicosidase) e ligninolíticas (Lacase e Manganês Peroxidase (MnP)) secretadas pelos fungos *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Gloeophyllum trabeum* após 20 dias de tratamento biológico.

Atividade enzimática (U/g)	Dias	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>G. trabeum</i>
FPase	5	0,04	0,23	0,30
	10	0,18	0,41	0,48
	15	0,12	0,36	0,75
	20	0,02	0,19	0,55
β-glicosidase	5	0,11	0,15	0,39
	10	0,27	0,26	0,57
	15	0,21	0,20	0,66
	20	0,18	0,15	0,57
Lacase	5	0,17	0	0
	10	0,13	0	0
	15	0,10	0	0
	20	0,05	0	0
MnP	5	0,05	0,10	0,10
	10	0,10	0,11	0,10
	15	0,13	0,13	0,13
	20	0,13	0,13	0,20

A degradação da celulose é realizada pelas enzimas celulolíticas, assim, pode-se observar que os fungos que proporcionaram as maiores degradações da celulose, *P. chrysosporium* e *G. trabeum*, apresentaram maior atividade de FPase e β -glicosidase, quando comparados com o fungo *P. ostreatus* que proporcionou apenas 4% de degradação. Para os três fungos analisados as atividades de FPase e β -glicosidase apresentaram o mesmo padrão, suas atividades máximas foram detectadas entre o 10° e o 15° dia de incubação. Isso ocorre

devido aos primeiros dias de tratamento o fungo estar começando a colonizar a palha, deste modo, ele começa a se reproduzir lentamente tendo o máximo de atividade após a colonização total da palha e as atividades vão diminuindo devido à redução do substrato para sua ação por causa do consumo para o desenvolvimento do fungo. As maiores atividades foram quantificadas para o fungo da podridão parda *G. trabeum*, onde no 15° de cultivo apresentou 0,75 U/g e 0,66 U/g de palha, para FPase e β -glicosidase, respectivamente. Comparando as atividades máximas quantificadas de FPase e β -glicosidase, observa-se que o fungo *P. ostreatus* apresentou atividades 7 vezes menor que *G. trabeum*, e atividade de FPase cerca de 4 vezes menor que *P. chrysosporium*. Por isso *P. ostreatus* foi responsável por promover a menor porcentagem de remoção de celulose. A remoção da lignina é feita pelas enzimas do complexo ligninolítico, composto principalmente pelas enzimas lacase e as peroxidases (manganês peroxidase, lignina peroxidase e versátil peroxidase) (PERALTA et al., 2017), no presente estudos apenas foram quantificadas as atividades de lacase e manganês peroxidase. Assim, observa-se que os fungos *P. chrysosporium* e *G. trabeum*, não apresentaram atividade de lacase, enquanto que *P. ostreatus* apresentou atividade máxima no seu 5° dia de PTB de 0,17 U/g de palha e com o decorrer dos dias de cultivo a atividade foi decaindo até 0,05 U/g de palha, no 20° dia. Ao contrário da enzima lacase, os três fungos avaliados no PTB apresentaram atividade de manganês peroxidase, sendo sua atividade crescente com o passar dos dias de incubação. As atividades de MnP foram praticamente iguais para os três fungos ao longo do PTB, apenas diferenciando no 20° dia, quando *G. trabeum* apresentou 0,20 U/G, enquanto *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* apresentaram 0,13 U/g de palha. Deste modo acredita-se que a maior degradação proporcionada pelo fungo *P. chrysosporium* esteja ligada a atividade de lignina peroxidase, visto que apresentou maior remoção da lignina com as mesmas atividades quantificadas dos outros dois fungos avaliados. A presença das enzimas ligninolíticas secretadas pelos fungos avaliados está de acordo com o descrito na literatura, visto que esses micro-organismos podem ser distribuídos em grupos de acordo com as enzimas produzidas. Em sua maioria, é relatado que *P. chrysosporium* apenas apresenta as enzimas peroxidases com a ausência da lacase, enquanto que *P. ostreatus* apresenta a lacase e pelo menos uma das peroxidases (PERALTA et al., 2017). Após realizar a fermentação em estado sólido da palha de sorgo utilizando os fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* por 20 dias, foram quantificadas as atividades de FPase, β -glicosidase e lacase, onde o fungo *P. ostreatus* apresentou 1,32 U/g; 0,18 U/g e 5,65 U/g, respectivamente. Atividades 10 vezes maior de FPase, a mesma atividade de β -glicosidase e atividade de lacase cerca de 40 vezes

maior do que as quantificadas no presente trabalho. Atividades superiores de FPase e β -glicosidase, além de atividade de lacase (0,70 U/g) foram quantificadas no extrato enzimático do fungo *P. chrysosporium* (CARDOSO et al., 2018). Assim como no presente trabalho, não foi detectada atividade de lacase após realizar a fermentação em estado sólido por 14 dias com o fungo *P. chrysosporium*, entretanto foi quantificada atividade de manganês peroxidase de 6,32 U/g de cana-de-açúcar, em torno de 45 vezes superior a determinada no presente trabalho. Também foi avaliado o fungo *Pleurotus sp.* tendo apresentado atividade de lacase e manganês peroxidase cerca de 100 e 23 vezes superiores as determinadas no presente trabalho, respectivamente (MAZA et al., 2014). A diferença das atividades observadas pode ser devido a utilização de fungos isolados da própria cana-de-açúcar por Maza e colaboradores (2014), fazendo com que esses micro-organismos já estejam adaptados a degradar tal biomassa.

Com o objetivo de analisar o quanto as modificações promovidas pelos fungos durante o PTB alteraram a digestibilidade da celulose, foi realizado o experimento de hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas. A Figura 18 apresenta a concentração de glicose obtida após 72 horas de hidrólise enzimática e os respectivos rendimentos de conversão de celulose em glicose.

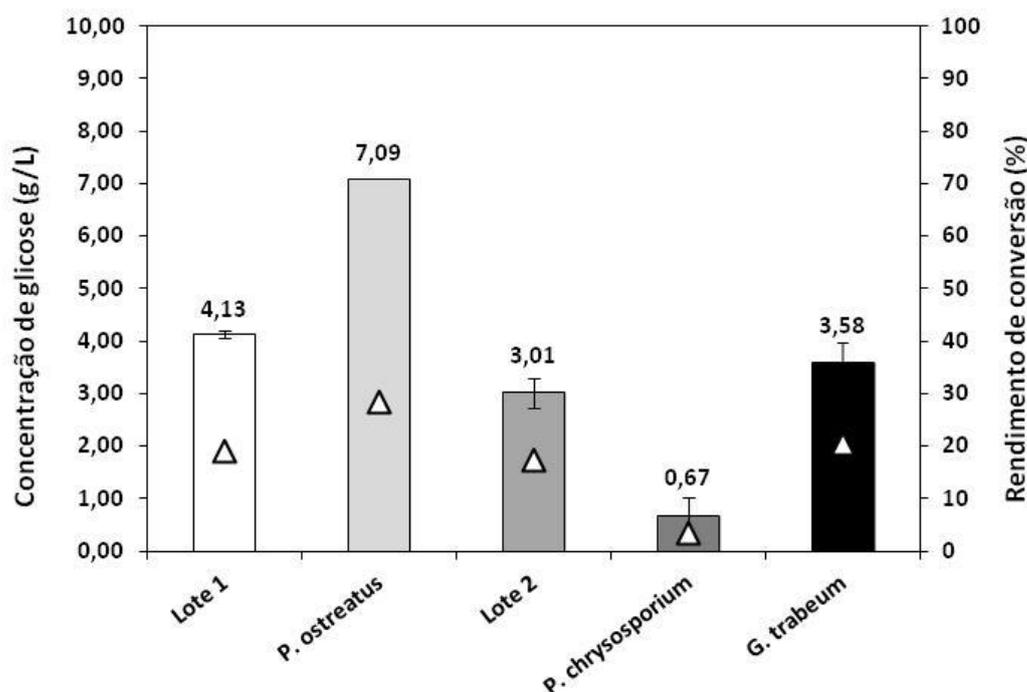


Figura 18: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática de amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* dos lotes 1 e 2 e após o PTB com os fungos *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*, e o rendimento de conversão de celulose em glicose (▲).

As amostras pré-tratadas com os fungos *P. chrysosporium* e *G. trabeum* apresentaram teores de celulose disponíveis similares, entretanto, os resultados de concentração de glicose obtidos na hidrólise enzimática foram superiores para a amostra tratada com *G. trabeum*. Tal fato pode ter ocorrido devido ao fungo de podridão parda ter reduzido a cristalinidade da celulose da sua amostra, aumentando a digestibilidade da mesma, enquanto o fungo da podridão branca não apresentou tal capacidade (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005). Dentre os fungos analisados durante o PTB, *P. ostreatus* foi o único a proporcionar modificações na palha de forma a aumentar a disponibilidade e a digestibilidade da celulose, aumentando a liberação de glicose durante a hidrólise enzimática, por isso foi selecionado a ser associado ao PTH.

6.3. ASSOCIAÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO COM O TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Após o PTH ter sido selecionado para a associação e o fungo *P. ostreatus* ter sido selecionado para ser utilizado no PTB, foram testadas duas formas de associação: PTH seguido do PTB e PTB seguido do PTH. Na associação em que foi realizado primeiro o PTH, a amostra apresentou baixo teor de carboidratos disponíveis para o consumo e desenvolvimento do fungo durante o PTB, impedindo a realização desta associação. Deste modo, os resultados obtidos e que serão discutidos são referentes à associação do PTB seguido do PTH. Para determinar as modificações estruturais promovidas pela associação, foi necessário realizar a caracterização química das amostras pré-tratadas. A Tabela 10 apresenta a composição química para as amostras pré-tratadas.

Tabela 10: Composição química para as amostras após o tratamento biológico com o fungo *Pleurotus ostreatus* (PTB), com o tratamento hidrotérmico (PTH) e a associação do tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico (PTBH).

Pré-tratamento	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
<i>in natura</i> ¹	37,4 ± 1,4	25,5 ± 1,3	19,4 ± 2,4
PTB	43,3 ± 0,3	25,6 ± 0,5	18,9 ± 0,5
PTH	55,4 ± 0,9	8,0 ± 0,4	30,4 ± 1,0
PTBH	68,3 ± 2,9	5,2 ± 0,2	23,8 ± 1,3

¹ Amostra de palha de cana-de-açúcar *in natura* do lote 1

Podemos observar que ao realizar a associação do PTB seguido do PTH, conseguimos potencializar a remoção da fração hemicelulósica, visto que, com apenas o PTH a biomassa apresentou 8% de hemicelulose e após a associação passou a apresentar um percentual menor (5,2%). O aumento da redução da hemicelulose nos indica que, ao realizar o PTB e remover a lignina da amostra, a fração hemicelulósica foi mais facilmente solubilizada durante o PTH. O mesmo efeito foi observado ao pré-tratar a biomassa de *Populus tomentosa* utilizando os fungos *Lenzites betulina* e *Trametes ochracea* durante 4 semanas de PTB e associá-lo ao PTH em diferentes condições. Os autores relataram que o conteúdo de hemicelulose foi mais facilmente solubilizado em todas as condições de PTH analisadas, consequentemente aumentando a obtenção de glicose durante a hidrólise enzimática (WANG et al., 2012). Após constatarmos a maior remoção da hemicelulose e disponibilidade da celulose na amostra pela associação dos tratamentos, esperávamos obter maior concentração de glicose durante a hidrólise quando comparada com a amostra do PTH. A Figura 19 apresenta a concentração de glicose liberada após 72 horas de hidrólise enzimática das amostras *in natura* e após o PTB, PTH e PTBH.

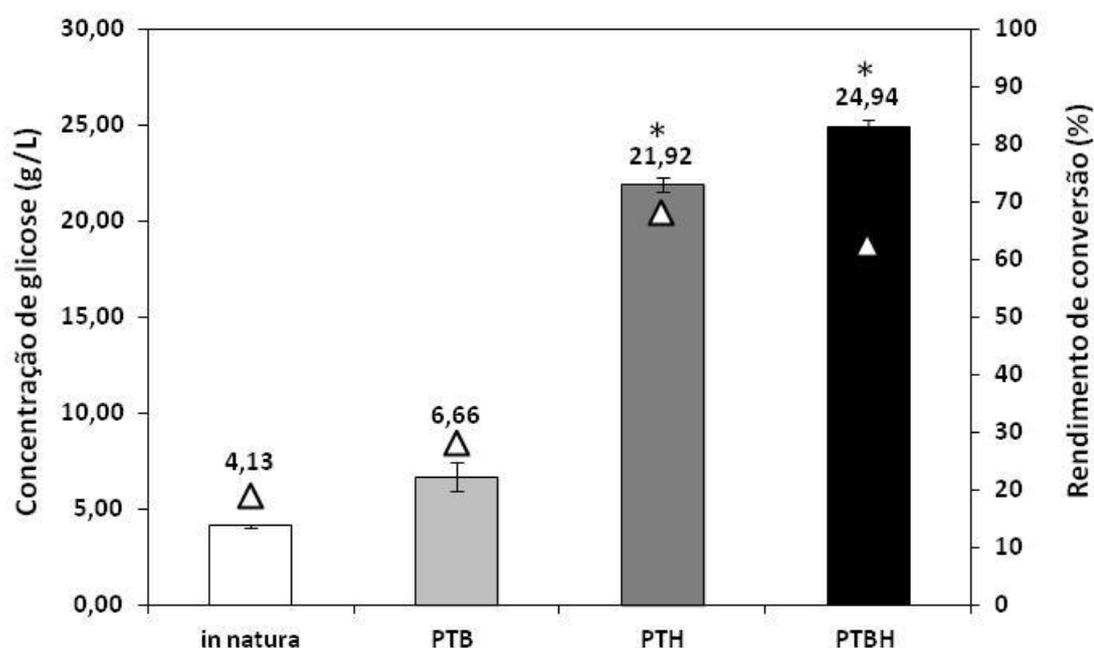


Figura 19: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática das palhas de cana-de-açúcar “*in natura* 1” e após o tratamento biológico com o fungo *Pleurotus ostreatus* (PTB), com o tratamento hidrotérmico (PTH) (170 °C por 40 minutos) e a associação biológico seguido do hidrotérmico (PTBH), além do rendimento de conversão de celulose em glicose (▲). * liberações de glicose estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Após a hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas, podemos observar que foram obtidas maiores concentrações de glicose com amostras da associação do PTB seguido do PTH. As concentrações de glicose obtidas após o PTH e da associação do PTB seguido do PTH são estatisticamente diferentes, mostrando assim, que a associação dos tratamentos possibilitou uma hidrólise enzimática mais eficiente e com maior liberação de glicose.

Ensilagem é uma técnica de PTB que vem sendo estudada e empregada durante o armazenamento úmido da biomassa lignocelulósica (AMBYE-JENSEN et al., 2013b). Ao realizarem a ensilagem com posterior aplicação do PTH no bagaço de cana-de-açúcar, foram obtidas maiores concentrações de glicose durante a hidrólise enzimática da amostra após a associação, comparada com a mesma condição do PTH. Também foi relatado pelos autores a obtenção de rendimentos superiores de etanol, mostrando a aplicabilidade no processo de produção de etanol de segunda geração (AMBYE-JENSEN et al., 2018). Esse mesmo grupo de pesquisa demonstrou em 2013 que ao realizar a ensilagem associada ao PTH da palha de trigo foi possível reduzir a temperatura do PTH em 20 °C e manter a concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática (AMBYE-JENSEN et al., 2013a). Levando em conta os resultados obtidos no presente trabalho e a possibilidade de redução da temperatura do PTH ao associá-lo com o PTB, foram analisadas novas condições de PTH.

6.3.1. AVALIAÇÃO DO PTH EM DIFERENTES CONDIÇÕES, DA ASSOCIAÇÃO DO PTB COM PTH E O FATOR DE SEVERIDADE COMBINADA

O fator de severidade combinada nos indica a chance dos carboidratos presentes na amostra serem convertidos em furfural e hidroximetilfurfural, reduzindo o teor de açúcares na biomassa tratada. Esse fator leva em consideração o pH da fração líquida produzida durante o PTH, a temperatura e o tempo de processo. Quanto maior esse fator, mais agressivo é o tratamento para a amostra (CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010a). Por isso, a possibilidade de realizar o PTH em condições mais brandas tem como objetivo reduzir o fator de severidade e a degradação dos açúcares da palha durante o tratamento. Para isso, as novas condições do PTH avaliadas foram com temperatura reduzida em 10 °C e/ou com o tempo reduzido em até 30 minutos. A Figura 20 apresenta a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática e o fator de severidade combinada, para as diferentes condições do PTH (160 °C por 10 minutos, 160 °C por 40 minutos e 170 °C por 40 minutos), realizado separadamente e em associação com o PTB.

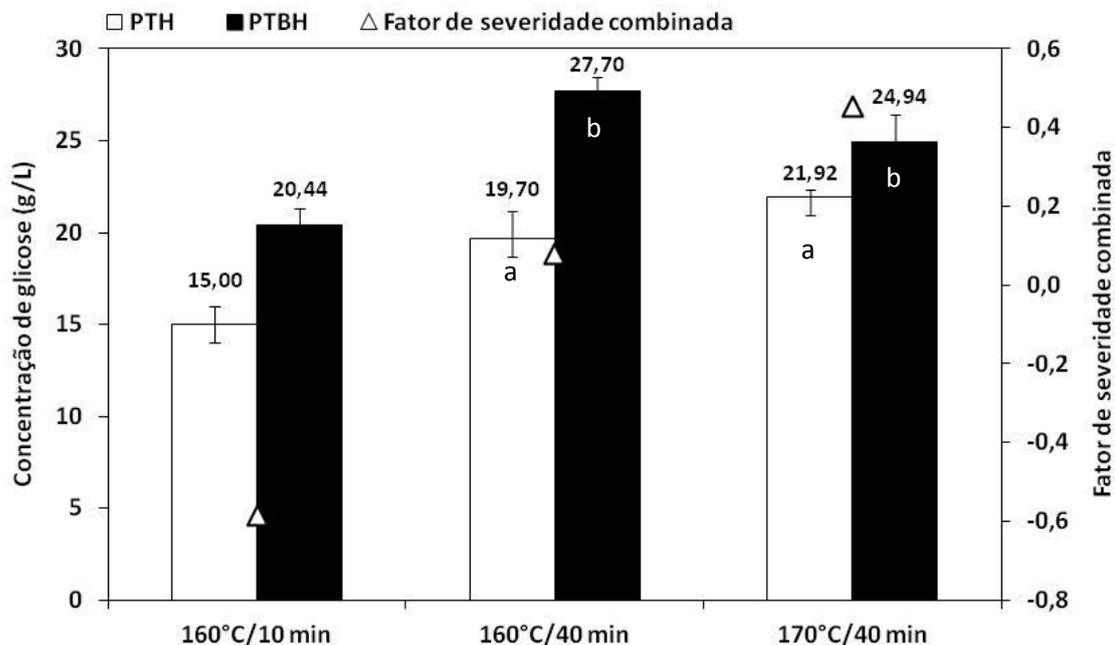


Figura 20: Concentração de glicose, em g/L, após 72 horas de hidrólise enzimática das palhas de cana-de-açúcar o tratamento hidrotérmico em diferentes condições (PTH) e a associação biológico seguido do hidrotérmico (PTBH), e o fator de severidade combinada (\blacktriangle).^{a, b} Concentrações de glicose estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Ao analisarmos o PTH sem associação e utilizando a condição de 170 °C por 40 minutos como referência observamos que, ao reduzir o tempo e a temperatura (160 °C por 10 minutos) obtemos menor concentração de glicose e ao reduzir apenas a temperatura (160 °C por 40 minutos), as concentrações de glicose são estatisticamente iguais. Ao analisarmos a associação do PTB com o PTH utilizando novamente a condição referência (170 °C por 40 minutos) observamos que, ao reduzir o tempo e a temperatura (160 °C por 10 minutos) o fator de severidade é drasticamente reduzido e são obtidas menores concentrações de glicose. Entretanto, ao reduzir apenas a temperatura (160 °C por 40 minutos) foram obtidas concentrações de glicose estatisticamente iguais e um fator de severidade menor. Deste modo, a redução simultânea das variáveis tempo e temperatura não é favorável ao processo devido à menor concentração de glicose obtida, e a redução de 10 °C no tratamento não influencia a obtenção de glicose, durante o PTH e a associação. Entretanto, a associação do PTB seguido do PTH realizado a 160 °C por 40 minutos resultou em um tratamento com menor fator de severidade, quando comparado com a condição 170 °C por 40 minutos, sendo assim a melhor condição a ser conduzido o processo pela menor conversão dos seus carboidratos aos inibidores. Analisando a melhor condição observada (160 °C por 40 minutos), a hidrólise enzimática da amostra após a associação liberou maior concentração de glicose quando comparada a amostra após PTH, mostrando a eficiência da associação.

Diferente do presente trabalho, ao realizar o tratamento hidrotérmico na palha de cana-de-açúcar com o objetivo de avaliar a interferência do tempo (10-15 minutos) e temperatura (180/195 °C) na solubilização das frações, foi observado que o tempo de residência não apresenta influência no processo e que maiores remoções foram obtidas em temperaturas mais altas. O mesmo ocorreu para a obtenção de glicose durante a hidrólise enzimática, quanto maior a temperatura do PTH maior a liberação de glicose pela amostra pré-tratada. A não influencia da temperatura observada pode ser explicada pela baixa diferença entre condições de tempo avaliadas (OLIVEIRA et al., 2014).

A Tabela 11 apresenta a composição química das amostras após o PTH e da associação do PTB seguido do PTH nas diferentes condições realizadas e os rendimentos de conversão de celulose em glicose após a hidrólise enzimática. Podemos observar que na associação do PTB seguido do PTH a 160 °C por 40 minutos foi obtida o maior rendimento de conversão de celulose em glicose (78%), comprovando que a associação entre os tratamentos aumenta a disponibilidade e a digestibilidade enzimática da celulose presente na amostra e que essa técnica pode ser utilizada como método de pré-tratamento com elevada eficiência.

Tabela 11: Composição química para as amostras após o tratamento hidrotérmico (PTH) nas condições de 160 °C/10 minutos, 160 °C/40 minutos, 170 °C/40 minutos e a associação do tratamento biológico seguido do tratamento hidrotérmico (PTBH).

Amostra	Condição	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Rendimento na hidrólise enzimática (%)*
	170 °C/40 minutos	55,4 ± 0,9	8,0 ± 0,4	30,4 ± 1,0	68,3
PTH	160 °C/40 minutos	51,8 ± 1,6	5,5 ± 0,9	32,4 ± 1,6	65,7
	160 °C/10 minutos	49,8 ± 1,1	9,1 ± 0,1	33,3 ± 0,4	51,3
	170 °C/40 minutos	68,3 ± 2,9	5,2 ± 0,2	23,8 ± 1,3	62,6
PTBH	160 °C/40 minutos	60,9 ± 1,0	6,1 ± 0,4	26,8 ± 3,1	78,5
	160 °C/10 minutos	62,1 ± 0,6	6,7 ± 0,2	25,8 ± 0,6	56,9

* Rendimento de conversão de celulose em glicose após 72 horas de hidrólise enzimática

Deste modo, mesmo com o fungo *P. ostreatus* não tendo apresentado elevada eficiência no PTB, foi possível realizar a associação do PTB seguido do PTH e obter maiores concentrações de glicose durante a hidrólise enzimática, quando comparado com as amostras apenas com PTH. Além disso, a associação possibilitou realizar o PTH com uma temperatura 10 °C menor e obter concentrações de glicose estatisticamente iguais, nas condições de 170 °C por 40 minutos e 160 °C por 40 minutos. Apesar da amostra após a associação na condição do PTH de 160 °C por 40 minutos apresentar o menor teor de celulose, dentre as amostras após a associação, esta apresentou o maior rendimento de conversão de celulose em glicose dentre todas as amostras avaliadas, indicando o aumento da digestibilidade da celulose presente na palha de cana-de-açúcar. Com isso, a estratégia de associar o PTB com o PTH mostrou ser promissora, sendo necessário a busca por um micro-organismo mais eficiente ao utilizado no PTB com o intuito de aumentar a eficiência da associação.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nos presente trabalho podemos concluir que:

- Tanto o PTA como o PTH foram eficientes na solubilização da fração hemicelulósica, visto que reduziram seu conteúdo quando comparado a amostra *in natura*, sendo o PTH o mais eficaz, pois proporcionou mudanças na estrutura na palha de cana-de-açúcar aumentando a disponibilidade e a digestibilidade da celulose e favoreceu a obtenção de glicose durante a etapa de hidrólise enzimática. Assim o PTH foi selecionado para ser associado ao PTB.
- As granulometrias da amostra estudadas não influenciaram a hidrólise e solubilização da hemicelulose proporcionada pelo PTA e pelo PTH e a obtenção de glicose durante a hidrólise enzimática, o que pode representar uma economia energética em relação a etapa de moagem.
- Os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Paraconiothyrium estuarinu* e *Westerdykella dispersa* proporcionaram baixa perda mássica à palha de cana-de-açúcar, e por isso foram descartados da continuidade do trabalho;
- *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* proporcionaram elevada perda de massa a palha de cana-de-açúcar e foram selecionados para serem avaliados no PTB;
- Durante o PTB, *P. ostreatus* foi o fungo mais eficiente, visto que, mesmo proporcionando a menor perda mássica (17,9%) e removendo a menor quantidade de lignina (20%), foi o fungo mais seletivo para a remoção da lignina e aumentou a disponibilidade e a digestibilidade da celulose da amostra pré-tratada;
- A associação do PTB com PTH quando realizado a 170 °C por 40 minutos potencializou a remoção da hemicelulose pelo PTH, quando comparado à amostra apenas com PTH, apresentando maior liberação de glicose após a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada;
- Com a associação do PTB seguido do PTH foi possível realizar o PTH com uma temperatura 10 °C inferior (160 °C por 40 minutos), mantendo a concentração de glicose obtida e aumentando o rendimento de conversão de celulose em glicose de 62,6% para 78,5%;

- Ao associar o PTB e o PTH foi possível realizar a remoção combinada da lignina e da hemicelulose, juntando o potencial dos dois tratamentos realizados, fazendo com que a biomassa pré-tratada apresentasse maior conteúdo de celulose disponível e aumentando a digestibilidade enzimática da amostra. Além disso, foi possível realizar um PTH em condições mais amenas.

8. PERSPECTIVAS

Após demonstrar que a associação do tratamento biológico seguido do hidrotérmico apresentou resultados promissores, seria interessante a busca por um micro-organismo mais eficiente na remoção seletiva da lignina a ser utilizado no tratamento biológico. Tal busca é necessária, pois se acredita que resultados mais expressivos não foram alcançados devido à etapa do pré-tratamento biológico não ter se mostrado tão eficiente quanto o esperado, visto que, mesmo o fungo *P. ostreatus* sendo descrito na literatura como um exímio produtor das enzimas ligninolíticas, o tratamento biológico não apresentou rendimentos muito superiores à amostra *in natura*. Desse modo, na continuidade desse estudo, a seleção de uma nova linhagem poderia ser realizada para que a etapa de associação possa ser avaliada de forma mais completa, através da avaliação de um espectro mais amplo de condições de tempo utilizando um planejamento experimental para avaliar as variáveis de temperatura e relação sólido:líquido na associação.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADNEY; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. January, p. 8, 1996.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, nov. 2011.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, jul. 2010.

AMBYE-JENSEN, M. et al. Ensiling of wheat straw decreases the required temperature in hydrothermal pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 116, 2013a.

AMBYE-JENSEN, M. et al. Ensiling as biological pretreatment of grass (*Festulolium Hykor*): The effect of composition, dry matter, and inocula on cellulose convertibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 303–312, nov. 2013b.

AMBYE-JENSEN, M. et al. Combined ensiling and hydrothermal processing as efficient pretreatment of sugarcane bagasse for 2G bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 336, 20 dez. 2018.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, ago. 2014.

BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Y. Emerging Physico-Chemical Methods for Biomass Pretreatment. **Intech open**, 2018.

BOND, J. et al. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 83, n. 3–4, p. 161–171, 12 jan. 2008.

BORDONAL, R. DE O. et al. Sugarcane yield and soil carbon response to straw removal in south-central Brazil. **Geoderma**, v. 328, n. March, p. 79–90, out. 2018.

BRIENZO, M. et al. **SUGARCANE BAGASSE HEMICELLULOSE PROPERTIES, EXTRACTION TECHNOLOGIES AND XYLOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION**. [s.l: s.n.].

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] InTech, 2013. v. 2p. 64.

CARDOSO, W. S. et al. Multi-enzyme complex of white rot fungi in saccharification of lignocellulosic material. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 879–884, out. 2018.

CARPIO, L. G. T.; SIMONE DE SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for

producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771–780, out. 2017.

CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, out. 2015.

CARVALHO, J. L. N. et al. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 7, p. 1181–1195, jul. 2017.

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.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K. Organosolv pretreatment for enzymic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 2, p. 156–162, fev. 1990.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2412–2417, 1 maio 2005.

CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR - Safra 2018/19 - Segundo levantamento, agosto de 2018. 2018.

CRUZ, C. H. DE B. et al. **Universidade e empresa: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro**. [s.l.: s.n.].

DA SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] InTech, 2013.

DE CARVALHO, A. L.; ANTUNES, C. H.; FREIRE, F. Economic-energy-environment analysis of prospective sugarcane bioethanol production in Brazil. **Applied Energy**, v. 181, p. 514–526, 2016.

DE SOUSA PAREDES, R. et al. Production of xylanase, α -l-arabinofuranosidase, β -xylosidase, and β -glucosidase by *Aspergillus awamori* using the liquid stream from hot-compressed water treatment of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, n. 3, p. 299–307, 12 set. 2015.

DE SOUZA, M. F. et al. Chlorine-Free Biomass Processing: Enzymatic Alternatives for Bleaching and Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. In: **Chemistry Beyond Chlorine**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 241–268.

DE VASCONCELOS, J. N. Ethanol Fermentation. In: **Sugarcane**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 311–340.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. CELLULOSE DEGRADATION BY OXIDATIVE ENZYMES. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209015, set. 2012.

FARIA, R. A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. **Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1–102, 2010.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 7, 2010a.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 7 mar. 2010b.

GHIZELINI, A. M. et al. Fungal communities in oil contaminated mangrove sediments – Who is in the mud? **Marine Pollution Bulletin**, v. 139, n. December 2018, p. 181–188, fev. 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1 jan. 1987.

GILES, R. L. et al. Single versus simultaneous species treatment of wood with *Ceriporiopsis subvermispora* and *Postia placenta* for ethanol applications, with observations on interspecific growth inhibition. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 99, p. 66–72, 2015.

GOODELL, B.; QIAN, Y.; JELLISON, J. Fungal Decay of Wood: Soft Rot—Brown Rot—White Rot. In: **ACS Symposium Series**. [s.l.: s.n.]. v. 982p. 9–31.

GORBATOVA, O. N. et al. Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 414–419, jul. 2006.

HATAKKA, A.; HAMMEL, K. E. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. **Industrial Applications**, p. 319–340, 2011a.

HATAKKA, A.; HAMMEL, K. E. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In: **Industrial Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011b. p. 319–340.

HERMOSILLA, E. et al. Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments. **Waste Management**, v. 79, p. 240–250, set. 2018.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; DE ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. DAS G. DE A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489–496, abr. 2016.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 9 fev. 2007a.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 9 fev. 2007b.

HOWELL, C. et al. Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 414–419,

jun. 2009.

IOELOVICH, M. Y. Models of supramolecular structure and properties of cellulose. **Polymer Science Series A**, v. 58, n. 6, p. 925–943, 15 nov. 2016.

ISHIZAWA, C. I. et al. Porosity and Its Effect on the Digestibility of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2575–2581, abr. 2007.

KATAHIRA, R.; ELDER, T. J.; BECKHAM, G. T. Chapter 1. A Brief Introduction to Lignin Structure. In: **Lignin Valorization: Emerging Approaches**. [s.l: s.n.]. p. 1–20.

KIM, S. Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 165–171, jun. 2002.

KUCHARSKA, K. et al. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2937, 10 nov. 2018.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–391, 13 maio 2008.

KUSTER MORO, M. et al. Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 509–517, mar. 2017a.

KUSTER MORO, M. et al. Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 509–517, mar. 2017b.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 24 abr. 1984.

LEI N^o 13.576, D. 26. 12. 201.-D. 27. 12. 201. D. Ministério da Saúde. RDC N^o 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.**, v. 2017, 2017.

LYND, L. R. et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202–211, jun. 2017.

MA, F. et al. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9600–9604, 2010.

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

MARGEOT, A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372–380, 2009.

MARTÍNEZ, Á. T. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin Lignocellulosic materials. **International**

Microbiology, v. 8, p. 195–204, 2005.

MARTINS, M. A. M. et al. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, v. 52, n. 6, p. 967–973, ago. 2003.

MAZA, M. et al. Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 18–25, fev. 2014.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: **Biomass for Biofuels**. [s.l.: s.n.]. p. 292–324.

MENANDRO, L. M. S. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 488–504, maio 2017.

MESTER, T.; VARELA, E.; TIEN, M. Wood Degradation by Brown-Rot and White-Rot Fungi. In: **Genetics and Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 355–368.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MÖLLER, R.; MILD, G. Protection of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) materials against fungal decay and discolouration by treatment with wood preservatives. **European Journal of Wood and Wood Products/Holz als Roh - und Werkstoff**, v. 77, n. 1, p. 139–145, 2019.

MORAIS, S. A. L. DE; NASCIMENTO, E. A. DO; MELO, D. C. DE. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461–470, jun. 2005.

MOUTTA, R. D. O. et al. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 01, n. S12, 2013.

MOUTTA, R. D. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. D. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93–100, 7 jan. 2014a.

MOUTTA, R. D. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. D. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93–100, 7 jan. 2014b.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical Optimization of Sugarcane Leaves Hydrolysis into Simple Sugars by Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Process. **Sugar Tech**, v. 14, n. 1, p. 53–60, 1 mar. 2012.

NETO, A. C.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 184, p. 168–178, 2018.

- NIKU-PAAVOLA, M. L.; RAASKA, L.; ITÄVAARA, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. **Mycological Research**, v. 94, n. 1, p. 27–31, jan. 1990.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OLIVEIRA, L. R. M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1–7, jul. 2014.
- PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.
- PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 399–408, mar. 2009.
- PERALTA, R. M. et al. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 119–149.
- PEREIRA, A. R. B. et al. Propazine degradation by intra- and extracellular enzymes from *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 2, p. 66–75, 3 mar. 2016.
- PEREIRA, P. M. et al. Optimized Atrazine Degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310: an Alternative for Impact Reduction of Herbicides Used in Sugarcane Crops. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 01, n. S12, 2013.
- POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **FEBS Journal**, v. 282, n. 7, p. 1190–1213, abr. 2015.
- PRATTO, B. et al. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 7, p. 1430–1444, 23 abr. 2016.
- RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. January, p. 330–340, dez. 2017.
- RITTER, S. K. **Lignocellulose: A Complex Biomaterial**, 2008.
- ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, nov. 2015.
- ROMERO, I. et al. Acid hydrolysis of olive tree biomass. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 5–6, p. 633–640, maio 2010.
- RONQUIM, C. C. Queimada na colheita da cana-de-açúcar: impactos ambientais, sociais e econômicos. 2010.
- SALVACHÚA, D. et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7500–7506, 2011.

- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.
- 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.
- SHIRKAVAND, E. et al. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 217–234, 2016.
- SILVEIRA, M. H. L. et al. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. **ChemSusChem**, v. 8, n. 20, p. 3366–3390, out. 2015.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.
- SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, 2005.
- SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, 2012.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, maio 2002.
- TANIGUCHI, M. et al. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637–643, 2005.
- TEIXEIRA, R. S. et al. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. O34, 2014.
- TEIXEIRA, R. S. S. et al. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 33–37, dez. 2012.
- VÁZQUEZ, M. . et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, nov. 2000.
- VERBELEN; KERSTENS. Polarization confocal microscopy and Congo Red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. **Journal of Microscopy**, v. 198, n. 2, p. 101–107, maio 2000.
- VERMAAS, J. V. et al. Effects of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Oxidation on Cellulose Structure and Binding of Oxidized Cellulose Oligomers to Cellulases. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 20, p. 6129–6143, 21 maio 2015.
- VIDAL, B. C. et al. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 8, p. 1405–1421, 26 ago.

2011.

WAN, C.; LI, Y. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9788–9793, 2011.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1447–1457, nov. 2012.

WANG, W. et al. Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 282–286, mar. 2012.

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 26 maio 2009.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26–40, jan. 2008.