

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**SELEÇÃO DE FUNGOS CAPAZES DE HIDROLISAR BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO**

Denise de Souza Machado

**Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos**

**Piracicaba
2009**

Denise de Souza Machado
Engenheira Agrônoma

**SELEÇÃO DE FUNGOS CAPAZES DE HIDROLISAR BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO**

Orientadora:
Prof^a. Dra. Marília Oetterer

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Machado, Denise de Souza

Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado / Denise de Souza Machado. - - Piracicaba, 2009.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Bagaços 2. Cana-de-açúcar 3. Fungos - Seleção 4. Hidrólise I. Título

CDD 664.1228
M149s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À luz da minha vida, Victoria

Ao meu marido Alexandre

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela excelente formação que me proporcionou.

Ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pela oportunidade de ingressar no curso de mestrado.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Marília Oetterer, pelo apoio, incentivo e, acima de tudo, por sua amizade.

À Prof^a Dra. Sandra Helena da Cruz, minha co-orientadora, pela paciência e convivência agradável durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. André Alcarde, pela amizade e gentileza neste período.

Aos funcionários do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela inestimável colaboração.

A Marcelo Corrêa, pelo auxílio nas análises estatísticas dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Labate e Juliano Bragato, pelo auxílio nas análises de açúcares.

As minhas amigas de curso, Carla, Paulinha, Luciana, Alessandra, Adna, Carlinha, pelo carinho e amizade.

À Vivian Pietrobon, pelo apoio e amizade.

À Juliana, pela eterna amizade.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Aparecida, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido Alexandre, pelo amor incondicional.

À minha filha Victoria, razão da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO.....	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 COMPOSIÇÃO DAS CÉLULAS VEGETAIS	19
2.2 COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	20
2.3 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	23
2.3.1 Hidrólise por explosão a vapor	24
2.3.2 Hidrólise ácida.....	26
2.3.3 Hidrólise enzimática	29
2.3.4 Fungos lignocelulolíticos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 MICRORGANISMOS	41
3.1.1 Preparação do inóculo.....	42
3.2 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	42
3.3 HIDRÓLISE DO BAGAÇO PELOS FUNGOS.....	43
3.3.1 Otimização das condições de hidrólise	44
3.3.2 Análise dos açúcares obtidos.....	46
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO POR MICROSCOPIA DE LUZ	47
3.4.1 Análises do colmo da cana-de-açúcar por microscopia de luz.....	48
3.4.2 Hidrólise do bagaço.....	48
3.4.3 Preparação das amostras para microscopia	48
3.4.4 Coloração e confecção de lâminas histológicas.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO PELOS FUNGOS A. NIGER, P. CHRYSOSPORIUM, PLEUROTUS ERYNGII, P. OSTREATUS, P. SAJOR-CAJU E T. REESEI	50

4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE BMA POR T. REESEI	55
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE BMA POR P. CHRYSOSPORIUM	62
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES POR HPAE-PAD	68
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO HIDROLISADO POR MICROSCOPIA DE LUZ	71
4.5.1 Colmo de cana-de-açúcar.....	71
4.5.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....	73
5 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar, um dos resíduos gerados durante a produção de açúcar, é composto basicamente por celulose (41 – 44 %), hemicelulose (25 – 27 %) e lignina (20 – 22 %); cerca de dois terços da energia existente na cana-de-açúcar está contida no bagaço e na palha. Diversos processos utilizam o bagaço excedente, mas principalmente para produção de energia. No entanto, devido à grande quantidade de bagaço e palha que ainda sobram no processo estes materiais podem ser utilizados como fonte de celulose para obtenção de etanol. Para tanto, se faz necessária a hidrólise do bagaço e da palha a fim de se obter um hidrolisado que possa ser fermentado por leveduras industriais. A hidrólise do bagaço pode ocorrer por explosão a vapor, hidrólise química com ácidos ou álcalis ou hidrólise enzimática entre outros processos; a hidrólise química pode gerar compostos que são inibidores do processo fermentativo enquanto a hidrólise enzimática é um processo bastante oneroso visto não existir no Brasil a produção de enzimas para este fim. Por outro lado, se a hidrólise for efetuada somente com o próprio fungo, o processo pode ser lento. Neste contexto, este trabalho visou utilizar bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor e pré-tratado com ácido como substrato para selecionar fungos capazes de hidrolisar o bagaço a açúcares potencialmente fermentáveis por leveduras industriais. Foram realizados experimentos em uma etapa preliminar para selecionar dentre seis linhagens de fungos o(s) mais apto(s) para produção de açúcares redutores. E, experimentos fatoriais 2^2 para otimização das condições de hidrólise para os fungos selecionados na etapa anterior. Os fungos *Trichoderma reesei* e *Phanerochaete chrysosporium* foram selecionados para hidrolisar bagaço moído pré-tratado por ácido em cinco dias de incubação. A análise de variância (ANOVA) possibilitou gerar modelos validados e, superfícies de resposta para liberação de açúcares redutores e hexoses na hidrólise pelos fungos selecionados. As superfícies de resposta indicaram faixas ótimas de temperatura e concentração de ácido (32,19°C/1,09%) para liberação de açúcares redutores por *T. reesei* e, (32,6°C/1,06%) para *P. chrysosporium*.

Palavras-chave: Bagaço; Cana-de-açúcar; Hidrólise; Enzima; Etanol; Ácido; Fungo

ABSTRACT

Selection of fungi able to hydrolyze bagasse sugar cane pre-treated

The bagasse from sugar cane, a waste generated during the production of sugar, is composed primarily of cellulose (41 - 44%), hemicellulose (25 - 27%) and lignin (20 - 22%), about two thirds of energy in existing sugar cane is contained in the bagasse and straw. Several processes using bagasse surplus, but mainly for energy production. However, due to the large amount of bagasse and straw still left in these materials can be used as a source of cellulose to obtain ethanol. Thus, it is necessary to hydrolysis of bagasse and straw in order to obtain a hydrolyzate that can be fermented by yeast industry. Hydrolysis of bagasse can occur for a steam explosion, hydrolysis with acid or alkali chemical or enzymatic hydrolysis and other processes, the hydrolysis may generate chemical compounds that are inhibitors of the fermentation process while the enzymatic hydrolysis process is very costly as there is in Brazil the production of enzymes for this purpose. Furthermore, if the hydrolysis is carried out only with the fungus itself, the process can be slow. In this context, this work aimed to use crushed sugar cane, pre-treated by steam explosion and pre-treated with acid as a substrate to select fungi able to hydrolyze the bagasse potentially fermentable sugars for the yeast industry. Experiments were carried out in a preliminary step to select among six strains of fungi as suitable for production of reducing sugars. And, 2² factorial experiments to optimize the conditions of hydrolysis for selected fungi in the previous step. The fungi *Trichoderma reesei* and *Phanerochaete chrysosporium* were selected to hydrolyze milled bagasse pre-treated by acid in five days of incubation. The analysis of variance (ANOVA) allowed generate validated models and response surfaces for the release of reducing sugars and hexose hydrolysis by the selected fungi. The areas of response indicated bands optimum temperature and concentration of acid (32.19°C/1.09%) for release of reducing sugars by *T. reesei*, and (32.6°C/1.06%) for *P. chrysosporium*.

Keywords: Bagasse; Sugar cane; Hydrolysis; Enzyme; Ethanol; Acid; Fungus

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SEM PRÉ-TRATAMENTO.	20
TABELA 2- FAIXAS DE ESTUDO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES EM ANÁLISE NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL DO TIPO 2 ²	45
TABELA 3- VALORES CODIFICADOS E CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE OBTIDAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO 2 ²	46
TABELA 4- COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO UTILIZADO NESTE TRABALHO.	50
TABELA 5- AÇÚCARES REDUTORES (G/L) LIBERADOS NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO MOÍDO PRÉ-TRATADO COM H ₂ SO ₄ (0,5%) (BMA) POR FUNGOS.	51
TABELA 6- AÇÚCARES REDUTORES (G/L) LIBERADOS NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR (BEV) POR FUNGOS.	52
TABELA 7- AÇÚCARES REDUTORES (G/L) LIBERADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO MOÍDO PRÉ-TRATADO POR ÁCIDO (BMA) E BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR (BEV) POR FUNGOS.	53
TABELA 8- RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) E HEXOSES DURANTE O CULTIVO DE <i>T. REESEI</i> EM BAGAÇO DE CANA MOÍDO E PRÉ-TRATADO POR ÁCIDO (BMA).....	56
TABELA 9- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE AÇÚCARES REDUTORES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>T. REESEI</i>	57
TABELA 10- ANOVA PARA A LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>T. REESEI</i>	57
TABELA 11- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE HEXOSES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>T. REESEI</i>	60
TABELA 12- ANOVA PARA A LIBERAÇÃO DE HEXOSES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>T. REESEI</i>	60
TABELA 13- RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) E HEXOSES DURANTE O CULTIVO DE <i>P. CHRYSOSPORIUM</i> EM BAGAÇO DE CANA MOÍDO E PRÉ-TRATADO POR ÁCIDO (BMA)	62
TABELA 14- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE AÇÚCARES REDUTORES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	64
TABELA 15- ANOVA PARA A LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	64

TABELA 16- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE HEXOSES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>P.CHRYSOSPOIRUM</i>	66
TABELA 17- ANOVA PARA A LIBERAÇÃO DE HEXOSES NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA <i>P.CHRYSOSPORIUM</i> . .	67
TABELA 18. CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES FUCOSE, ARABINOSE, GALACTOSE, GLICOSE, XILOSE, PENTOSSES (C5), HEXOSES (C6) E AÇÚCARES TOTAIS EM BAGAÇO MOÍDO PRÉ-TRATADO HIDROLISADO POR <i>T. REESEI</i> EM TRATAMENTO FATORIAL 2 ²	69
TABELA 19- CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES FUCOSE, ARABINOSE, GALACTOSE, GLICOSE, XILOSE, PENTOSSES (C5), HEXOSES (C6) E AÇÚCARES TOTAIS EM BAGAÇO MOÍDO PRÉ-TRATADO (BMA) HIDROLISADO POR <i>P.CHRYSOSPORIUM</i> EM TRATAMENTO FATORIAL 2 ²	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- AÇÚCARES REDUTORES LIBERADOS DURANTE CULTIVO DE BAGAÇO DE CANA MOÍDO E PRÉ-TRATADO POR ÁCIDO (BMA) E INCUBADOS COM FUNGOS A 29°C.	51
FIGURA 2- AÇÚCARES REDUTORES LIBERADOS DURANTE CULTIVO DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR COM FUNGOS.	53
FIGURA 3- AÇÚCARES REDUTORES LIBERADOS NA HIDRÓLISE DE BAGAÇO MOÍDO PRÉ-TRATADO POR ÁCIDO E BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR E INCUBADOS COM FUNGOS.	54
FIGURA 4- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>T. REESEI</i>	58
FIGURA 5- CURVAS DE ENTORNO PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>T. REESEI</i>	59
FIGURA 6- SUPERFÍCIE DE REPOSTA PARA LIBERAÇÃO DE HEXOSES POR <i>T. REESEI</i>	61
FIGURA 7- CURVAS DE ENTORNO PARA LIBERAÇÃO DE HEXOSES POR <i>T. REESEI</i>	61
FIGURA 8- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	65
FIGURA 9- CURVAS DE ENTORNO PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	65
FIGURA 10- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA LIBERAÇÃO DE HEXOSES POR <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	67
FIGURA 11- CURVAS DE ENTORNO PARA LIBERAÇÃO DE HEXOSES POR <i>P. CHRYSOSPORIUM</i>	68
FIGURA 12- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO FEIXE VASCULAR EM CORTE TRANSVERSAL DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). A CELULOSE ESTÁ EM AZUL E A LIGNINA EM VERMELHO. (FL = FLOEMA; FB = FIBRAS; LPX = LACUNAS DE PROTOXILEMA E MX = METAXILEMA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 10X.	72
FIGURA 13- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO FEIXE VASCULAR EM CORTE LONGITUDINAL DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). A CELULOSE ESTÁ COLORIDA EM AZUL E A LIGNINA EM VERMELHO. (FL = FLOEMA; XL = XILEMA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 10X.	72
FIGURA 14- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) E LIGNINA (VERMELHO) OBTIDAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM H ₂ SO ₄ APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE; LG= LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X.	73
FIGURA 15- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) E LIGNINA (VERMELHO) OBTIDAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM H ₂ SO ₄ APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE; LG= LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X.	74
FIGURA 16- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) E LIGNINA (VERMELHO) OBTIDAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM H ₂ SO ₄ APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE; LG= LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X.	75

- FIGURA 17- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *P. CHRYSOSPORIUM* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 76
- FIGURA 18- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *P. CHRYSOSPORIUM* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 76
- FIGURA 19- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE CELULOSE (AZUL) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *P. CHRYSOSPORIUM* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (CL=CELULOSE). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 77
- FIGURA 20- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE LIGNINA (VERMELHO) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *T. REESEI* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (LG=LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 78
- FIGURA 21- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE LIGNINA (VERMELHO) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *T. REESEI* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (LG=LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 78
- FIGURA 22- FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO AS FIBRAS DE LIGNINA (VERMELHO) PRESENTES NO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM H_2SO_4 E HIDROLISADO POR *T. REESEI* APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE ASTRA (1%) E SAFRANINA (1%). (LG=LIGNINA). MICROSCÓPIO ZEISS, AUMENTO 20X..... 79

1 INTRODUÇÃO

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar são resíduos gerados durante a produção de açúcar e etanol. Devido às grandes quantidades produzidas, diversos estudos estão sendo realizados visando a utilização deste excedente, como: co-geração de eletricidade a partir de bagaço, utilização do bagaço como ração animal, indústria de móveis, plásticos biodegradáveis (SEBRAE, 2005). Diversos destes processos necessitam de uma modificação da biomassa vegetal para serem utilizados e vários estudos estão sendo realizados neste sentido (MORAIS, CAMPANA FILHO, 1999).

Desde a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, cujo objetivo era incentivar a produção de etanol usando como matéria-prima a cana-de-açúcar como opção para reduzir as despesas causadas com a necessidade de importar petróleo (TEIXEIRA et al., 1997); o Brasil, tecnologicamente, tem se destacado como o país mais avançado na produção e no uso de etanol como combustível, seguido pelos EUA. Atualmente, a produção mundial de etanol é de, aproximadamente, 40 bilhões de litros; supõe-se que cerca de 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. Na safra 2007/08 o Brasil produziu 494 milhões de toneladas de cana com uma produção de 31 milhões de toneladas de açúcar e 22 bilhões de litros de etanol (UNICA, 2009). Em 2008 existiam 386 indústrias em atividade, com 249 unidades mistas, isto é, produzindo açúcar e etanol, 122 destilarias produzindo somente etanol e 15 usinas produzindo somente açúcar (MAPA, 2009). O etanol é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, EUA, México, Índia, Argentina, Colômbia e no Japão (ÁLCOOL-ETANOL BRASILEIRO, 2006).

O uso de etanol como combustível automotivo é de grande vantagem e levou a eliminação de compostos de chumbo na gasolina, a redução das emissões de CO, a eliminação de S (enxofre) e material particulado, e emissões de compostos orgânicos menos tóxicos e menos reativos fotoquimicamente (BIOTECH BRASIL, 2006).

Cerca de dois terços da energia existente na cana-de-açúcar está contida no bagaço e na palha, e através do procedimento de hidrólise, seria possível utilizá-la (BIOTECH BRASIL, 2006).

Com o emprego dessa tecnologia o Brasil tem possibilidade de aumentar em 30% a sua produção do combustível líquido, e assim o aproveitamento da cana-de-

açúcar seria quase total, sem necessidade de aumentar a área de plantio, favorecendo toda a escala produtiva e, acima de tudo, preservando o meio ambiente, uma das preocupações de toda a sociedade (BIOTECH BRASIL, 2006).

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo selecionar fungos capazes de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar utilizando bagaço pré-tratado por explosão a vapor e bagaço moído pré-tratado com ácido.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ⇒ Selecionar, entre os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Aspergillus niger*, o mais apto a hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar;
- ⇒ Comparar a liberação de açúcares após hidrólise por fungos de bagaço moído pré-tratado com ácido ou bagaço pré-tratado por explosão a vapor;
- ⇒ Determinar o menor tempo no qual os fungos liberem as maiores quantidades de açúcares redutores no processo de hidrólise;
- ⇒ Determinar qual a melhor resposta da interação entre temperatura e concentração de ácido para a liberação de açúcares redutores e hexoses no processo de hidrólise;
- ⇒ Caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar por microscopia de luz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O bagaço de cana-de-açúcar, obtido na saída do último terno de moendas, é aproveitado historicamente pelas usinas e outras unidades industriais como insumo energético para produção de vapor e eletricidade mediante a queima em caldeiras. No entanto, para cada três toneladas de cana é gerada uma tonelada de bagaço, quantidade mais que suficiente para que o bagaço possa ser utilizado como matéria-prima na obtenção de outros produtos, como furfural, carvão ativado, produtos moldados, alimentação animal e outros (SEBRAE, 2005).

Com a atual busca mundial por biocombustíveis a partir de fontes renováveis, a cana-de-açúcar é uma das principais fontes de matéria-prima, nesse caso, para produção de etanol carburante, produto de grande demanda. Por isso, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser uma alternativa para o aumento da produção do etanol sem a necessidade de aumentar a área plantada de cana. No entanto, a produção de etanol a partir de bagaço envolve a hidrólise das fibras de celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis.

Segundo Rossell (2006), cada tonelada de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado pode resultar, potencialmente, em 186 litros de etanol, sendo 123 litros obtidos da fermentação das hexoses e 63 litros da fermentação das pentoses.

2.1 Composição das células vegetais

As células vegetais apresentam a parede celular como uma de suas mais significativas características. A parede celular é fundamentalmente formada por microfibrilas de celulose, imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não celulósicos, as hemiceluloses e pectinas. A microfibrila de celulose tem de 10 a 25 nm de diâmetro, comprimento indeterminado e, 30 a 100 moléculas de celulose que se unem paralelamente por meio de pontes de hidrogênio e mostram um arranjo ordenado responsável por sua cristalinidade e birrefringência (KRAUS et al, 2006).

Lignina é um polímero amorfo complexo composto de unidades fenilpropano (C9) unidas por diferentes tipos de ligações. Essa irregularidade do polímero é consequência do mecanismo de sua biossíntese que é dado através do acoplamento de várias formas de ressonância de radicais livres (FENGEL, WEGENER, 1984). Os precursores diretos

da lignina são três alcoóis conhecidos como *Lignois*, e derivam do ácido chiquímico: coniferil, sinapil e álcool *p*-cumaril (SCATENA, SCREMIN-DIAS, 2006). O crescimento das moléculas de lignina ocorre nos espaços entre as microfibrilas de celulosas e cadeias de hemicelulosas na parede celular num processo conhecido como lignificação (GLAZER, NIKAIDO, 1995; NOGUEIRA, 1990).

A cana-de-açúcar, da família das gramíneas, é uma monocotiledônea, portanto sua anatomia apresenta vasos condutores distribuídos em feixes. Os feixes libero-lenhosos se distribuem de maneira irregular e, encontram-se envolvidos por fibras de esclerênquima. O xilema ou lenho é constituído por células mortas, alongadas, dispostas topo a topo em séries longitudinais formando colunas contínuas ou tubos e seu principal componente é a lignina. O tecido liberino, também designado floema ou líber é constituído por células vivas parenquimatosas e seu principal componente é celulose (APPEZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

2.2 Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Os materiais lignocelulósicos são compostos por celulose, hemicelulose e lignina, em diferentes concentrações, dependendo do material analisado. A composição do bagaço de cana-de-açúcar, resíduo lignocelulolítico gerado durante a produção de açúcar e álcool tem sido analisado e estudado exaustivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Composição centesimal de celulose, hemicelulose e lignina em bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
37	ND*	24,6	AGUIAR, MENEZES, 2000
32-48	19-24	23-32	BANERJEE, PANDEY, 2002
46,86	27,50	26,27	CANILHA et al., 2007
38,6	23	23	EERE, 2007
34,4	22,4	20,3	GOMES, 1985
54,55	26,75	10,44	PIETROBON, 2008
41-44	25-27	20-22	SEBRAE, 2005
43,8	25,8	22,1	ROCHA, 2009
46,6	25,2	20,7	ROSSEL, 2006

ND: não determinado

A análise de 50 amostras de bagaço de cana de açúcar provenientes de diversas procedências foi realizada por Rocha (2009), tendo sido obtido 43,8% de celulose, 25,8% de hemicelulose e 22,1% de lignina total. No entanto, segundo o Departamento de Energia dos EUA o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da variedade *Saccharum* spp., a mais utilizada no Brasil, possui 23% de lignina total, 23% de hemicelulose e 38,6% de celulose, o que origina glucanas (38,6%), xilanas (20,4%), arabinanas (1,7%) e outras (menos que 1%) (EERE, 2007). Além de celulose, hemicelulose e lignina, o bagaço de cana de açúcar contém pequenas quantidades de outros compostos classificados conjuntamente como componentes estranhos (SEBRAE, 2005).

Canilha et al. (2007) estudando bagaço *in natura*, através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência, determinou as frações dos açúcares celobiose (3,34%), glicose (46,20%), xilose (24,21%), arabinose (1,70%), e componentes como hidroximetilfurfural (0,30%) e furfural (1,25%) no bagaço de cana-de-açúcar.

Aguiar e Menezes (2000), em estudos com *A. niger* IZ-9, determinaram as frações de celulose (37%) e lignina (24,6%) em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento. Enquanto o bagaço pré-tratado por NaOH 4% apresentou 60,5 % de celulose e 10,7% de lignina, o bagaço pré-tratado por NaOH 4%, ácido fosfórico e vapor resultou em teores de 66,5% de celulose e 10% de lignina.

Gomes (1985) determinou teores de 34,4% de celulose, 22,4% de hemicelulose e 20,3% de lignina em bagaço seco e moído, sem pré-tratamento. Em bagaço pré-tratado por hidróxido de sódio (NaOH 4%), os teores obtidos foram 5,9% de celulose, 25,2% de hemicelulose e 12,7% de lignina na fração solúvel resultante do pré-tratamento alcalino e, 37,2% de celulose, 11% de hemicelulose e 24,8% de lignina na fração insolúvel. Em bagaço pré-tratado por explosão a vapor, os teores apresentados foram: 0% de celulose, 39% de hemicelulose, 3,1% de lignina na fração solúvel e, 52% de celulose, 15,7% de hemicelulose e 22,3% de lignina na fração insolúvel do pré-tratamento ácido.

Pietrobon (2008) apresentou resultados de teores de 54,55% de celulose, 26,75% de hemicelulose e 10,44% de lignina em bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento. Em bagaço pré-tratado por ácido sulfúrico (0,5%) os teores obtidos foram 69,77% de celulose, 2,24% de hemicelulose e 17,61% de lignina, enquanto o bagaço

pré-tratado por hidróxido de cálcio (3%) apresentou teores de 62,38%, 12,50% e 9,96% para celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente.

A celulose, principal componente da parede celular da fibra, é um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de açúcar (homopolímero), ou seja, unidades de glicose unidas por ligações $\alpha(1-4)$. A celulose está localizada nas paredes das fibras, sendo que uma parte apresenta-se na forma amorfa e a outra (maior parte) na forma cristalina. Sua fórmula molecular bruta é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde n representa o número de moléculas de glicose (meros) que compõem a cadeia e pode assumir um valor de até 15.000 unidades (SCATENA, SCREMIN-DIAS, 2006). O valor de n tem uma relação direta com o grau de polimerização da celulose e este por sua vez, com a resistência física da mesma. As hemiceluloses também são polissacarídeos, porém diferem da celulose por serem constituídas de vários tipos de açúcar (heteropolímero), além de serem polímeros ramificados e de cadeia mais curta de baixa massa molecular, intimamente ligados com a própria celulose. Dentre estes açúcares estão: xilose, manose, arabinose, galactose e outros. A lignina é um polímero amorfo, de composição química complexa, que confere firmeza e rigidez ao conjunto de celulose. Apresenta natureza aromática predominante, é insolúvel em água e muito resistente a reação química devido ao seu elevado peso molecular (BETINI, 2006; CELULOSE ONLINE, 2007; COELHO, NASCIMENTO, 2008).

A celulose contém duas frações: uma amorfa (facilmente hidrolisável) e, outra cristalina (muito resistente à hidrólise). Isto faz com que este tipo de material necessite de pré-tratamento, com ácido diluído (~2%) ou explosão a vapor para o aproveitamento eficiente de materiais lignocelulósicos (OLIVERIO, HILST, 2004).

As hemiceluloses também são polissacarídeos, porém diferem da celulose por serem constituídas de vários tipos de açúcar, além de serem polímeros ramificados e de cadeia mais curta de baixa massa molecular, intimamente ligados com a própria celulose. Dentre estes açúcares estão: xilose, manose, arabinose, galactose e outros. A lignina é um polímero amorfo, de composição química complexa, que confere firmeza e rigidez ao conjunto de celulose. Apresenta natureza aromática predominante, é insolúvel em água e muito resistente a reação química devido ao seu elevado peso molecular (BETINI, 2006; CELULOSE online, 2007).

2.3 Hidrólise do material lignocelulósico

A utilização da glicose proveniente de materiais lignocelulósicos ocorre após a hidrólise da celulose. Diversos processos de hidrólise estão sendo estudados e empregados em nível de pesquisa quanto em escala industrial para fins diversos.

A hidrólise (sacarificação) quebra as ligações por pontes de hidrogênio nas frações de hemicelulose e de celulose em seus componentes do açúcar: pentoses e hexoses. Estes açúcares podem então ser fermentados a etanol. No entanto, em muitos casos, um pré-tratamento se faz necessário, este se refere à solubilização e à separação de um ou mais componentes principais da biomassa - hemicelulose, celulose, lignina e extrativos - para permitir que a biomassa sólida remanescente esteja mais acessível a um tratamento químico ou biológico.

Existem vários métodos disponíveis de pré-tratamento ou combinações de métodos. O pré-tratamento físico quebra o tamanho das fibras pela moagem ou processamento aquoso/vapor. O pré-tratamento físico usado geralmente pelos produtores de milho para produção de etanol é a moagem, o que reduz o tamanho da semente do milho, facilitando a hidrólise enzimática. Os métodos usados para materiais celulósicos requerem pré-tratamentos físicos muito mais intensos tais como a explosão a vapor (GRAF; KOEHLER, 2000).

Os métodos químicos mais utilizados: ácido diluído, álcali, solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono ou outros produtos químicos para gerar uma biomassa mais digerível pelas enzimas. Os pré-tratamentos biológicos são usados às vezes em combinação com tratamentos químicos para solubilizar a lignina a fim de deixar a celulose mais acessível à hidrólise e a fermentação (GRAF, KOEHLER, 2000). Dos métodos químicos, o hidróxido de sódio é um dos mais estudados (GOMES, 1985; MARTÍN et al., 2007b; PIETROBON, 2008). Sua aplicação resulta na quebra da estrutura da lignina, hidratação e inchamento da celulose e redução do grau de cristalinidade, aumentando a digestibilidade do material celulósico.

Pietrobon (2008) realizou a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por ácido ou por álcali, utilizando enzimas comerciais. E, verificou que a hidrólise enzimática em bagaço pré-tratado por ácido foi quase duas vezes superior ao pré-tratamento alcalino e, seis vezes maior quando comparado ao bagaço sem pré-

tratamento (controle). Isto confirma a importância do pré-tratamento do bagaço no processo de hidrólise enzimática.

Martín et al. (2008), realizaram experimentos de hidrólise em uma mistura de trevo e azevém com fermentação simultânea para conversão dos açúcares em etanol. Avaliaram condições de temperatura (175 – 195°C) e de pressão (0,3 – 1,2 MPa) para identificar e quantificar os componentes das frações sólida e líquida deste material e o potencial de conversão enzimática. A oxidação úmida (WO) tem sido utilizada com sucesso para hidrolisar diversos materiais lignocelulósicos tais como: palha de trigo (BJERRE et al. 1996; KLINKE et al., 2002), palha de milho (VARGA et al., 2003), resíduos domésticos orgânicos (LISSENS et al., 2004), bagaço de cana-de-açúcar (MARTÍN et al., 2006, 2007a), mandioca, palha de arroz e amendoim (MARTÍN, THOMSEN, 2007d).

Dentre os diversos métodos para hidrólise da celulose foram utilizados neste estudo os processos para hidrolisar o bagaço de cana: explosão a vapor, ácido diluído e fungos. Estes estão detalhados a seguir.

2.3.1 Hidrólise por explosão a vapor

A explosão a vapor é um método de pré-tratamento de grande interesse atual (MARTÍN et al., 2007b). Este processo modifica física e quimicamente os resíduos lignocelulósicos, permitindo o fracionamento nos três principais polímeros que os constituem: hemicelulose, que permanece no hidrolisado, a lignina, que pode ser separada com metanol, etanol ou hidróxido de sódio (NaOH) e, a celulose, encontrada na porção insolúvel (GOMES, 1985). Este pré-tratamento pode ser realizado utilizando diferentes temperaturas e tempos. Quanto mais tempo e temperatura forem aplicados ao bagaço maior é o rendimento em açúcares redutores, no entanto, maior será também a formação de compostos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) que são inibidores da fermentação (MARTÍN et al., 2007c). Gomes (1985) utilizando altas temperaturas (185-260°C) observou a formação de ácido acético a partir de grupos acetil termolábeis presentes na hemicelulose, que catalisa a hidrólise da hemicelulose e sua solubilização em água. Por outro lado, se a explosão a vapor é realizada a altas pressões, seguida de rápida descompressão através de orifício e da remoção da lignina

com álcalis ou álcool, o resíduo é altamente suscetível à hidrólise enzimática por enzimas celulolíticas (CUNHA, 1999).

Apesar da explosão a vapor ser considerada o mais eficiente entre os métodos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar pesquisados, pode ocorrer durante este processo a formação de compostos que podem afetar negativamente a fermentabilidade dos hidrolisados. Cunha (1999) verificou que no processo de explosão a vapor são produzidas substâncias inibidoras da β -glicosidase, do complexo de celulases do *Trichoderma reesei* e, também inibem o crescimento de alguns microrganismos fermentadores, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e *Klebsiella pneumonia*.

Rodrigues-Zuñiga et al. (2008) avaliaram a produção de celulases e xilanases de *Aspergillus niger*, utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e quimicamente tratado mediante os processos de explosão a vapor e hidrólise ácida e alcalina. Verificaram que os melhores resultados foram obtidos com o bagaço pré-tratado por explosão a vapor, e que a geração de inibidores como furfural e hidroximetilfurfural pode ser a causa da baixa produtividade enzimática no bagaço pré-tratado por ácido e álcali.

Domingues et al. (2008) realizaram experimentos de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, nos quais compararam enzimas comerciais e enzimas de *T. reesei* obtidas por fermentação em estado sólido (FES). Observaram maior concentração de açúcares redutores totais (ART) e glicose no bagaço hidrolisado pelas enzimas obtidas de *T. reesei* por FES em comparação com as enzimas comerciais.

Olivieri et al. (2008) hidrolisaram enzimaticamente diferentes materiais lignocelulósicos previamente tratados por metodologias distintas. Os resultados para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar indicaram que o pré-tratamento por explosão a vapor em presença de um catalisador ácido resultou em 88% de hidrólise da celulose. Rendimentos inferiores foram observados para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor sem catalisador (55%) e para as amostras sem tratamento (12%). Resultados equivalentes foram obtidos para a hidrólise de eucalipto, em que as amostras com granulometria entre 20 e 100 μm apresentaram rendimentos de 88% e, amostras de pinus, com granulometria entre 30 e 45 mesh apresentaram rendimentos de 10%.

Observaram que as condições específicas de moagem apresentaram resultados tão eficientes quanto à explosão a vapor em presença de catalisador ácido. Verificaram aumento no rendimento de hidrólise com a diminuição do tamanho da partícula do bagaço e da madeira.

Pitarelo et al. (2008) estudaram o efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. O pré-tratamento por explosão a vapor se revelou eficiente para aumentar a bioconversão de materiais lignocelulósicos, sendo que a utilização de um catalisador ácido aumenta a recuperação total das frações pré-tratadas, assim como a suscetibilidade dos resíduos insolúveis à hidrólise enzimática. Neste estudo, o bagaço pré-tratado por explosão a vapor catalisado por ácido fosfórico se apresentou mais acessível à hidrólise enzimática com rendimento de 80% para a sacarificação da celulose em 8 horas de reação.

2.3.2 Hidrólise ácida

A hidrólise de biomassa por ácido diluído é, de longe, a tecnologia mais antiga para converter biomassa em etanol. A hidrólise de materiais celulósicos para obtenção de etanol vem sendo estudada desde 1819 quando Braconnot descobriu que soluções ácidas eram capazes de dissolver a celulose com a posterior conversão dos polissacarídeos em açúcares. Suas experiências eram conduzidas com ácido sulfúrico 95% a frio num primeiro estágio e, em seguida com ácido sulfúrico diluído a quente (COLETÂNEA, 1981).

O primeiro processo comercial para produção de etanol a partir de madeira foi feito na Alemanha em 1898. Este processo envolveu o uso de ácido diluído para hidrolisar a celulose para glicose, e foi capaz de produzir 76 litros de etanol por tonelada de resíduos de madeira. Os alemães logo desenvolveram um processo industrial otimizado para render cerca de 190 litros por tonelada de biomassa. Este processo logo encontrou caminho para os Estados Unidos, resultando em duas plantas comerciais operando no sul durante a I Guerra Mundial. Estas plantas usavam o que foi chamado de "O Processo Americano" — hidrólise com ácido sulfúrico diluído em um estágio. Embora os rendimentos fossem metade daquele obtido com o processo alemão original (95 litros de etanol), os benefícios do processo americano foram maiores. Uma queda

na produção de madeira forçou o fechamento das plantas após o final da I Guerra Mundial. Enquanto isto, uma pequena, mas constante pesquisa sobre hidrólise com ácido diluído continuou nos *USDA's Forest Products Laboratory* (EERE, 2007).

Mas, foi durante a Segunda Guerra Mundial que o processo aconteceu em escala industrial utilizando a madeira como substrato. Após a guerra as pesquisas cessaram, somente sendo retomadas na década de 70, devido à crise mundial do petróleo. Em vários países foram feitas tentativas de se obter em escala industrial o etanol a partir de materiais lignocelulósicos. No entanto, todos os processos se mostraram onerosos ou ineficientes na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis (COLETÂNEA, 1981).

Dentre os processos pesquisados estão os que utilizavam ácido concentrado (80%) e os processos que utilizavam ácido diluído (0,4-0,5%). Os processos com ácido sulfúrico concentrado apresentavam vantagens como alto rendimento em etanol e a possível recuperação do ácido e de produtos derivados da hidrólise como o furfural, mas desvantagens como o enorme gasto energético e o alto consumo de ácido e de sulfato de cálcio (para a neutralização), eram limitantes para a adoção do processo em escala industrial (SAVARD, 1962).

Por tudo isto, os processos com ácido diluído foram os mais pesquisados. Na França, foram desenvolvidos dois processos utilizando ácido sulfúrico diluído- Junien e Meunier- e um processo com ácido clorídrico diluído- Melle-Boinot. Este consistia em quatro ataques sucessivos da matéria lignocelulósica em condições crescentes de temperatura e pressão. A biomassa era atacada pelo ácido (0,4%) numa autoclave (5 kg/cm²) durante 15 minutos, sendo o hidrolisado esgotado a cada novo ataque. Por fim, quatro hidrolisados eram obtidos podendo ser reunidos para fermentação. Dos processos utilizando ácido diluído, apenas o Scholler e o Madison foram operados industrialmente. No processo Scholler a percolação era realizada em bateladas consecutivas até que a concentração de açúcares baixasse a níveis determinados. No processo Madison, a hidrólise passou a ser realizada por percolação contínua, o que diminuiu o tempo de digestão e o gasto energético, a decomposição do açúcar formado foi menor, pois ficava menos tempo em contato com o ácido, o que resultou em maior rendimento em etanol (SAVARD, 1962).

Martín et al. (2007c) investigaram o pré-tratamento com ácido diluído na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, cascas de arroz, cascas de amendoim e caules de mandioca. Identificaram açúcares redutores como xilose, glicose, arabinose e galactose em todos os hidrolisados, enquanto que manose foi encontrada apenas nos hidrolisados de cascas de amendoim e caules de mandioca. As hemicelulases atingiram alto grau de hidrólise e, altas concentrações de glicose foram encontradas nos hidrolisados de casca de arroz, provavelmente, devido à hidrólise do amido do grão que permaneceu aderido à casca. Cascas de amendoim e caules de mandioca renderam baixas quantidades de açúcares redutores, indicando que as condições não foram severas o suficiente para hidrolisar as hemiceluloses nestes materiais. Todos os hidrolisados foram facilmente fermentados por *Saccharomyces cerevisiae*. O ácido diluído aumentou em 2,7 a 3,7 vezes a ação da enzima no bagaço de cana-de-açúcar.

No entanto, durante a hidrólise ácida, compostos inibidores de fermentação são formados, como compostos aromáticos, principalmente fenólicos, furaldeídos como furfural e hidroximetilfurfural, ácidos alifáticos (fórmico, levulínico, acético) (MARTÍN et al., 2007c). Remover ou diluir estes compostos melhora a fermentabilidade dos hidrolisados. Vários métodos de detoxificação têm sido descritos e os efeitos na composição química dos hidrolisados lignocelulósicos têm sido investigados (MARTÍN et al., 2007c).

Segundo Rossell (2006), os esforços têm sido concentrados na fase do pré-tratamento ou hidrólise, e a questão da remoção dos compostos inibidores da fermentação tem sido relegada.

Considerando que os custos de manipulação da matéria-prima, produtos químicos e necessidades energéticas são altos, devem ser realizados esforços para utilização completa de todas as frações da matéria celulósica, principalmente da lignina, que representa cerca de 20% da matéria seca. A lignina dificulta o processo de hidrólise e sua quebra por via ácida libera compostos nocivos para a fermentação como o furfural (FINGERUT, 2007).

Apesar disto, diversos autores propõem diferentes concentrações de ácido para hidrolisar o bagaço (TORGET et al., 2000; MARTÍN et al., 2007b, 2007c).

Uma alternativa para que a lignina seja degradada sem a formação destes compostos é a via enzimática, onde o fungo produz a enzima que quebra a lignina por

rota diferente da ácida, resultando em compostos não inibidores da fermentação.

Diferentes estratégias estão sendo estudadas para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos: hidrólise e fermentação em separado – é a concepção tradicional, na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento do material lignocelulósico, ocorre antes da fermentação. Nesse processo, conhecido como SHF- *Separated Hydrolysis and Fermentation*, pode ocorrer a inibição parcial das celulasas pelo acúmulo de celobiose (DRISSEN et al., 2009); sacarificação e fermentação simultâneas – a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação ocorrem simultaneamente. Os açúcares resultantes da hidrólise da celulose são fermentados por leveduras comerciais evitando a inibição das enzimas lignocelulolíticas. No entanto, as condições ideais para a ação das enzimas não são as mesmas necessárias para os microrganismos fermentadores. Estudos têm sido feitos para que se consiga enzimas que atuem nas mesmas condições de pH e temperatura da fermentação alcoólica. Este processo é conhecido por SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (DRISSEN et al., 2009).

2.3.3 Hidrólise enzimática

A utilização de enzimas para o processamento de biomassa para etanol é relativamente recente. Enquanto a química de obtenção de açúcares a partir de madeira tem em torno de dois séculos de pesquisa e desenvolvimento e 100 anos de desenvolvimento de processos, as enzimas para hidrólise enzimática somente contam com 50 anos de esforços sérios.

A hidrólise da celulose pelos fungos (CARLILE; WATKINSON, 1994; GRIFFIN, 1994; PAPAGIANNI, 2004) se dá através de enzimas conhecidas como celulasas. Assim, são produzidos açúcares, fonte básica de energia para os fungos, por degradação de parte das fibras de celulose. As celulasas podem diminuir o comprimento e o diâmetro das fibras de celulose. Um ataque fúngico preliminar facilita a abertura das fibras da madeira por métodos mecânicos (SACHS et al., 1990). A produção de celulasas pelos fungos é lenta, porém de custo potencialmente baixo.

Somente após a Segunda Guerra Mundial foi identificado que um dos mais importantes organismos produtores de celulasas era o *Trichoderma reesei*. Entretanto,

apenas na metade da década de 60 foi descoberto que preparações de enzimas extracelulares poderiam ser obtidas preferencialmente por *T. reesei* (EERE, 2007).

O maior desafio para a tecnologia do etanol de segunda geração é a redução dos custos de produção do complexo enzimático, cujo problema pode ser resolvido com a disponibilidade de variantes genéticas, ou através da modificação do processo fermentativo, ou ambos. Segundo Pozzan et al. (2008), uma linhagem que apresenta potencial para hidrólise de materiais lignocelulósicos é a 9A02S1 de *Penicillium echinulatum*, que foi obtida por mutagênese selecionada em placa de Petri. Custos e rapidez são fatores fundamentais quando se trata de problemas dessa ordem de grandeza. O programa norte-americano do álcool inclui o desenvolvimento de novos fungos por engenharia genética para que a eficiência na produção de celulases seja aumentada (EERE, 2007).

No caso do bagaço, que possui aproximadamente 40% de celulose, a hidrólise pode ser realizada por enzimas produzidas por fungos específicos. Os organismos mais efetivos na biodegradação dos materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca e os de decomposição parda. A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e os fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branca (podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas) (FERRAZ et al., 1991; FERRAZ; DURÁN, 1995; RODRIGUEZ et al., 1997).

Dentre estes decompositores, temos os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* que são considerados fungos de podridão branca e seu mecanismo de decomposição envolve as enzimas lignina peroxidases (LiPs), as manganês peroxidases (MnPs) e as lacases (BOGAN; LAMAR, 1996), o que, segundo Matheus e Okino (1998), os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo assim responsáveis pela degradação da celulose, hemicelulose e lignina em moléculas menores até CO₂ e H₂O. Outro fungo bastante usado é o ascomiceto *Aspergillus niger*, que possui a capacidade de degradar a celulose transformando-a através da ação do complexo celulolítico e hemicelulolítico (AGUIAR; MENEZES, 2000; BETINI, 2006).

Tais fungos decompositores possuem enzimas que atuam de forma cooperativa, causando hidrólise completa de celulose até glicose. As endoglucanases rompem a

molécula de celulose ao acaso e liberam fragmentos menores que servem de substrato para as exo-glucanases. As exo-glucanases hidrolisam, pelas pontas, os fragmentos de menor massa molecular e as β -glicosidases hidrolisam a celobiose até glicose (FERRAZ, 2004).

Há séculos os fungos filamentosos vêm sendo utilizados pela humanidade na produção de alimentos, bebidas e fármacos. Entretanto, a exploração do imenso potencial desses microrganismos como produtores de uma vasta gama de enzimas extracelulares de aplicação industrial (catalases, amilases, celulases, xilanases, peroxidases, invertases, pectinases, queratinases, lipases e proteases, entre outras) somente se tornou possível com o avanço do conhecimento de sua fisiologia, bioquímica e genética. Torres et al. (2008) apontam para o potencial de aplicação industrial de diversas espécies entre elas *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*.

As etapas envolvidas na degradação microbiana da celulose ainda não estão totalmente esclarecidas, mas já se sabe que são produzidas como um sistema multi-enzimático, compreendendo basicamente três enzimas que agem sinergisticamente na hidrólise da celulose: as endoglucanases, que clivam randomicamente o polímero de celulose, alterando rapidamente seu grau de polimerização, as celobiohidrolases, que hidrolisam o polímero nos terminais não-redutores, liberando celobiose, e as celobiasas (β -glicosidase), que são responsáveis pela clivagem de cadeias pequenas, tanto de celooligossacarídeos à celobiose, até glicose, que poderá então ser utilizada nas diversas vias metabólicas do microrganismo (GARCIA-CAMPAYO, 1990 apud COELHO; NASCIMENTO, 2008).

A produção de celulases por fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo uma grande variedade de espécies dos fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. As celulases vêm sendo alvo freqüente de pesquisas desde a década de 1950, quando Elwin Reese publicou diversos trabalhos utilizando o fungo *Trichoderma viride*, que teve sua classificação alterada para *T. reesei*, em sua homenagem. A cepa selvagem *T. reesei* QM6a, isolada em 1951 por Reese, produzia um sistema de celulases ativo, capaz de hidrolisar a celulose cristalina completamente. No entanto, a quantidade de celulases produzidas por essa cepa era insuficiente para o uso industrial. Por isso, trabalhos envolvendo mutagênese foram desenvolvidos para a

obtenção de cepas com alta capacidade de produzir e excretar celulasas (RYU; MANDELS, 1980).

O fungo *T. reesei* é, provavelmente, o microrganismo cujo sistema celulolítico foi mais investigado entre os fungos filamentosos, juntamente com *Aspergillus*, devido ao seu grande potencial de aplicação industrial. Entretanto, as preparações enzimáticas brutas provenientes deste fungo apresentam um desbalanceamento entre as atividades FPase e CMCase com relação à atividade de β -glicosidase, já que a produção de β -glicosidase nas culturas de *Trichoderma* é baixa. Assim sendo, as preparações de celulasas de *Trichoderma* devem ser suplementadas com β -glicosidasas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* (GHOSH; GHOSH, 1992).

De acordo com Priest (1983) citado por Pietrobon (2008), as enzimas extracelulares podem ser induzidas, parcialmente induzidas ou constitutivas (enzima produzida constantemente, sob qualquer condição fisiológica). Compostos de baixo peso molecular são capazes de induzir a produção de uma determinada enzima. É o caso da síntese do complexo enzimático da celulase por *T. reesei* que é induzida pela presença de celulose. Enquanto a celobiose e celobiopentose são considerados indutores pobres, a sofrorose (β -1,2 dissacarídeo de glicose), que apresenta uma hidrólise mais lenta, é considerada um efetivo indutor do complexo enzimático das celulasas.

O sistema celulolítico da maioria das linhagens selvagens de *T. reesei* precisa ser induzido pela presença do substrato, sendo também suscetível à repressão catabólica em presença de fontes de carbono de fácil metabolização, como glicose. Embora a celobiose seja citada como indutor de celulasas, a sofrorose, um dissacarídeo de glicose, mesmo presente em baixas concentrações, é capaz de induzir a produção de celulasas em níveis superiores com relação à indução observada pela celobiose. A lactose, utilizada como substrato industrial para produção de celulasas, foi citada como indutora (MANDELS et al., 1962 apud BON et al., 2008).

Segundo Vitti (1988) citado por Aguiar e Menezes (2000), açúcares como glicose, sacarose, maltose e arabinose não induzem a formação de celulase total por *Aspergillus fumigatus*. Altos níveis da enzima celulolítica foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de carbono.

A regulação por glicose da produção de enzimas extracelulares tem sido muito estudada e é bem conhecido o efeito repressor deste açúcar na produção de várias enzimas como celulasas, amilases e invertase. Recentemente, a regulação por nitrogênio passou a despertar interesse devido ao efeito negativo do sulfato de amônio na produção de algumas enzimas como ligninases, peroxidases e particularmente glicoamilase produzida por *Aspergillus awamori* (BON; WEBB, 1993 apud BON et al., 2008). Fontes de nitrogênio chamadas de preferenciais, ricas ou de fácil metabolismo, como o íon amônio, a glutamina, a asparagina e a mistura de aminoácidos e peptídeos presentes na peptona e em outros concentrados proteicos comerciais, são repressoras da produção de diversas enzimas. Ao contrário, prolina e uréia, ornitina e alantoína, entre outros, chamadas de fatores não preferenciais, pobres ou de difícil metabolismo, são fontes de nitrogênio não repressoras e, portanto, o seu uso favorece, em geral, a produção de enzimas (ADRIO, 2003).

Segundo Lopes et al. (2008), que estudaram a produção de celulasas por *Trichoderma* em bagaço de cana-de-açúcar, a presença de glicose resultante da hidrólise do bagaço pode inibir a atividade enzimática deste fungo. Isto explicaria em parte, a constância do valor da atividade enzimática de 0,042 UI nos períodos de 72, 86 e 120 horas.

Flutuações nas atividades enzimáticas durante o crescimento de um fungo podem ser devidas a diversos fatores como: variação do pH pode causar inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras; algumas formas de enzimas podem sofrer ataque proteolítico preferencial; durante o crescimento do fungo estas enzimas podem ser adsorvidas pelos substratos insolúveis e serem liberadas após a exaustão da celulose (SILVA et al., 2007).

Indutores da síntese de celulasas incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose. A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo de indutor (GONG; TSAO, 1975 apud AGUIAR, MENEZES, 2000).

Segundo Pandey (1992), uma cultura de *A. niger* pode produzir cerca de vinte tipos diferentes de enzimas tais como celulasas, xilanases, poligacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase, protease ácida, e, a enzima produzida depende do tipo de substrato da hidrólise.

Segundo Menezes et al. (1991) citados por Aguiar e Menezes (2000), a atividade celulolítica de linhagens fúngicas, como *A. niger*, desenvolvidas em bagaço de cana-de-açúcar foi superior às cultivadas em carboximetilcelulose e papel de filtro. Estes autores sugeriram que estas linhagens produzem a fração exoglucanase, uma vez que o bagaço é uma celulose *in natura* e não havia recebido qualquer tratamento químico, o que exigiria ação da fração pré-hidrolítica da exoglucanase antes de ser hidrolisada pelas outras frações endoglucanase e β -glicosidase.

Menezes et al. (2007) identificaram os açúcares produzidos na hidrólise de farelo de arroz por *Pleurotus* sp. que foram glicose, frutose, celobiose, maltose, xilose e arabinose. Estes autores mostraram o seguinte perfil do hidrolisado para a degradação da matriz celulósica: avicelase (0,09 U/mL), carboximetilcelulase (0,07 U/mL), β -glicosidase (0,62 U/mL), lacase (1,60 U/L), manganês peroxidase (16,32 U/L) e xilanase (0,40 U/mL). Ainda, três classes de enzimas estão envolvidas na biodegradação da celulose em glucossacarídeos. As celobiohidrolases, que liberam celobiose de celulose microcristalina. As β -glicosidases que degradam os oligossacarídeos em glicose. Todas estas classes de enzimas têm sido frequentemente identificadas na maioria dos fungos.

ABD-EL-NASSER et al. (1997) citados por Aguiar e Menezes (2000), testaram *Phanerochaete chrysosporium* e *Coriolus versicolor* quanto à sua capacidade de produzir xilanase e celulase em resíduos agrícolas: bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó. Observaram que bagaço de cana-de-açúcar tratado, palha de trigo e espigas de milho promoveram maior indução enzimática.

Lacase e manganês peroxidase foram as principais enzimas oxidativas encontradas nos hidrolisados do resíduo de laranja. A produção de lacase (56 U/g substrato) foi maior no substrato com umidade inicial de 85%. A produção de manganês peroxidase (6,5 U/g substrato), não foi afetada pela variação da umidade. O mesmo ocorreu com as enzimas xilanase, endoglucanase, β -xilosidase e β -glicosidase. Segundo estes autores, *Pleurotus* ssp. exibem baixas atividades xilanolíticas e celulolíticas durante o estágio anamórfico de desenvolvimento, pois crescem, principalmente, em substratos altamente lignificados como a madeira e serragem, além de produzirem enzimas ligadas à polimerização da lignina (ALEXANDRINO et al., 2007).

Alexandrino et al. (2007) observaram que o fungo *Pleurotus* utilizou ativamente os açúcares redutores como fonte de carbono nos primeiros cinco dias, mas que após este período, a quantidade de açúcares redutores permaneceu constante, sugerindo que os açúcares estivessem sendo produzidos a partir da hidrólise dos polissacarídeos presentes no substrato. Estes autores relataram que a produção das enzimas lacase e manganês peroxidase depende do crescimento do fungo. Máxima atividade de lacase (75 U/g) foi obtida em 15 dias de cultivo e de manganês peroxidase (6,8 U/g) em 30 dias de cultivo.

Machado et al. (2005) avaliaram a produção de enzimas lignocelulolíticas por 125 fungos basidiomicetos tropicais em estudo de descoloração do corante azul brilhante de Remazol. Das linhagens pesquisadas, 96 apresentaram crescimento micelial e descoloração superiores a uma cepa de *Phanerochaete chrysosporium* usada como referência.

Em experimentos com linhagens do fungo *Pleurotus sp.*, para produção de enzimas utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar, Silva et al. (2007) observaram que nos sete primeiros dias de incubação não houve crescimento micelial significativo. E somente, após o décimo segundo dia de incubação foi possível perceber algum crescimento do fungo no substrato utilizado. Estes autores observaram também que as atividades das enzimas celulolíticas (avicelase e carboximetilcelulase) foram baixas e presentes somente aos sessenta dias de incubação. As enzimas lignocelulolíticas lacase e manganês peroxidase apresentaram máxima atividade aos trinta dias e lignina peroxidase aos sessenta dias. No geral, as linhagens estudadas apresentaram baixas atividades de todas as enzimas avaliadas.

O sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose cristalina é do *Trichoderma* (PERES; MELO, 1995). *Trichoderma* é um fungo de crescimento rápido, daí a vantagem de sua utilização como agente de biocontrole em larga escala.

Sanjar Kar et al. (2006), pesquisaram a produção de xilanases por *T. reesei* e, citaram que este fungo é muito utilizado para a produção de enzimas por não se tratar de um fungo patogênico e capaz de produzir elevados níveis de enzimas extracelulares, além de ser facilmente cultivado. Segundo Grigorevski-Lima et al. (2008), o fungo *Trichoderma sp* 676 tem a capacidade de crescer e produzir CMCCase, FPase e β -

glicosidase utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de nutrientes. Neste estudo, concluíram que o bagaço foi mais vantajoso que o farelo de trigo apresentando resultados cinco vezes maiores em relação à produção de CMCase e duas vezes maiores em relação à FPase. No entanto, a produção de CMCase e FPase foi maior no bagaço sem tratamento quando comparado ao pré-tratado por explosão a vapor.

Rajarathnam e Bano (1987) citados por Silva et al. (2007) observaram que espécies de *Pleurotus* não se desenvolveram bem sobre o bagaço de cana-de-açúcar e, justificaram devido a incapacidade metabólica do fungo em utilizar a sacarose presente no bagaço. Sturion (1994) citado por Silva (2007) relatou que a degradação da lignina por *Pleurotus sp.* através da lacase é maior durante a fase de colonização do substrato pelo micélio. A quebra da lignina permite a liberação de celulose e hemicelulose nesta primeira fase de desenvolvimento fúngico, facilitando o acesso enzimático biodegradativo das celulasas e hemicelulases.

Segundo Bettio et al. (2008), que verificaram a importância da granulometria do substrato para produção de celulasas, o tamanho da partícula de celulose influencia a produção das diferentes enzimas. As maiores médias de produção enzimática foram observadas no cultivo com partículas de celulose com tamanho entre 106 µm e 150 µm.

Zheng et al. (2002) realizaram uma série de experimentos de hidrólise enzimática com bagaço de cana-de-açúcar, utilizando meio aquoso em substituição à solução tampão. Os resultados indicaram que quando o meio aquoso foi utilizado o valor de pH do hidrolisado se manteve estável em 4,8. O rendimento em açúcares redutores foram os mesmos obtidos nos experimentos quando uma solução tampão foi usada. Concluíram que a produção de enzimas em meio aquoso sob condições diversas é viável.

O valor de pH do meio de cultura é parâmetro de fundamental importância e também deve ser otimizado, de forma a proporcionar um bom crescimento celular e elevados rendimentos em produto, devendo-se levar em conta a preservação da atividade biológica da enzima. Se a produção da enzima de interesse não for associada ao crescimento celular, o valor do pH ótimo da etapa de crescimento pode ser diferente daquele da etapa de produção do biocatalisador (FERRARA et al., 2006).

Kamida et al. (2005) pesquisaram a biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju* com o objetivo de verificar o envolvimento das enzimas

lignocelulolíticas neste processo. Estes autores relataram que efluente têxtil misturado com bagaço de cana-de-açúcar sofreu processo de total descoloração por este fungo em 14 dias de incubação. As enzimas lacase e peroxidase tiveram comportamentos similares, com pico de produção em 9 dias de incubação. A produção destas enzimas ocorreu durante a fase exponencial de crescimento do fungo, após a ação das enzimas celulolíticas, enquanto que a enzima manganês peroxidase apresentou pico de produção no décimo segundo dia.

2.3.4 Fungos lignocelulolíticos

Fungos são organismos eucarióticos não fotossintéticos, possuindo parede celular, com algumas exceções. Os fungos se reproduzem por meio de esporos.

Dentre os fungos xilófagos se destacam os basidiomicetos por apresentarem significativa produção de enzimas oxidativas (peroxidases e lacases) durante o crescimento micelial (fase vegetativa) e/ou na formação dos basidiomas.

Os basidiomicetos são capazes de degradar, em vários níveis, a madeira provocando manchas, emboloramentos, rachaduras e outras formas de degradação.

Colônias de fungos proliferam com relativa facilidade sobre materiais lignocelulolíticos. Estes microrganismos possuem um sistema que lhes permitem extrair, deste tipo de substrato, princípios fundamentais para sua subsistência. De fato, os fungos são microrganismos produtores de um sistema enzimático complexo, capaz de degradar substâncias químicas de estrutura complexa (como as que compõem a madeira), de modo a produzir moléculas mais simples e mais facilmente assimiláveis. Existe um grande número de fungos capazes de degradar eficientemente alguns constituintes da madeira. Em função dos mecanismos de degradação, estes fungos podem ser classificados como: de decomposição branca e de decomposição parda (BRITO et al., 2004).

Os fungos de decomposição parda geram um resíduo enriquecido em lignina, pois são responsáveis, principalmente, pela degradação de polissacarídeos, enquanto os de decomposição branca promovem a degradação de compostos lignocelulósicos ou pela remoção simultânea de todos os componentes, ou pela remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta (AGOSIN et al. 1990; FERRAZ et al., 2000 apud PIETROBON, 2008).

O *P. chrysosporium* é um fungo de decomposição branca muito utilizado em estudos de remediação de efluentes, em função da sua capacidade para produzir uma grande diversidade de enzimas. Esse microrganismo tem sido utilizado na degradação de muitas substâncias recalcitrantes, dificilmente degradadas em condições naturais como compostos organoclorados, principalmente devido à produção de significativas quantidades de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (BRITO, 2004).

Segundo Alexandrino et al. (2007), *Pleurotus* ssp. formam um grupo de cogumelos com alto valor nutricional, possuindo diversas propriedades terapêuticas e aplicações biotecnológicas. São chamados de fungos de podridão branca, por degradarem eficientemente a lignina, polímero fenólico recalcitrante encontrado nos vegetais. Tal habilidade se deve ao fato de produzir diversas enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases e manganês peroxidase.

Os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados nos processos de fermentação no estado sólido (FES), devido à sua grande capacidade de crescer na ausência de água livre e apresentarem versatilidade em suas aplicações, além de sua facilidade de adaptação e manipulação (COSTA, 1996 apud SPIER, 2005).

O crescimento do microrganismo para produção de enzimas de interesse está diretamente relacionado à disponibilidade das substâncias para suas necessidades nutricionais. Água, fontes de carbono e energia, nitrogênio e oxigênio são algumas das necessidades comuns a todos os microrganismos. Os microrganismos necessitam ainda de elementos minerais, tais como fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, ferro e, em alguns casos, cloro. Requerem, também, os chamados elementos traços que desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas. Estes últimos incluem manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro, e são, em geral, necessários em pequenas quantidades (JENNINGS, 1988 apud BON et al., 2008).

O potencial para metabolizar fontes de carbono varia entre os microrganismos. De modo geral, os compostos orgânicos da natureza, incluindo desde os chamados compostos C1 (CO, CO₂, formaldeído, metanol, metilamina) até as macromoléculas complexas (amido, proteínas, lipídeos, celulose, hemicelulose, lignina, ácidos nucleicos), podem ser utilizados como fonte de carbono e energia, desde que os microrganismos possuam os sistemas enzimáticos extra e intracelulares e de transporte

adequados. As macromoléculas são inicialmente convertidas extracelularmente a subunidades menores por enzimas hidrolíticas, sendo então, transportadas para o interior da célula e metabolizadas em vias catabólicas e/ou anabólicas (MADIGAN et al., 2000 apud BON et al., 2008).

A maioria dos estudos de biodegradação de madeira *in vitro*, por fungos de podridão branca, foi realizada com *P. chrysosporium*. Abreu et al. (2007) citaram que fungos decompositores de madeira necessitam, como pré-requisito para degradação da lignina, baixa concentração de nitrogênio no substrato, uma vez que o nitrogênio é um elemento crítico para microrganismos, pois participa da composição de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas necessárias para o crescimento celular e, conseqüentemente, para a densidade micelial.

Uma relação C:N de 103:1 em discos de eucalipto favoreceu maior desenvolvimento do fungo basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* comparado ao fungo *Pleurotus ostreatus*, que necessita de uma relação C:N menor (30:1) (ABREU et al., 2007).

As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para o rendimento em produto. Isto ocorre porque as células são capazes de responder aos estímulos químicos e físicos do meio externo através de mecanismos bioquímicos que regulam a expressão gênica e a fisiologia do microrganismo e, por extensão, seu desempenho na formação do produto desejado. Esses mecanismos são acionados, dentre outros fatores, por indutores, ativadores, inibidores e repressores (MADIGAN et al., 2000 apud BON et al., 2008).

Pandey (1992) ressalta a importância do conteúdo adequado de umidade no substrato, visto que a alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato dificultando a contaminação por bactérias. Ao contrário, baixos níveis de umidade levam a um crescimento pobre e baixa acessibilidade ao nutriente.

Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, este autor cita que altos valores de atividade de água (*aw*) do meio favorecem a germinação de esporos ou o crescimento micelial, enquanto valores baixos de *aw* estimulam a esporulação.

A temperatura exerce influência no crescimento micelial e conseqüente frutificação dentro ou sobre a madeira. As exigências de temperatura variam de acordo

com as diferentes classes de fungos. A temperatura de 25°C não é adequada ao crescimento micelial dos fungos. A velocidade do crescimento micelial é maior em razão do aumento da temperatura (CASTRO et al., 2006).

Castro et al. (2006), que estudaram a degradação da madeira por basidiomicetos em faixa de temperatura de 35 a 40°C, relataram a capacidade de adaptação desses organismos a diferentes temperaturas. Estes autores constataram que 35°C foi a temperatura ótima para o crescimento micelial, e que a 25°C não houve um bom crescimento micelial para os fungos testados.

Rendimentos ótimos de α -amilase foram alcançados entre 30 e 37°C para *Aspergillus sp.*, 30°C para *A. niger* (COSTA, 1996 apud SPIER, 2005). *A. niger* cresce a 25°C até 37°C, mas pode crescer a 45°C, enquanto que *A. terreus* não cresce a 45°C, sendo a temperatura ótima para seu crescimento 25°C. A espécie *Chrysosporium* cresce de 25 a 40°C. (GRIFFIN, 1994). Espécies de *Trichoderma* crescem entre 25 e 30°C (FISHER, 2001).

Segundo Weiland (1988) citado por Silva et al. (2007), a maioria dos fungos basidiomicetos cresce melhor em temperaturas entre 20 e 30°C e que o controle da temperatura do desenvolvimento fúngico é fator chave na regulação da fermentação semi-sólida para a otimização dos processos de deslignificação.

Dentre os fatores que podem influenciar a biodegradação de material lignocelulósico estão a procedência, a espécie e a idade das madeiras utilizadas. Madeiras velhas apresentam maior teor de extrativos que inibem o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a biodegradação deste tipo de material.

Tuor et al. (1995) citados por Abreu et al. (2007) relataram que bactérias podem favorecer o crescimento de fungos decompositores. Neste caso, os fungos produzem compostos de baixo peso molecular (compostos aromáticos) que são utilizados pelas bactérias, enquanto estas auxiliam o fungo construindo túneis ou cavidades promovendo a erosão do material lignocelulósico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho experimental foi desenvolvido no Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ / USP).

Os experimentos foram realizados em três etapas:

- etapa preliminar – delineamento em blocos utilizando seis fungos e dois pré-tratamentos de bagaço; as linhagens dos fungos foram inoculadas no bagaço pré-tratado por ácido e no bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Todos os frascos foram incubados a 28°C por 5, 10, 15 e 20 dias.
- otimização das condições de hidrólise – delineamento fatorial 2² - os fungos e pré-tratamento selecionados na etapa preliminar foram submetidos a estudos da influência das variáveis temperatura e concentração de ácido na variável concentração de açúcares redutores e hexoses.
- caracterização do bagaço – paralelamente à etapa de otimização, foram realizados experimentos de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço pré-tratado por ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,5%) foi inoculado com os fungos selecionados e incubados a 28°C por 5 dias, com a finalidade de se observar como as fibras do bagaço se apresentariam após o processo de hidrólise.

3.1 Microrganismos

Os fungos utilizados neste estudo foram selecionados entre as linhagens da Coleção de Cultura do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). As linhagens foram mantidas em meio sólido MEA (extrato de levedo - 2g/L; extrato de malte - 20g/L e ágar - 29g/L). Os fungos utilizados foram: *Aspergillus*

niger IZ-9, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Trichoderma reesei*.

3.1.1 Preparação do inóculo

Uma suspensão de esporos/micélios foi obtida a partir de 30 mL de água destilada adicionados a cada garrafa de vidro contendo as diferentes linhagens cultivadas em meio MEA; com o auxílio de bastão de vidro foi homogeneizada a massa esporogênica e micelial. Para os fungos *T. reesei* e *A. niger* foi obtido, por meio deste procedimento, uma solução micelial e para os fungos *P. chrysosporium*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* e *P. eryngii* foi obtida uma solução de esporos.

A fração não utilizada da solução de esporos/micélios foi autoclavada e descartada e, a cada ensaio foi preparada uma nova solução de esporos/micélio.

3.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Para a seleção dos fungos foram utilizados, como substrato, dois tipos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar: bagaço moído e adicionado de ácido sulfúrico (0,5%) e bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor à temperatura de 200°C por 7 minutos, 15 kg de pressão e descompressão lenta, proveniente da Usina Vale do Rosário - Orlandia/SP, foi gentilmente cedido pelos Profs. Dr. Adilson Roberto Gonçalves e George J. M. Rocha (Escola Engenharia de Lorena - EEL/USP). Portanto, o bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEV) utilizado foi previamente tratado na usina e fornecido para este trabalho.

O bagaço de cana-de-açúcar integral, proveniente de usinas da região de Piracicaba, após secagem ao sol foi submetido à moagem em moinho de martelos, MARCONI MA 090, no Laboratório de Micotoxinas do LAN, e pré-tratamento por ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,5%). Portanto, nesta etapa do trabalho o bagaço foi moído e pré-tratado com ácido (BMA).

3.3 Hidrólise do bagaço pelos fungos

Com o objetivo de selecionar o fungo capaz de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e definir o tempo de crescimento para liberação máxima de açúcares redutores foram realizados experimentos com o bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEV) e bagaço moído pré-tratado com ácido (BMA) com posterior inoculação dos fungos *A. niger*, *P. chrysosporium*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *T. reesei*, em ambos os bagaços pré-tratados.

Frascos Erlenmeyer contendo 10 g de bagaço moído e 50 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5%, foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos. O bagaço BMA foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2%.

Os frascos contendo 5 g de bagaço BEV e 10 mL de água destilada foram submetidos à autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

No preparo das amostras houve somente o processo de esterilização em comum para ambos os pré-tratamentos: explosão a vapor (BEV) e moído com ácido (BMA).

Após resfriamento, os frascos Erlenmeyer contendo o bagaço BMA e bagaço BEV foram inoculados com 3 mL e 1,5 mL, respectivamente, de uma suspensão de esporos/micélios (aproximadamente 10^7 esporos ou micélio/mL) e incubados a 28°C.

O experimento foi conduzido de forma a analisar os períodos de incubação: 5, 10, 15 e 20 dias. Após cada período foi obtido o licor resultante da hidrólise (hidrolisado), adicionando a cada frasco, contendo bagaço BMA, 100 mL de água destilada e, 65 mL a cada frasco com bagaço BEV. Os frascos foram mantidos sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente, para extração dos açúcares. Em seguida, a concentração de açúcares redutores (AR) nos hidrolisados foi determinada pelo método do ácido 3,5- dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Para os experimentos com bagaço BEV foram utilizadas 5 g de bagaço, 1,5 mL de inóculo e 65 mL de água destilada, isto é, metade do que foi utilizado para bagaço BMA. Este procedimento foi necessário para manter a mesma proporção de inóculo e água visto que a quantidade disponível de bagaço BEV era menor que a quantidade de bagaço moído.

Esta etapa preliminar foi conduzida a partir de um planejamento experimental em quatro blocos (ensaios). Em cada bloco foi analisados o efeito das variáveis

independentes (substrato, fungo, tempo, substrato*fungo, substrato*tempo, fungo*tempo, substrato*fungo*tempo) sobre a variável de resposta ou dependente (AR = açúcares redutores). As análises estatísticas dos dados foram realizadas no programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1990) utilizando o procedimento GLM. Foram realizadas as análises de variância e como a interação das variáveis independentes foi significativa, foram realizados os desdobramentos das análises com aplicação do Teste de Tukey.

3.3.1 Otimização das condições de hidrólise

Nesta fase de otimização das condições de hidrólise, os fungos e pré-tratamento selecionados na etapa preliminar foram submetidos a estudos da influência das variáveis temperatura e concentração de ácido sobre a variável concentração de açúcares redutores e hexoses.

Segundo Barros-Neto et al. (2003), o planejamento fatorial é utilizado para analisar como determinados fatores influenciam determinadas respostas. Consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis requer a condução de experimentos para as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Dessa forma, para n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2 e, n_k do fator k, o planejamento terá no mínimo $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos e será chamado de fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. O planejamento em que as variáveis são analisadas em dois níveis (superior + e inferior -) é o mais simples e utilizado. O planejamento de dois níveis e k variáveis requer a condução de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes.

O planejamento fatorial foi a ferramenta utilizada para otimização das condições de cultivo dos fungos selecionados na etapa preliminar de hidrólise do bagaço pré-tratado. Para a avaliação foi aplicado um planejamento experimental fatorial do tipo 2^2 . As faixas de trabalho utilizadas são as apresentadas na Tabela 2, compreendendo os pontos inferior (-1), superior (+1) e axiais (+ α e - α).

Nesta etapa foram avaliadas a influência das variáveis independentes, concentração de H_2SO_4 e temperatura, sobre as variáveis dependentes, concentração de açúcares redutores (analisada pelo método do DNS) e concentração de açúcares totais e hexoses (analisada por cromatografia líquida).

A faixa de temperatura utilizada variou de limite inferior em 28°C e limite superior em 40°C (CASTRO et al., 2006; FISHER, 2001; GOMES, 1985; GRIFFIN, 1994). Com relação à concentração de ácido, optou-se por não ultrapassar o limite superior de 1,2% (GOMES, 1985), pois não se pretendia um processo de hidrólise ácida e sim um pré-tratamento que possibilitasse a desestruturação do bagaço. Entenda-se por desestruturação a abertura das fibras de lignina e celulose permitindo o acesso à última.

Tabela 2- Faixas de estudo das variáveis independentes em análise no planejamento experimental fatorial do tipo 2²

Variável independente	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
[H ₂ SO ₄] (%)	0,1	0,26	0,65	1,04	1,2
Temperatura (°C)	28	29,8	34	38,3	40

A Tabela 3 apresenta o delineamento experimental aplicado. A avaliação dos resultados foi feita pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, com o objetivo de avaliar o efeito de cada variável sobre o teor de açúcares redutores produzidos e a concentração de hexoses (açúcares C6).

O ensaio foi efetuado em ordem aleatória, segundo o procedimento determinado por Barros-Neto et al. (2003) e Rodrigues & Lemma (2005). Os aplicativos “Statistica Release 5” e SAS (Statistical Analysis System) foram utilizados para o tratamento dos dados.

Tabela 3- Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições de hidrólise obtidas no planejamento fatorial do tipo 2²

Ensaio	Níveis das variáveis codificados		Temperatura (°C)	[ácido] (% v/v)
1	-1	-1	29,8	0,260
2	+1	-1	38,3	0,260
3	-1	+1	29,8	1,04
4	+1	+1	38,3	1,04
5	-1,41	0	28,0	0,650
6	+1,41	0	40,0	0,650
7	0	-1,41	34,0	0,100
8	0	+1,41	34,0	1,20
9-12	0	0	34,0	0,650

A determinação das condições ótimas foi realizada através de técnicas de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta. A análise dos resultados através da ANOVA (análise de variância) permitiu a elaboração de um modelo matemático quadrático para correlacionar as respostas desejadas em função dos parâmetros estatisticamente significativos, gerando superfícies de resposta que forneceram informações sobre as faixas mais adequadas.

Para cada ensaio do planejamento fatorial, frascos Erlenmeyer contendo 10 g de bagaço moído e 50 mL de ácido sulfúrico foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após resfriamento foram inoculados com 3 mL de uma suspensão de esporos/micélios (aproximadamente 10⁷ esporos ou micélios/mL) dos fungos previamente selecionados na etapa anterior. A seguir, foram incubados em BOD – *Biochemical Oxygen Demand* - (mod. TE-39) (TABELA 3).

3.3.2 Análise dos açúcares obtidos

Após diferentes condições de incubação o licor obtido foi analisado quanto a concentração de açúcar (AR) através do método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

Com o objetivo de identificar os açúcares presentes no licor resultante da hidrólise do bagaço moído pelos fungos selecionados, e também quantificar estes açúcares, utilizou-se o método da cromatografia líquida.

Amostras dos hidrolisados obtidos nos ensaios de otimização das condições de hidrólise (item 3.3.2) foram transferidas para tubos Eppendorf e mantidas a - 20°C até a análise.

No momento da análise as amostras, após descongelamento, foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, em seguida procedeu-se a quantificação do conteúdo de monossacarídeos via HPAEC-PAD - (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*), ajustando o equipamento de acordo com Bragatto (2007).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construídas de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: D-Fucose, D-Arabinose, D-Galactose, D-Glicose, D-Xilose, todos da Sigma®. As quantificações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex® equipado com DS50 gradiente; detector amperométrico ED50 com eletrodo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi 4 mM de NaOH e o eluente de limpeza foi de 200 mM de NaOH, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, pressão no sistema de aproximadamente 1500 psi. As amostras foram injetadas com volume de 25 µL determinado pelo *loop* de amostragem. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex® CarboPac PA1 (4 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50 mm), e o detector amperométrico associado ao eletrodo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100 mV (0 a 200 ms), +100 mV de integração (200 a 400 ms), -2000 mV (410 a 420 ms), +600 mV (430 ms) e -100 mV (440 a 500 ms) (BRAGATTO, 2007).

3.4 Caracterização do bagaço por microscopia de luz

Paralelamente aos estudos de otimização das condições de hidrólise para os fungos selecionados na etapa preliminar, foram conduzidos experimentos para caracterização do bagaço pelo método de microscopia de luz.

Para caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar foram analisados cortes longitudinais e transversais do colmo da cana e bagaço pré-tratado com ácido e hidrolisado pelos fungos *T. reesei* e *P. chrysosporium*.

3.4.1 Análises do colmo da cana-de-açúcar por microscopia de luz

Amostras do colmo de cana-de-açúcar em cortes longitudinais e transversais foram analisadas após o preparo de lâminas histológicas com o objetivo de avaliar os feixes condutores (xilema e floema), com constituição básica de lignina e celulose, respectivamente.

Cortes do colmo foram realizados com navalha e transferidos para uma solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio 1:1 e mantidos em estufa a 60°C por 48 horas para alvejar, isto é, retirada dos pigmentos vegetais. O material foi lavado abundantemente com água destilada, e corado com Astrablau (Azul de Astra e Fucsina Básica (1:1) por 3 minutos. As lâminas histológicas semi-permanentes foram preparadas com glicerina e seladas com esmalte incolor. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) aumento de 10 vezes, com as imagens capturadas na mesma escala micrométrica com câmera SAMSUNG (SDC-313) no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, Depto. de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

3.4.2 Hidrólise do bagaço

Frascos Erlenmeyers contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar e 50 mL de H₂SO₄ (0,5%) após autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos foram inoculados com uma suspensão micelial do fungo *T. reesei* ou com suspensão de esporos de *P. chrysosporium*. Após 5 dias de incubação a 28°C foram retiradas alíquotas contendo um grama de bagaço hidrolisado para as análises de microscopia.

3.4.3 Preparação das amostras para microscopia

Às alíquotas de 1 grama de bagaço hidrolisado foi adicionada uma solução contendo ácido acético glacial (98%) e peróxido de hidrogênio (98%) na proporção de

1:1 até a total imersão da amostra. Esta preparação foi transferida para estufa a 60°C e incubada por 48 horas para dissociação do material. Após o período de dissociação as amostras foram submetidas a sucessivas lavagens com água destilada em papel filtro Whatman nº1 até total retirada da solução de ácido acético e peróxido de hidrogênio. As alíquotas foram recolhidas do papel filtro com espátula e mantidas em água destilada sob refrigeração para posterior processo de coloração.

3.4.4 Coloração e confecção de lâminas histológicas

Para a coloração das amostras foram utilizados os corantes Azul de Astra (1%) para corar celulose e Safranina (1%) para corar lignina. Cada amostra foi corada com Safranina por 2 minutos, e em seguida com Azul de Astra por 8 minutos. Entre os processos a amostra foi lavada para retirada do excesso de corante.

As lâminas histológicas semi-permanentes foram montadas com uma pequena quantidade da amostra corada, uma gota de glicerina, colocação da lamínula, e seladas com esmalte incolor. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) aumento de 20 vezes, com as imagens capturadas na mesma escala micrométrica com câmera SAMSUNG (SDC-313).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi submetido à moagem e pré-tratamento ácido, sendo denominado BMA (bagaço moído pré-tratado por ácido) e uma amostra foi pré-tratada por explosão a vapor (BEV) (Tabela 4). O pré-tratamento por explosão a vapor é um procedimento realizado pelas usinas com o objetivo de aumentar a digestibilidade do bagaço para alimentação de ruminantes. Estes bagaços foram analisados por Pietrobon (2008) e por Rocha (2009).

Tabela 4- Composição do bagaço utilizado neste trabalho

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
BMA	54,55	26,75	10,44	PIETROBON, 2008
BEV	51,7	8,9	34,3	ROCHA, 2009

4.1 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelos fungos *A. niger*, *P. chrysosporium*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *T. reesei*

O bagaço integral sem pré-tratamento (controle) apresentou concentração de açúcares redutores (AR) de 0,01 g/L enquanto o bagaço moído pré-tratado por H₂SO₄ (0,5%) (BMA) sem o cultivo com fungo (controle) liberou 13,42 g/L de AR.

Em diferentes períodos de cultivo dos fungos *A. niger*, *P. chrysosporium*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *T. reesei* em BMA foram analisadas as concentrações de açúcares resultantes. Após 5 dias de cultivo do fungo *T. reesei* em bagaço BMA foi liberado 18,60 g AR/L (Tabela 5). Esta foi a maior concentração de açúcares redutores, liberada por este fungo, em até 20 dias de cultivo, apesar de estatisticamente os valores obtidos para 5, 15 e 20 dias não apresentarem diferença estatística significativa (Figura 1). Por outro lado, o cultivo com *P. chrysosporium* liberou 15,33 g/L, em 5 dias, o que estatisticamente não difere, em 5% de significância, do valor observado para o *T. reesei*.

O cultivo dos fungos em bagaço BMA, após 10, 15 e 20 dias de cultivo, não apresentaram diferença significativa, embora os fungos *P. eryngii*, *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* tenham apresentado bom desempenho aos 20 dias.

Tabela 5- Açúcares redutores (g/L) liberados na hidrólise do bagaço moído pré-tratado com H₂SO₄ (0,5%) (BMA) por fungos

Fungo	Tempo (dias)			
	5	10	15	20
<i>A. niger</i>	13,48 Ba	16,41 Aa	15,42 Aa	14,16 Aa
<i>P. chrysosporium</i>	15,33 ABab	12,61 Ab	12,89 Ab	17,94 Aa
<i>P. eryngii</i>	13,26 Bb	13,51 Ab	13,04 Ab	17,94 Aa
<i>P. ostreatus</i>	12,45 Ba	12,82 Aa	12,88 Aa	16,19 Aa
<i>P. sajor-caju</i>	12,81 Ba	12,80 Aa	13,92 Aa	16,19 Aa
<i>T. reesei</i>	18,60 Aa	13,90 Ab	14,55 Aab	14,34 Aab

Nota: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

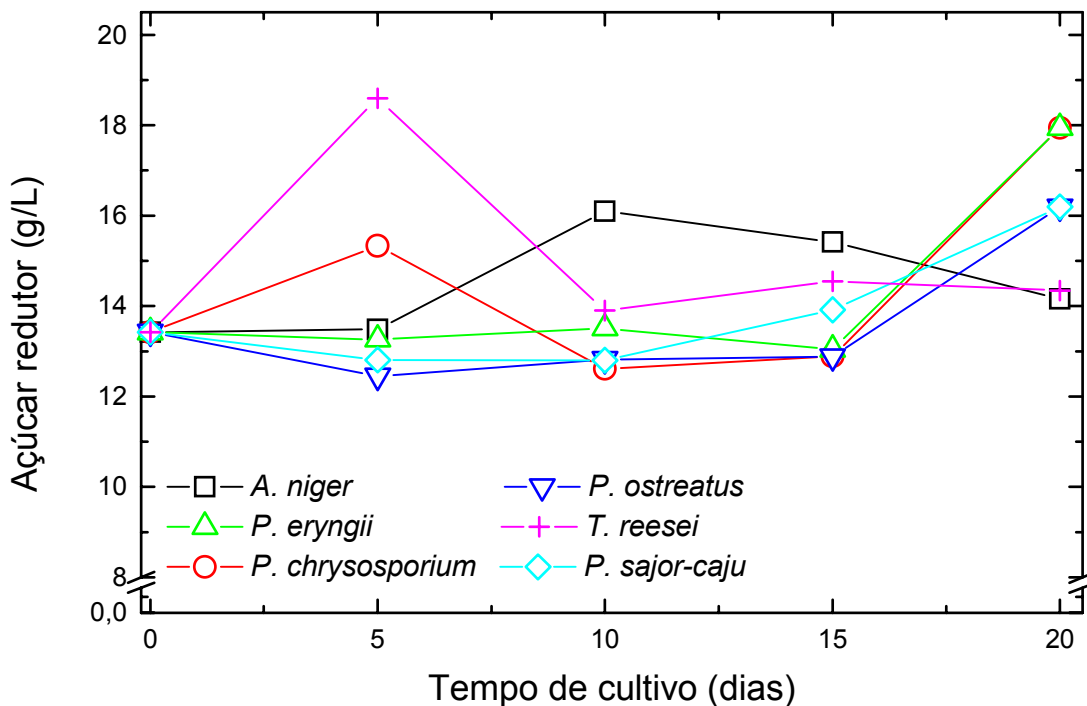


Figura 1- Açúcares redutores liberados durante cultivo de bagaço de cana moído e pré-tratado por ácido (BMA) e incubados com fungos a 29°C

Estudo semelhante foi realizado com o bagaço pré-tratado por explosão a vapor, BEV. O controle, sem o cultivo com os fungos liberou 3,13 g/L de açúcares redutores e

o BEV cultivado pelos fungos *A. niger*, *P. chrysosporium*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *T. reesei* (Figura 2) não apresentou diferença significativa com relação a liberação de açúcar redutor, até 15 dias (Tabela 6). Entre os fungos analisados ocorreu diferença significativa após 20 dias de cultivo, com o *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*, devido a diminuição de cerca de 50% do AR observado para cada fungo.

Mesmo apresentando desempenho inferior ao apresentado com o BMA (Tabela 5), aos 5 dias *T. reesei* apresentou a maior concentração de açúcares redutores (3,39 g/L) liberados, seguido pelo *A. niger* com 3,29 g/L.

O *T. reesei* apresentou diminuição na concentração dos açúcares a partir do 5º dia, assim como na hidrólise de bagaço moído (Tabela 5). Enquanto o *A. niger* mostra certa constância em seus resultados no bagaço pré-tratado por explosão a vapor (Tabela 6).

Tabela 6- Açúcares redutores (g/L) liberados na hidrólise do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEV) por fungos

Fungo	Tempo (dias)			
	5	10	15	20
<i>A. niger</i>	3,29 Aa	3,19 Aa	3,25 Aa	3,45 Aa
<i>P. chrysosporium</i>	3,25 Aa	2,68 Aa	2,26 Aab	1,46 Cb
<i>P. eryngii</i>	3,15 Aa	2,95 Aa	2,73 Aa	3,02 Aa
<i>P. ostreatus</i>	3,28 Aa	2,84 Aa	2,72 Aab	1,67 BCb
<i>P. sajor-caju</i>	2,98 Aa	3,04 Aa	2,79 Aa	3,37 Aa
<i>T. reesei</i>	3,39 Aa	2,69 Aa	2,58 Aa	2,71 ABa

Nota: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

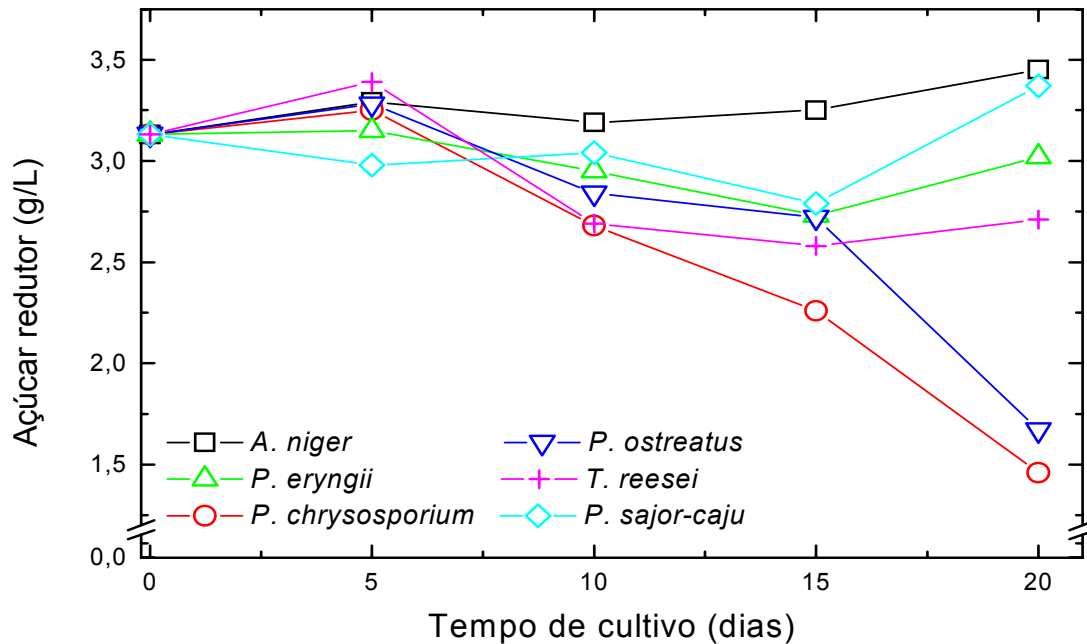


Figura 2- Açúcares redutores liberados durante cultivo de bagaço pré-tratado por explosão a vapor com fungos

As quantidades de açúcares redutores liberados durante cultivo do bagaço pré-tratado por explosão a vapor foram 5 a 10 vezes menores que os obtidos na hidrólise do bagaço BMA (Tabela 7).

Tabela 7- Açúcares redutores (g/L) liberados na hidrólise enzimática do bagaço moído pré-tratado por ácido (BMA) e bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEV) por fungos

Fungo	Tempo (dias)							
	5		10		15		20	
	BMA	BEV	BMA	BEV	BMA	BEV	BMA	BEV
<i>A. niger</i>	13,48a	3,29 b	16,41a	3,19 b	15,42a	3,25 b	14,16a	3,45b
<i>P. chrysosporium</i>	15,33a	3,25 b	12,61a	2,68 b	12,89a	2,26 b	17,94a	1,46 b
<i>P. eryngii</i>	13,26a	3,15 b	13,51a	2,95 b	13,04a	2,73b	17,94a	3,02 b
<i>P. ostreatus</i>	12,45a	3,28 b	12,82a	2,84 b	12,88a	2,72 b	16,19a	1,67 b
<i>P. sajor-caju</i>	12,81a	2,98 b	12,80a	3,04 b	13,92a	2,79 b	16,19a	3,37 b
<i>T. reesei</i>	18,60a	3,39 b	13,90a	2,69 b	14,55a	2,58 b	14,34a	2,71 b

Nota: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas, não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

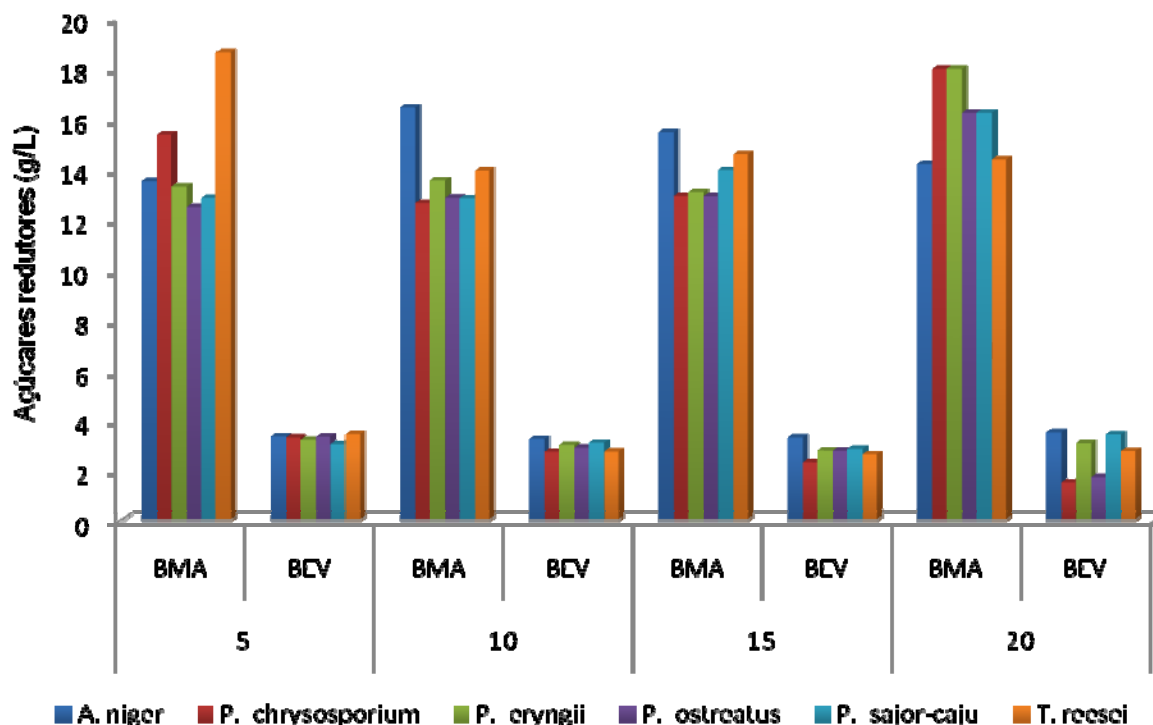


Figura 3- Açúcares redutores liberados na hidrólise de bagaço moído pré-tratado por ácido e bagaço pré-tratado por explosão a vapor e incubados com fungos

No BEV, após 20 dias de cultivo, os fungos *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*, apresentaram um consumo maior de AR (Figura 2) diferentemente do BMA (Figura 1), onde os fungos foram responsáveis pela liberação de AR. Isto pode ser explicado pelo fato que o pré-tratamento por explosão a vapor torna os açúcares mais acessíveis aos fungos. Desse modo, os açúcares disponíveis são utilizados pelos fungos, como fonte de carbono, para o seu desenvolvimento. Enquanto no bagaço moído (BMA) há necessidade dos fungos produzirem enzimas que degradem a celulose para obtenção dos nutrientes básicos para seu crescimento (ABREU et al., 2007; JENNINGS, 1988 apud BON et al., 2008; MADIGAN et al., 2000 apud BON et al., 2008); neste caso, o tempo requerido é maior e isto favoreceu a . A inibição de enzimas pela presença de glicose, resultante deste pré-tratamento, pode ser também a causa do baixo rendimento observado (MANDELS et al., 1962 apud BON et al., 2008; PRIEST, 1983 apud PIETROBON, 2008; VITTI, 1988 apud AGUIAR, MENEZES, 2000).

A partir dos resultados obtidos nesta etapa foi possível selecionar os fungos e o tipo de pré-tratamento do bagaço que apresentaram melhor desempenho no processo de hidrólise, isto é, maior concentração de açúcares redutores no menor tempo analisado, que foram *T. reesei* e *P. chrysosporium* em 5 dias de cultivo em bagaço moído e pré-tratado com ácido.

Como mencionado anteriormente, *P. eryngii*, *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* apresentaram resultados superiores de açúcares redutores aos 20 dias em bagaço BMA. No entanto, para que o processo de hidrólise possa se tornar industrialmente viável não poderá levar 20 dias para a liberação dos açúcares. Assim sendo, 5 dias foi o tempo de incubação selecionado como mais adequado para a continuidade dos experimentos.

4.2 Otimização das condições de hidrólise de BMA por *T. reesei*

A otimização das condições de hidrólise de bagaço moído pré-tratado por ácido (BMA) e cultivado por linhagens de *T. reesei* ou *P. chrysosporium* por 5 dias, foi realizada através de experimentos em um planejamento fatorial 2^2 . Nesta combinação foram avaliadas as influências das variáveis independentes, concentração de ácido (H_2SO_4 , 0,1 a 1,2%, v/v) e temperatura (28 a 40°C), sobre as variáveis dependentes, concentração de açúcares redutores (pelo método do DNS) e hexoses (por cromatografia líquida), resultando em 12 tratamentos.

As concentrações de açúcares redutores (AR) e hexoses obtidas após o cultivo de *T. reesei* em BMA nos experimentos em planejamento fatorial estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8- Resultados do planejamento fatorial para liberação de açúcares redutores (AR) e hexoses durante o cultivo de *T. reesei* em bagaço de cana moído e pré-tratado por ácido (BMA)

Ensaio	Temperatura (°C)	[H ₂ SO ₄] (% v/v)	AR ⁽¹⁾ (g/L)	Hexoses ⁽²⁾ (g/L)
1°	29,8	0,26	7,39	0,1330
2°	38,3	0,26	7,90	0,1507
3°	29,8	1,04	19,66	0,6790
4°	38,3	1,04	18,36	0,8096
5°	28	0,65	15,77	0,2704
6°	40	0,65	15,41	0,2620
7°	34	0,1	3,17	0,0832
8°	34	1,2	20,42	0,6189
9°	34	0,65	16,94	0,2975
10°	34	0,65	17,10	0,3797
11°	34	0,65	16,94	0,3218
12°	34	0,65	16,94	0,1953

Nota: ⁽¹⁾ método do DNS (MILLER, 1959).

⁽²⁾ método da cromatografia líquida - HPAE-PAD (BRAGATTO, 2007).

A análise de variância do planejamento fatorial para *T. reesei* possibilitou a obtenção de um modelo quadrático para a liberação de açúcares redutores e hexoses em função da temperatura e da concentração de ácido na hidrólise do bagaço por *T. reesei*.

O modelo codificado otimizado (Equação 1) para a liberação de açúcares redutores foi validado pela análise de variância (ANOVA) (Tabelas 9 e 10). O coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,99$) e o teste F para a liberação de açúcares redutores foram válidos a 95% de confiança.

Os dados experimentais ajustados pela equação 1 demonstram que as variáveis, temperatura e concentração de ácido, afetaram a resposta, sendo que o termo linear da concentração de ácido apresentou maior coeficiente absoluto (+47,4962).

$$AR = -55,4063 + 3,0970T + 47,4962A - 0,0435T^2 - 17,7162A^2 - 0,2745TA \quad (1)$$

Onde:

AR = açúcares redutores (g/L);

T = temperatura (°C);

A= concentração de ácido (%).

Tabela 9- Coeficientes de regressão para a resposta de açúcares redutores no planejamento fatorial para *T. reesei*

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Limite de coeficiente -95%	Limite de Coeficiente +95%
Média	-55,4063	8,524803	-6,4994	0,000632	-76,2657	-34,5468
Temp (L)	3,0970	0,488012	6,3464	0,000717	1,9030	4,2912
Temp (Q)	-0,0435	0,007098	-6,1219	0,000868	-0,0608	-0,0261
Ácido (L)	47,4962	3,510714	13,5289	0,000010	38,9057	56,08866
Ácido (Q)	-17,7162	0,844473	-20,9790	0,000001	-19,7826	-15,6499
Temp x Ácido	-0,2745	0,097625	-2,8120	0,030677	-0,5134	-0,0356

$R^2 = 0,99$

Através desta análise, é possível observar que tanto o efeito da temperatura quanto o efeito do ácido foram muito significativos na liberação de açúcares redutores na hidrólise do bagaço por *T. reesei* (Tabela 10).

Tabela 10- ANOVA para a liberação de açúcares redutores no planejamento fatorial para *T. reesei*

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Temperatura	3	4,972174	1,657391	15,82	0,0030**
Ácido	3	324,496623	108,165541	1032,70	<0,0001**

** muito significativo a 5% de significância

A análise da superfície de resposta e as curvas de contorno geradas (Figuras 4 e 5) indicam valores de ponto crítico, temperatura (32,19°C) e concentração de ácido (1,09%), para um ponto estacionário máximo de liberação de açúcares redutores de 20,35 g/L.

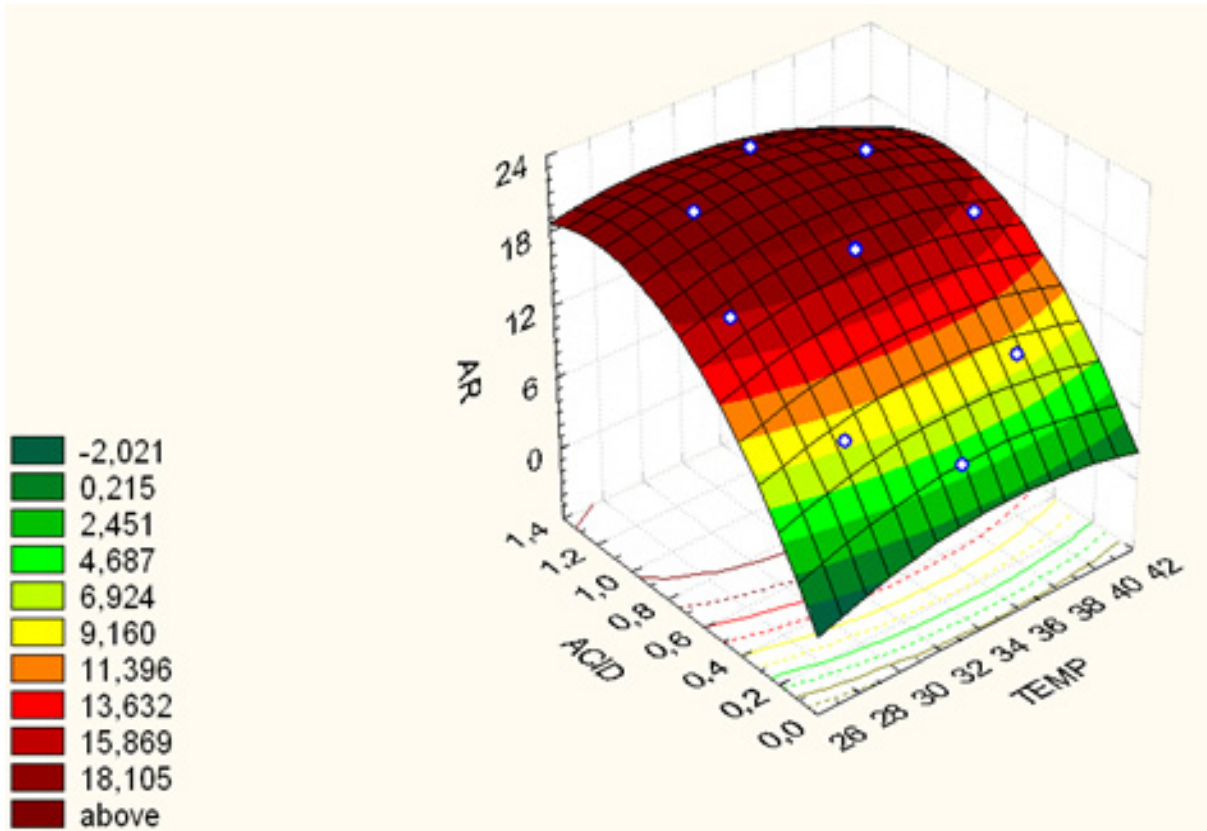


Figura 4- Superfície de resposta para liberação de açúcares redutores por *T. reesei*

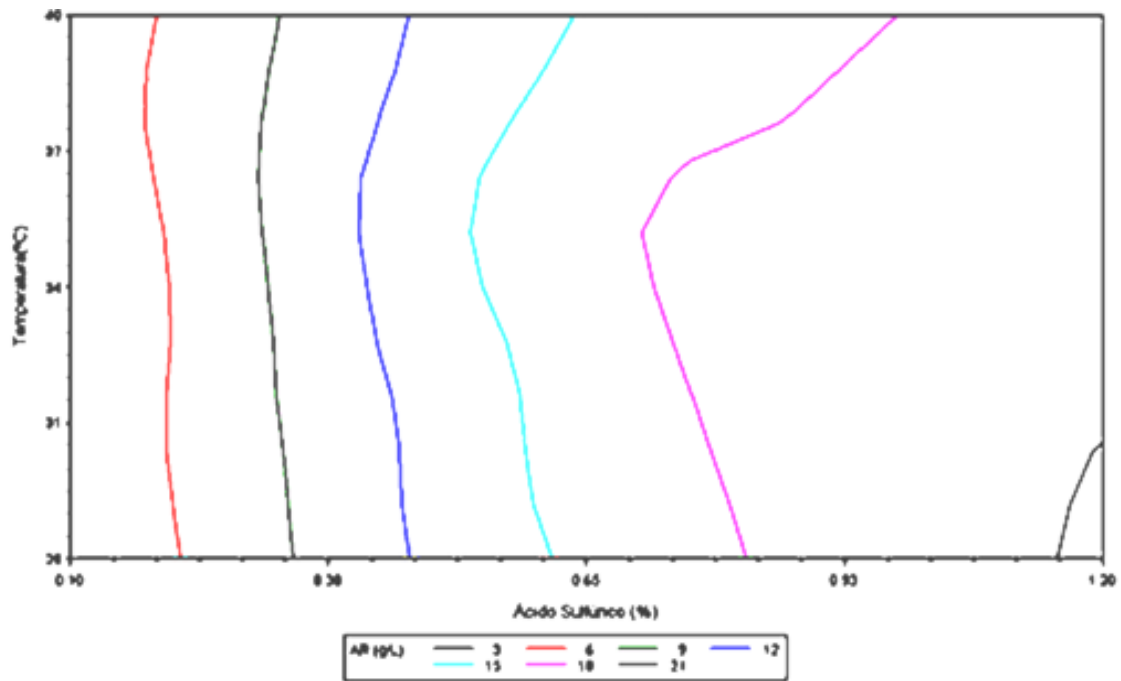


Figura 5- Curvas de contorno para liberação de açúcares redutores por *T. reesei*

Os resultados da liberação de hexoses também foram avaliados estatisticamente, obtendo-se o modelo codificado em função da temperatura e da concentração de ácido apresentado na Equação 2. Este foi validado pela análise de variância (Tabelas 11 e 12), pelo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,86$) e valores de F. Com o modelo codificado validado pela ANOVA foi possível se obter a superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 6 e 7).

$$\text{HEX} = 1,4437 - 0,0743T - 0,4785A + 0,0009T^2 + 0,3968A^2 + 0,0174TA \quad (2)$$

Onde:

HEX = açúcares redutores (g/L);

T = temperatura (°C);

A = concentração de ácido (%).

Tabela 11- Coeficientes de regressão para a resposta de hexoses no planejamento fatorial para *T. reesei*

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Limite de coeficiente -95%	Limite de Coeficiente +95%
Média	1,443707	3,066365	0,470820	0,654398	-6,05942	8,946830
Temp (L)	-0,74344	0,175537	-0,423521	0,686677	-0,50387	0,355181
Temp (Q)	0,000987	0,002553	0,386370	0,712553	-0,00526	0,007234
Ácido (L)	-0,478553	1,262801	-0,378962	0,717765	-3,56852	2,611409
Ácido (Q)	0,396828	0,303756	1,306404	0,239256	-0,34644	1,140093
Temp x Ácido	0,017421	0,035116	0,496115	0,637461	-0,06850	0,103346

$R^2 = 0,86$

Tabela 12- ANOVA para a liberação de hexoses no planejamento fatorial para *T. reesei*

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Temperatura	3	0,007835	0,002612	0,19	0,8981*
Ácido	3	0,508428	0,169476	12,47	0,0055**

*não significativo a 5% de significância

**muito significativo a 5% de significância

É possível observar que o efeito da temperatura não foi significativo a 95% de confiança e, que o efeito do ácido foi muito significativo, a 95% de confiança, na liberação de hexoses na hidrólise do bagaço por *T. reesei*.

A análise da superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 6 e 7) geradas pelos aplicativos indicam valores de ponto crítico, temperatura (40,18°C) e concentração de ácido (-0,28%), para um ponto estacionário mínimo de liberação de hexoses de 0,018 g/L.

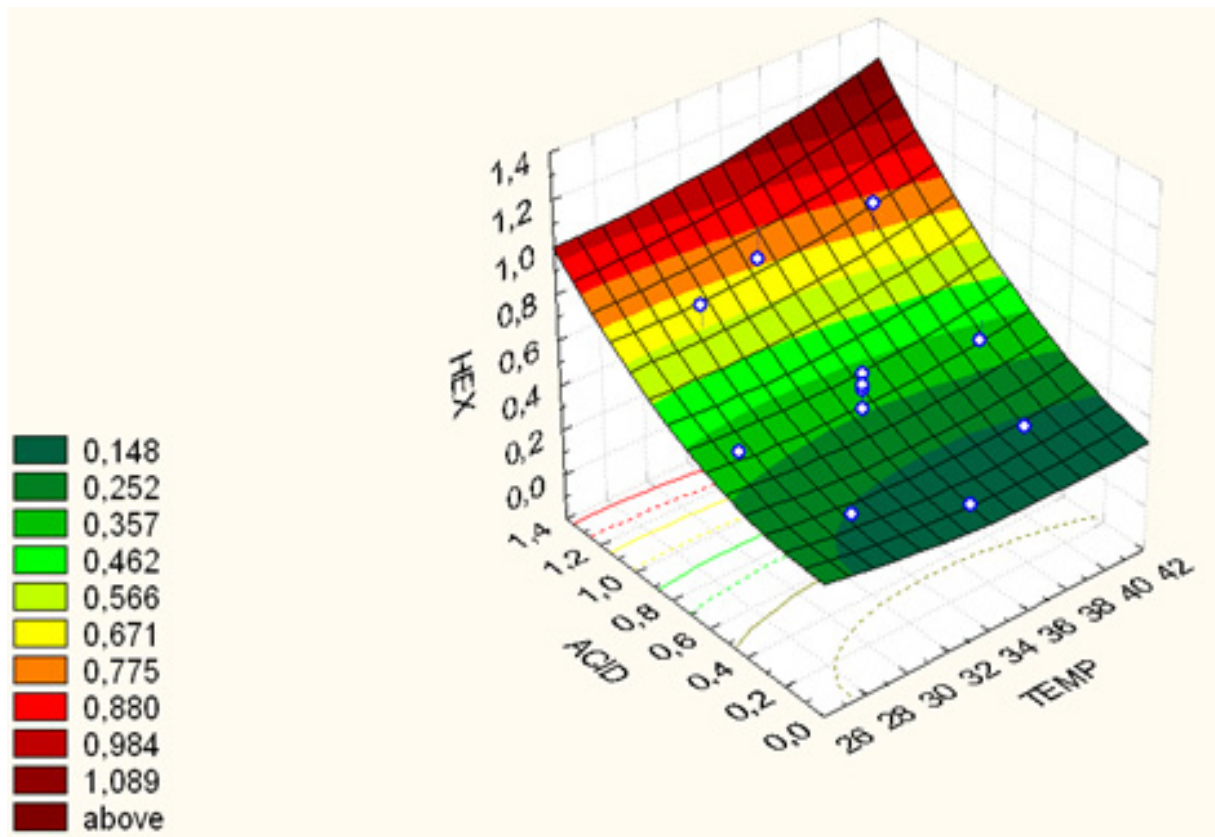


Figura 6- Superfície de resposta para liberação de hexoses por *T. reesei*

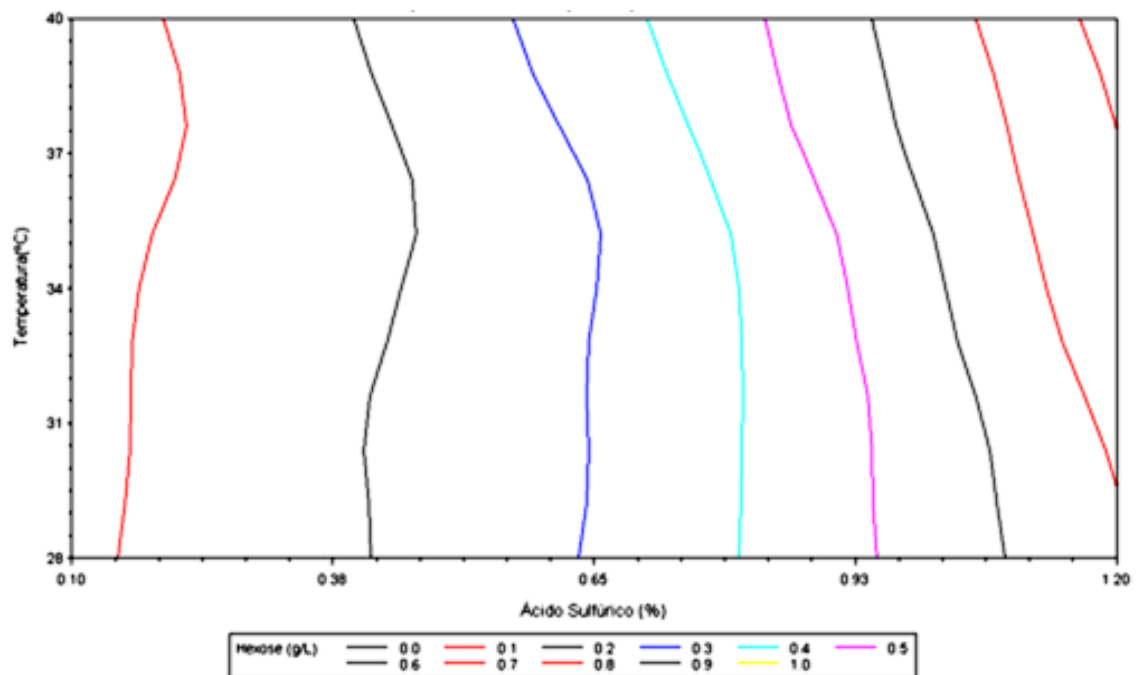


Figura 7- Curvas de contorno para liberação de hexoses por *T. reesei*

4.3 Otimização das condições de hidrólise de BMA por *P. chrysosporium*

A Tabela 13 apresenta os resultados da hidrólise do bagaço moído por *P. chrysosporium* no planejamento fatorial onde a temperatura e a concentração de ácido influenciaram o desempenho do fungo neste processo.

Tabela 13- Resultados do planejamento fatorial para liberação de açúcares redutores (AR) e hexoses durante o cultivo de *P. chrysosporium* em bagaço de cana moído e pré-tratado por ácido (BMA)

Ensaio	Temperatura (°C)	[H ₂ SO ₄] (%)	AR ⁽¹⁾ (g/L)	Hexoses ⁽²⁾ (g/L)
1º	29,8	0,26	7,66	0,1011
2º	38,3	0,26	7,70	0,1314
3º	29,8	1,04	18,49	0,5283
4º	38,3	1,04	17,39	0,5647
5º	28	0,65	15,52	0,3506
6º	40	0,65	15,31	0,2378
7º	34	0,1	3,09	0,0619
8º	34	1,2	19,96	0,4299
9º	34	0,65	16,77	0,3623
10º	34	0,65	16,40	0,2122
11º	34	0,65	16,56	0,1929
12º	34	0,65	16,35	0,3666

Nota: ⁽¹⁾ método do DNS (MILLER, 1959).

⁽²⁾ método da cromatografia líquida - HPAE-PAD (BRAGATTO, 2007).

Os resultados obtidos pelo método do DNS foram superiores comparados com os obtidos por cromatografia (Tabela 13). Segundo Pietrobon (2008), a metodologia de quantificação por cromatografia líquida apresenta maior acuidade quando comparada com a metodologia por DNS, pois os açúcares são quantificados separadamente, e também pelo fato do detector amperométrico ter sido programado para determinar apenas carboidratos. O hidrolisado deve ser tratado para a retirada de compostos que

possam ser reduzidos para que não interfiram na análise por DNS. Segundo Rivers et al. (1983) citados por Pietrobon (2008), compostos como 5-hidroximetilfurfural e furfural podem fornecer grupos redutores reativos e, conseqüentemente, interferirem na coloração do hidrolisado. Aldeídos de baixo peso molecular também fornecem grupos redutores reativos que podem levar a erros quantitativos significativos (Rivers et al., 1983 apud Pietrobon, 2008).

A utilização das técnicas de planejamento experimental foi uma ferramenta muito valiosa, pois o reduzido número de ensaios, quando comparado aos delineamentos tradicionais, permitiu não somente uma redução do tempo necessário para a condução do estudo, como também uma redução no consumo de reagentes e solventes nas análises. A qualidade dos dados gerados, por sua vez, possibilitou a obtenção de conclusões mais completas, pois foi possível avaliar os efeitos e interações das variáveis em estudo.

A partir dos resultados de açúcares redutores e hexoses observados durante cultivo de *P. chrysosporium* em bagaço moído pré-tratado por ácido (BMA) (Tabela 13) e utilizando os aplicativos “*Statistic Release 5*” e SAS, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro (temperatura e concentração de ácido) sobre a liberação de açúcares redutores e hexoses durante a hidrólise. Realizou-se a análise da influência dos parâmetros para as duas respostas.

Os dados do planejamento fatorial foram submetidos a uma análise de variância (Tabela 14), análise de regressão e teste F (Tabela 15). Observa-se que o coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,99$) e o teste F para a liberação de açúcares redutores foram válidos a 95% de confiança.

Os dados experimentais ajustados pela equação 3 demonstram que as variáveis, temperatura e concentração de ácido, afetaram a resposta, sendo que o termo linear da concentração de ácido apresentou maior coeficiente absoluto (+43,0501).

$$AR = - 48,6341 + 2,7758T + 43,0501A - 0,0397T^2 - 17,5812A^2 - 0,1749TA \quad (3)$$

Onde:

AR = açúcares redutores (g/L);

T = temperatura (°C);

A = concentração de ácido (%).

Tabela 14- Coeficientes de regressão para a resposta de açúcares redutores no planejamento fatorial para *P. chrysosporium*

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Limite de coeficiente -95%	Limite de Coeficiente +95%
Média	-48,6341	16,73497	-2,9061	0,027117	-89,5831	-7,6851
Temp (L)	2,7758	0,95801	2,8974	0,027426	0,4316	5,1200
Temp (Q)	-0,0397	0,01393	-2,8499	0,029185	-0,0738	-0,0056
Ácido (L)	43,0501	6,89185	6,2465	0,000780	26,1864	59,9139
Ácido (Q)	-17,5812	1,65778	-10,6053	0,000041	-21,6376	-13,5247
Temp x Ácido	-0,1749	0,19165	-0,9129	0,396514	-0,6439	0,2940

$R^2 = 0,99$

Tabela 15- ANOVA para a liberação de açúcares redutores no planejamento fatorial para *P. chrysosporium*.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Temperatura	3	3,854969	1,284990	3,18	0,1058**
Ácido	3	291,855878	97,285293	241,02	<0,0001**

**muito significativo a 5% de significância.

As Figuras 8 e 9 apresentam a superfície de resposta e curvas de contorno para os resultados da influência das variáveis independentes, temperatura e concentração de ácido, sobre a variável dependente – concentração de açúcares redutores.

A tendência das curvas mostra os valores de ponto crítico, temperatura (32,6°C) e concentração de ácido (1,06%), para um ponto estacionário máximo de liberação de açúcares redutores de 19,48 g/L.

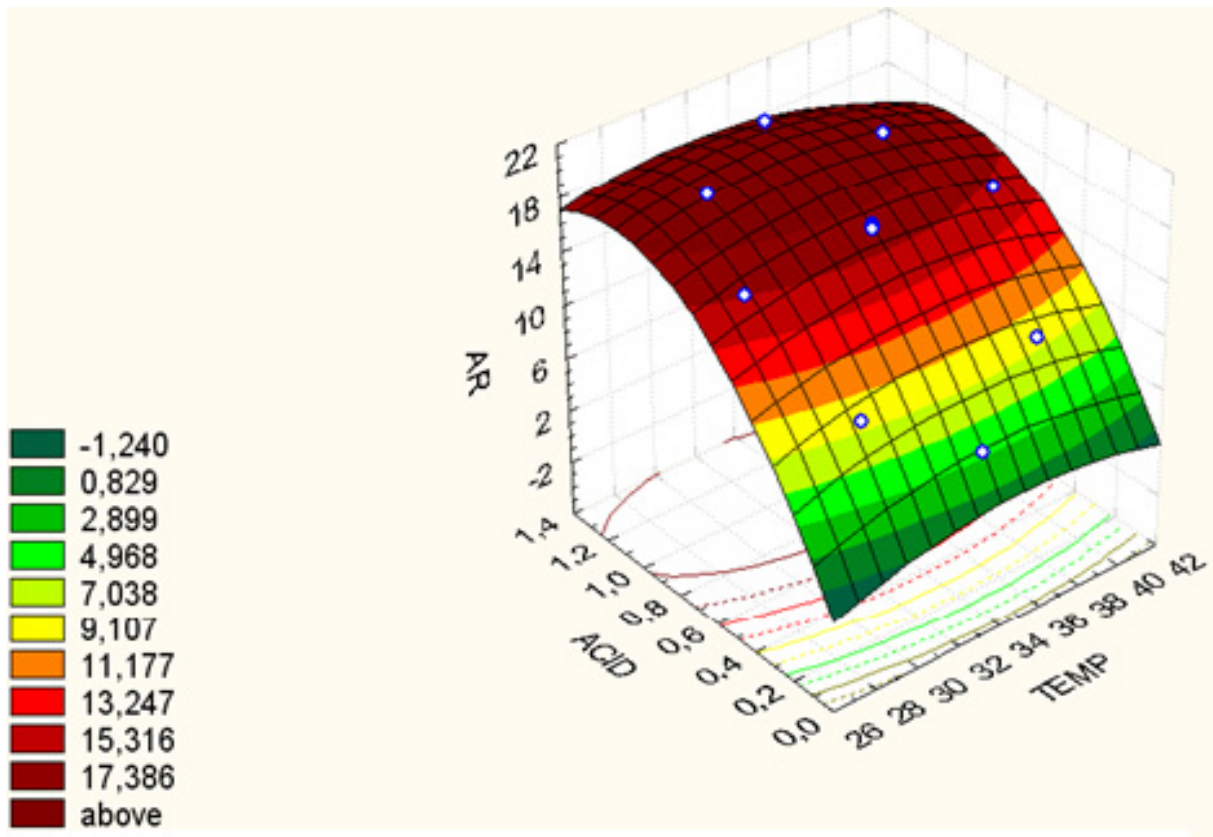


Figura 8- Superfície de resposta para liberação de açúcares redutores por *P. chrysosporium*

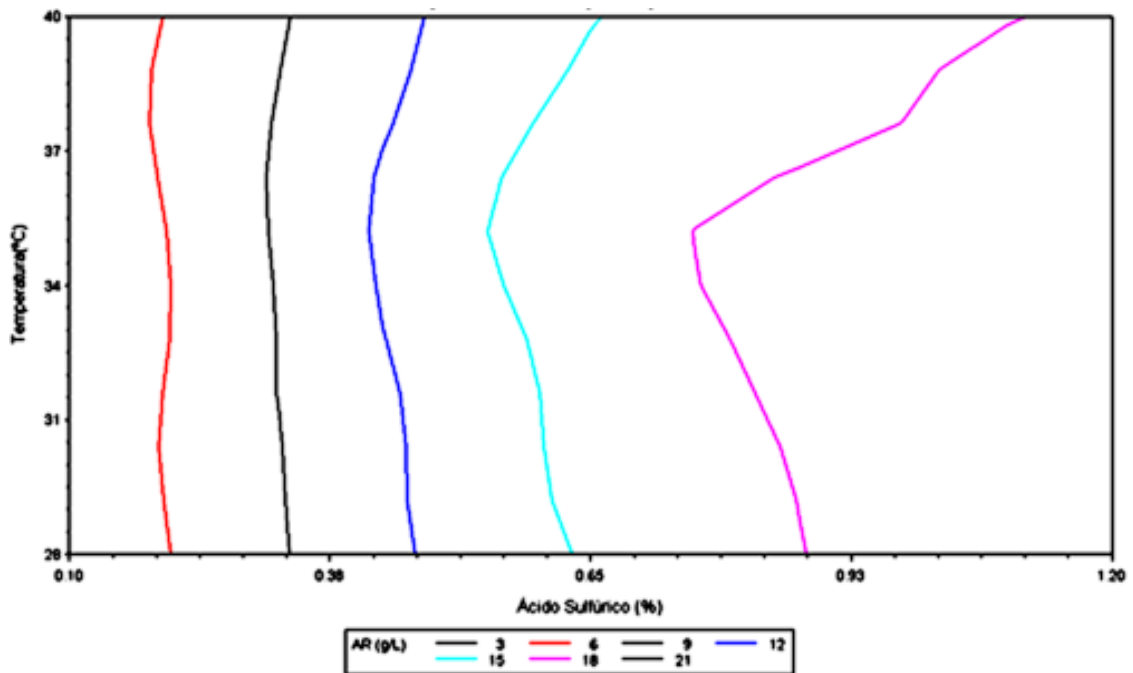


Figura 9- Curvas de contorno para liberação de açúcares redutores por *P. chrysosporium*

Os resultados da liberação de hexoses também foram avaliados estatisticamente, obtendo-se o modelo codificado em função da temperatura e da concentração de ácido apresentado na equação 4.

Os dados experimentais ajustados pela equação 4 demonstram que as variáveis, temperatura e concentração de ácido, afetaram a resposta, sendo que o termo linear da concentração de ácido apresentou maior coeficiente absoluto (+ 0,429).

$$\text{HEX} = 1,4676 - 0,0836T + 0,4297A + 0,0011T^2 - 0,0214A^2 + 0,0012TA \quad (4)$$

Onde:

HEX = açúcares redutores (g/L);

T = temperatura (°C);

A = concentração de ácido (%).

Este modelo foi validado pela análise de variância, pelo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,82$) (Tabelas 16 e 17), e valores de F. Com o modelo codificado validado pela ANOVA foi possível se obter a superfície de resposta e curvas de entorno (Figuras 10 e 11) para liberação de hexoses.

Tabela 16- Coeficientes de regressão para a resposta de hexoses no planejamento fatorial para *P. chrysosporium*

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Limite de coeficiente -95%	Limite de Coeficiente +95%
Média	1,467648	2,510980	0,584492	0,580186	-4,67650	7,611796
Temp (L)	-0,083632	0,143744	-0,581814	0,581877	-0,43536	0,268096
Temp (Q)	0,001178	0,002091	0,563356	0,593605	-0,00394	0,006294
Ácido (L)	0,429783	1,034081	0,415619	0,692144	-2,10052	2,960087
Ácido (Q)	-0,021462	0,248739	-0,086283	0,934049	-0,63011	0,587181
Temp x Ácido	0,001220	0,028755	0,042412	0,967547	-0,06914	0,071581

$R^2 = 0,82$

Tabela 17- ANOVA para a liberação de hexoses no planejamento fatorial para *P.chrysosporium*

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Temperatura	3	0,003953	0,001318	0,14	0,9292*
Ácido	3	0,238797	0,079599	8,76	0,0130**

*não significativo a 5% de significância

**muito significativo a 5% de significância

As Figuras 10 e 11 apresentam a superfície de resposta e curvas de contorno para os resultados da influência das variáveis independentes, temperatura e concentração de ácido, sobre a variável dependente – concentração de hexoses.

A tendência das curvas mostra os valores de ponto crítico, temperatura (29,4°C) e concentração de ácido (10,73%), para um ponto estacionário de sela para a liberação de hexoses de 2,52 g/L.

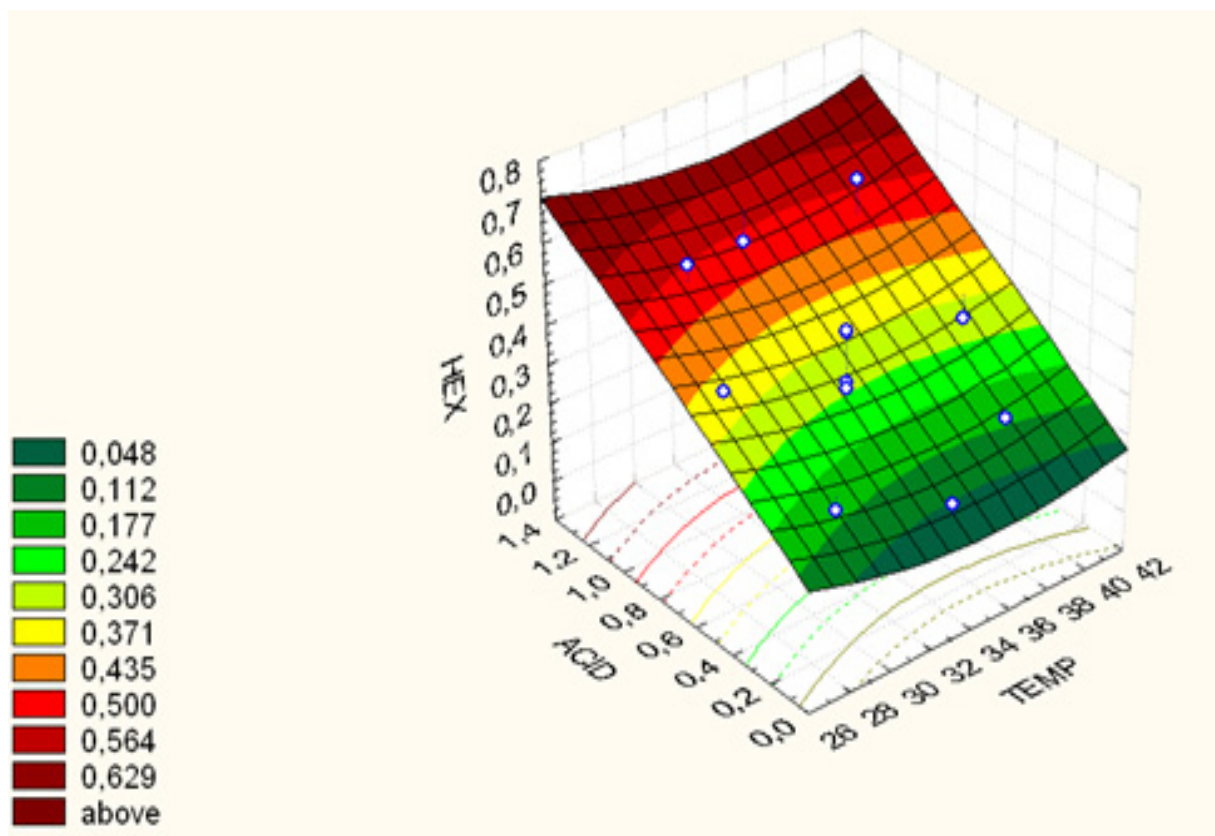


Figura 10- Superfície de resposta para liberação de hexoses por *P. chrysosporium*

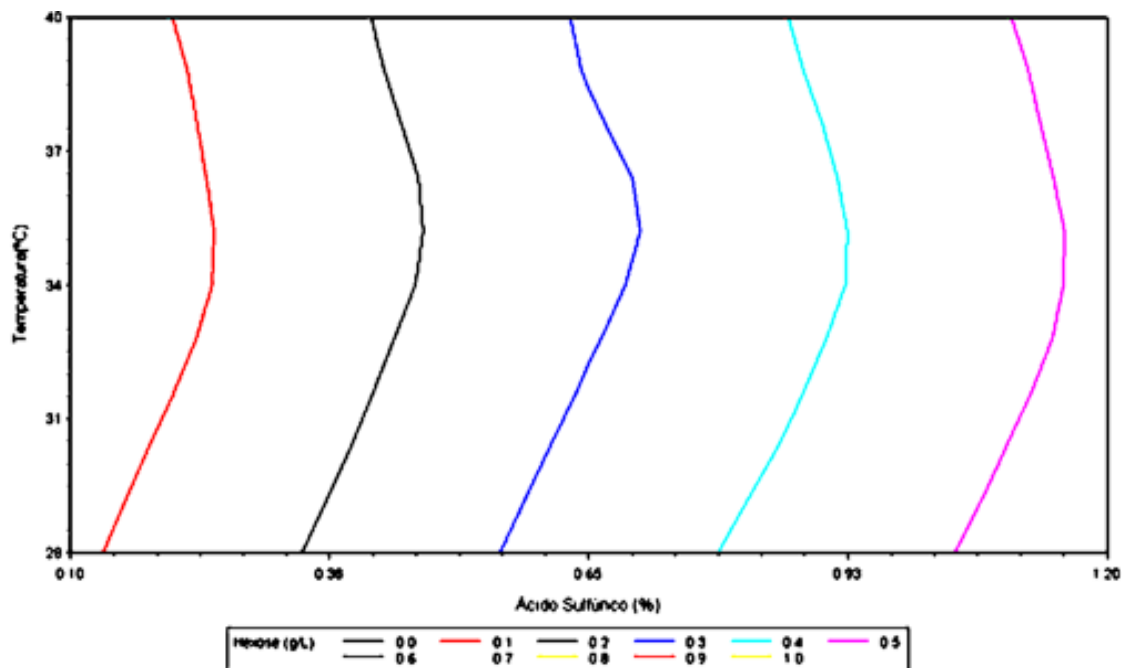


Figura 11- Curvas de contorno para liberação de hexoses por *P. chrysosporium*

4.4 Quantificação de açúcares por HPAE-PAD

A análise de açúcares por cromatografia líquida (HPAEC – PAD), com a finalidade de identificar os tipos de açúcares presentes no hidrolisado e quantificar estes açúcares liberados a partir da hidrólise do bagaço moído pré-tratado com H₂SO₄ (0,5%) pelos fungos *T. reesei* e *P. chrysosporium* após 5 dias de incubação, identificou os açúcares fucose, arabinose, galactose, glicose e xilose tanto nos experimentos com *T. reesei* (Tabela 18) como para *P. chrysosporium* (Tabela 19).

Fucose, galactose e glicose são açúcares com seis carbonos (C6) em sua molécula e denominados hexoses. Enquanto, arabinose e xilose são açúcares com cinco carbonos (C5) em sua molécula e recebem nome de pentoses.

Analisando os resultados obtidos com o *T. reesei* (Tabela 18) se observa uma maior concentração de pentoses no 3º ensaio (11,0070 g/L) e 8º ensaio (9,1976 g/L) resultantes da hidrólise do bagaço moído a 29,8°C e H₂SO₄ em concentração de 1,2% e, hidrólise a 34°C e H₂SO₄ a 1,2%, respectivamente.

Com referência às hexoses, os ensaios que resultaram em maior concentração foram 3º, 4º e 8º. No 4º ensaio a temperatura utilizada foi 38,3°C e a concentração de ácido 1,04%.

Verificou-se que o 3º ensaio (29,8°C/1,04%) resultou em uma maior concentração de açúcares totais (11,6860 g/L), seguido do 8º ensaio (34°C/1,2%) com concentração de 9,8165 g/L.

Tabela 18- Concentração de açúcares fucose, arabinose, galactose, glicose, xilose, pentoses (C5), hexoses (C6) e açúcares totais em bagaço moído pré-tratado hidrolisado por *T. reesei* em tratamento fatorial 2²

Ensaio (°C/[H ₂ SO ₄])	Fucose g/L	Arabinose g/L	Galactose g/L	Glicose g/L	Xilose g/L	Pentoses g/L	Hexoses g/L	Açúcares Totais g/L
1º(29,8/0,26)	0,0089	1,0953	0,0909	0,0332	1,6589	2,7542	0,1330	2,8871
2º(38,3/0,26)	0,0063	1,0906	0,1073	0,0371	2,3706	3,4611	0,1507	3,6119
3º(29,8/1,04)	0,0152	1,5811	0,2855	0,3782	9,4259	11,0070	0,6790	11,6860
4º(38,3/1,04)	0,0104	1,0129	0,2694	0,5297	7,9378	8,9508	0,8096	9,7603
5º(28,0/0,65)	0,0074	0,7551	0,1503	0,1127	6,0442	6,7993	0,2704	7,0697
6º(40,0/0,65)	0,0099	1,0795	0,1575	0,0946	5,8479	6,9274	0,2620	7,1894
7º (34,0/0,1)	0,0062	1,0964	0,0575	0,0196	0,4174	1,5137	0,0832	1,5969
8º (34,0/1,2)	0,0115	1,3187	0,2415	0,3659	7,8789	9,1976	0,6189	9,8165
9º(34,0/0,65)	0,0078	0,8857	0,1646	0,1251	5,9320	6,8176	0,2975	7,1151
10º(34,0/0,65)	0,0093	1,2888	0,2050	0,1654	7,0121	8,3008	0,3797	8,6805
11º(34,0/0,65)	0,0092	0,8934	0,1737	0,1389	7,2439	8,1373	0,3218	8,4591
12º(34,0/0,65)	nd	0,4858	0,1048	0,0905	5,0602	5,5460	0,1953	5,7412

Nos resultados obtidos por *P. chrysosporium* (Tabela 19) na hidrólise do bagaço moído observou-se que as condições do 3º (29,8°C/1,04%) e 4º ensaios (38,3°C/1,04%) contribuíram para as maiores concentrações de pentoses, 10,1501 e

10,0279 g/L, respectivamente. Para as hexoses com 0,5283, 0,5647 e 0,4299 g/L, 3°, 4° e 8° ensaios, as mesmas condições que *T. reesei*.

Tabela 19- Concentração de açúcares fucose, arabinose, galactose, glicose, xilose, pentoses (C5), hexoses (C6) e açúcares totais em bagaço moído pré-tratado (BMA) hidrolisado por *P.chrysosporium* em tratamento fatorial 2².

Ensaio (°C/[H ₂ SO ₄]*	Fucose g/L	Arabinose g/L	Galactose g/L	Glicose g/L	Xilose g/L	Pentoses g/L	Hexoses g/L	Açúcares Totais g/L
1°(29,8/0,26)	0,0096	1,0743	0,0915	nd	1,3145	2,3888	0,1011	2,4899
2°(38,3/0,26)	nd	0,7684	0,0980	0,0334	1,9176	2,6860	0,1314	2,8174
3°(29,8/1,04)	0,0112	1,2475	0,2287	0,2884	8,9026	10,1501	0,5283	10,6785
4°(38,3/1,04)	0,0099	1,3412	0,2370	0,3178	8,6867	10,0279	0,5647	10,5926
5°(28,0/0,65)	0,0070	1,1532	0,1918	0,1518	6,8441	7,9973	0,3506	8,3479
6°(40,0/0,65)	0,0072	0,8447	0,1408	0,0898	5,6258	6,4705	0,2378	6,7082
7° (34,0/0,1)	0,0055	0,8798	0,0463	0,0100	0,2044	1,0841	0,0619	1,1460
8° (34,0/1,2)	0,0060	0,8432	0,1747	0,2493	7,4076	8,2508	0,4299	8,6807
9°(34,0/0,65)	0,0089	1,1012	0,1972	0,1562	7,6240	8,7252	0,3623	9,0875
10°(34,0/0,65)	0,0081	0,5278	0,1154	0,0887	5,0941	5,6219	0,2122	5,8341
11°(34,0/0,65)	0,0073	0,4692	0,1068	0,0788	4,6844	5,1536	0,1929	5,3465
12°(34,0/0,65)	0,0146	1,1820	0,2009	0,1511	7,5313	8,7133	0,3666	9,0798

P. chrysosporium (Tabela 19) liberou menor concentração de hexose que *T. reesei* (Tabela 18), nos mesmos ensaios considerados.

4.5 Caracterização do bagaço hidrolisado por microscopia de luz

Como mencionado anteriormente, este estudo, que visou a caracterização do bagaço hidrolisado pelos fungos selecionados na etapa preliminar, foi conduzido paralelamente à etapa de otimização das condições de hidrólise.

A finalidade desta etapa foi caracterizar o bagaço integral pré-tratado com ácido e hidrolisado pelos fungos *T. reesei* e *P. chrysosporium* por meio da coloração das fibras de celulose e lignina e observação de lâminas por microscopia de luz.

Optou-se por realizar este experimento utilizando os fungos selecionados na etapa preliminar por um período de hidrólise de 5 dias, e em bagaço integral.

4.5.1 Colmo de cana-de-açúcar

Amostras de colmo de cana-de-açúcar em cortes longitudinais e transversais foram analisadas após coloração das lâminas (Figuras 12 e 13).

A metodologia utilizada para o preparo das amostras possibilitou a dissociação das fibras permitindo sua visualização, sem afetar a estrutura da fibra. Todas as imagens obtidas mostram a coloração da celulose em azul e da lignina em vermelho.

Na Figura 12, observa-se a organização dos vasos condutores, floema e xilema, como a celulose e a lignina estão dispostas nestes feixes em corte transversal do colmo. O mesmo pode ser visto na Figura 13 em corte longitudinal.

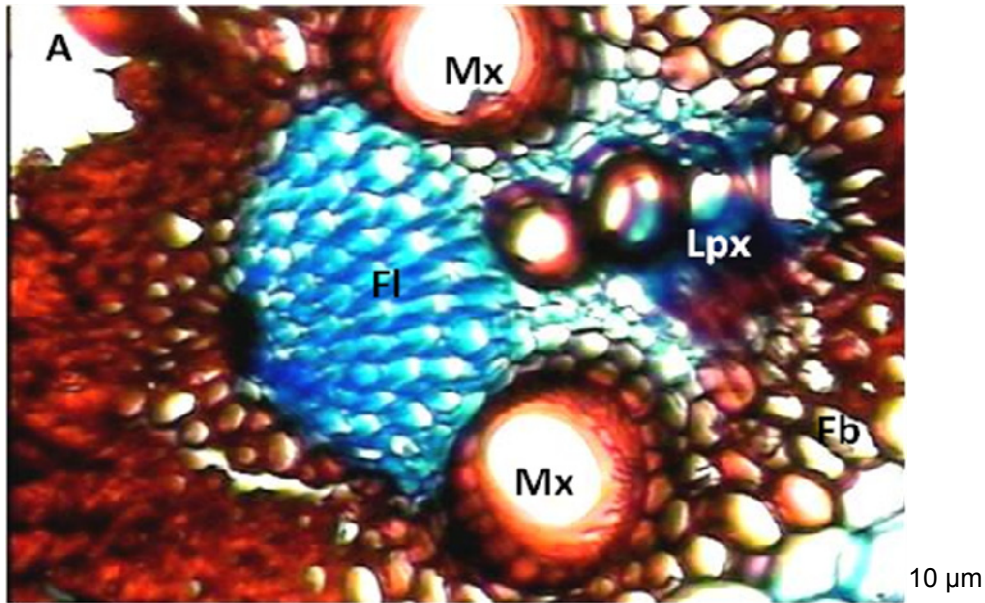


Figura 12- Fotomicrografia evidenciando feixe vascular em corte transversal do colmo de cana-de-açúcar após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). A celulose está em azul e a lignina em vermelho. (Fl = floema; Fb = fibras; Lpx = lacunas de protoxilema e Mx = metaxilema). Microscópio Zeiss, aumento 10x

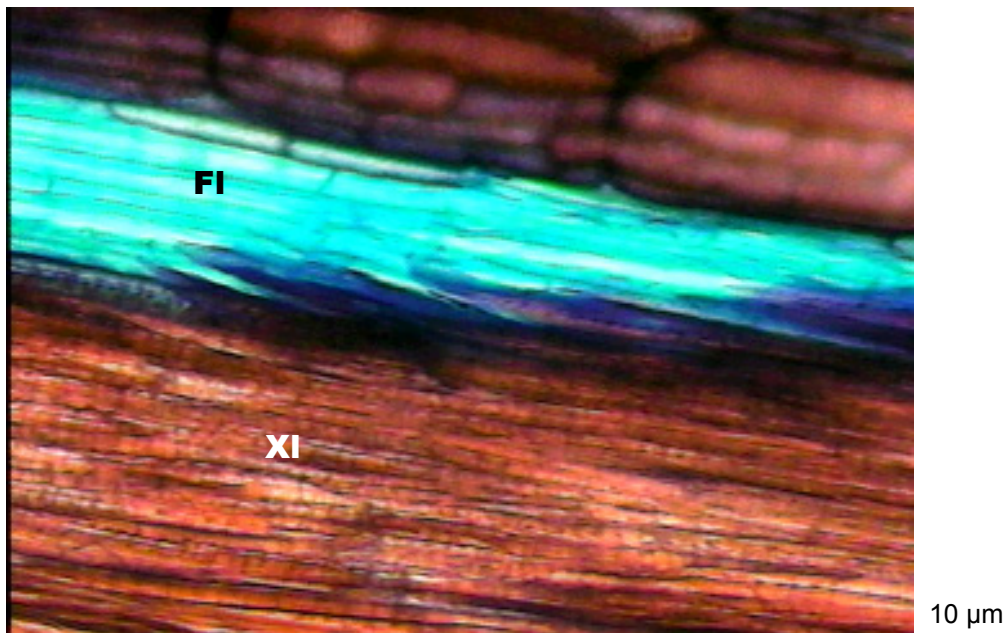


Figura 13- Fotomicrografia evidenciando feixe vascular em corte longitudinal do colmo de cana-de-açúcar após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). A celulose está colorida em azul e a lignina em vermelho. (Fl = floema; XI = xilema). Microscópio Zeiss, aumento 10x

4.5.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Devido ao bagaço de cana-de-açúcar ser pouco estudado em relação a sua constituição anatômica, não existe protocolo de preparação pré-estabelecido, para a coloração e preparação de lâminas histológicas. Portanto, a metodologia foi adaptada para este tipo de material e após vários testes de dissociação e coloração foram definidos tempo e concentração de reagentes e corantes ideais.

O bagaço de cana-de-açúcar tratado com H_2SO_4 foi submetido à coloração com Azul de Astra e Safranina (Figuras 14, 15 e 16). É possível observar a presença de celulose (azul) e lignina (vermelho) pela coloração das fibras.

Na Figura 14, é possível identificar, pelo método de coloração utilizado, um pacote de fibras de lignina e de celulose.

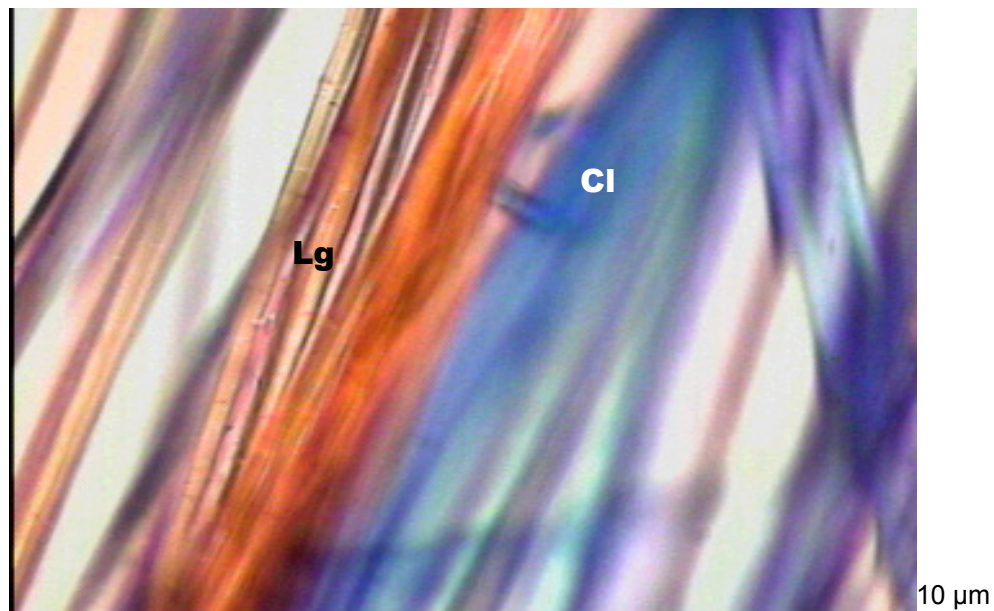


Figura 14- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) e lignina (vermelho) obtidas de bagaço de cana-de-açúcar tratado com H_2SO_4 após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Cl=celulose; Lg= lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

A Figura 15 apresenta uma fibra de celulose e outra de lignina no bagaço pré-tratado por H_2SO_4 após coloração com os corantes Azul de Astra e Safranina.

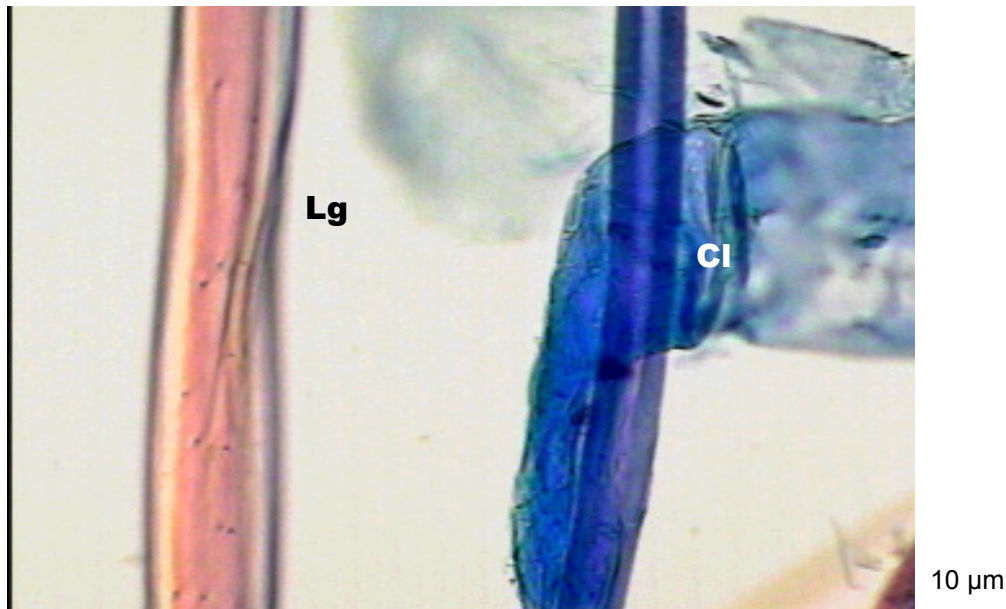


Figura 15- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) e lignina (vermelho) obtidas de bagaço de cana-de-açúcar tratado com H_2SO_4 após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Cl=celulose; Lg= lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

Na Figura 16 observa-se um pacote de fibras de celulose e lignina em lâmina com bagaço pré-tratado e submetido a coloração com Azul de Astra e Safranina.

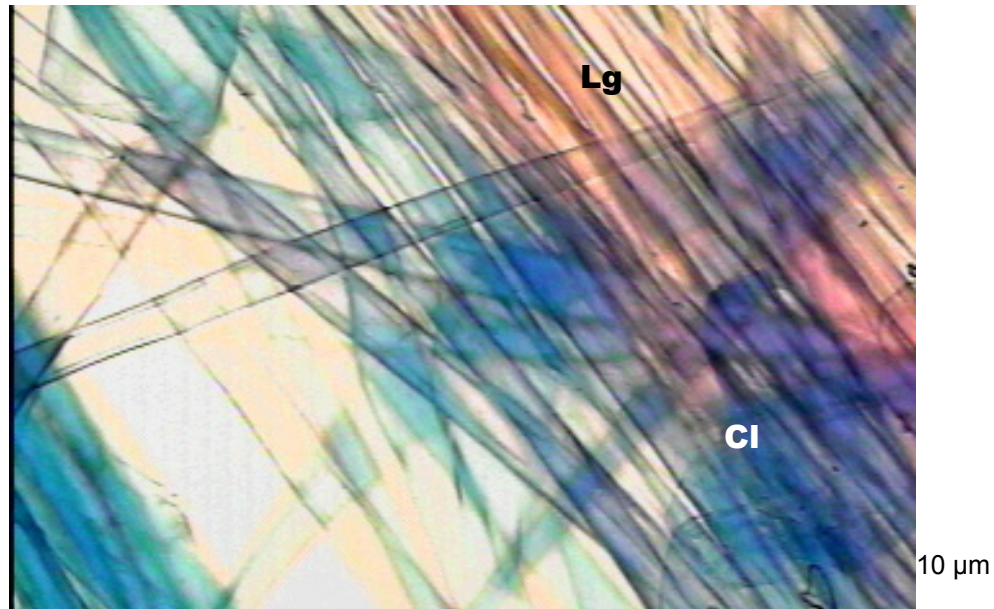


Figura 16- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) e lignina (vermelho) obtidas de bagaço de cana-de-açúcar tratado com H_2SO_4 após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (CI=celulose; Lg= lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *P. chrysosporium* após 5 dias foi submetido a coloração com Azul de Astra e Safranina (Figuras 17, 18 e 19). As ligninases que este fungo produz em maior quantidade que as celulases atacam a lignina num primeiro momento, tornando desse modo, as fibras de celulose expostas ao ataque das celulases posteriormente. Sendo a lignina degradada antes da celulose, portanto, solubilizada, é possível visualizar as fibras de celulose que restaram.

A deslignificação seletiva é comprovada pela literatura, que afirma que este fungo apresenta preferência pela degradação da lignina e o material adquire aspecto fibroso-esbranquiçado em decorrência da decomposição de até 97% da lignina e acúmulo de celulose (KIRK, FARRELL, 1987; LEONTIEVSKY et al., 2000; PALMIERI et al., 2000).

Na Figura 17 é clara a presença de celulose e a ausência de lignina indicando que o *P. chrysosporium* foi mais ativo que o *T. reesei* na degradação das fibras de lignina no período de cinco dias de hidrólise do bagaço. A mesma condição pode ser observada nas Figuras 18 e 19.

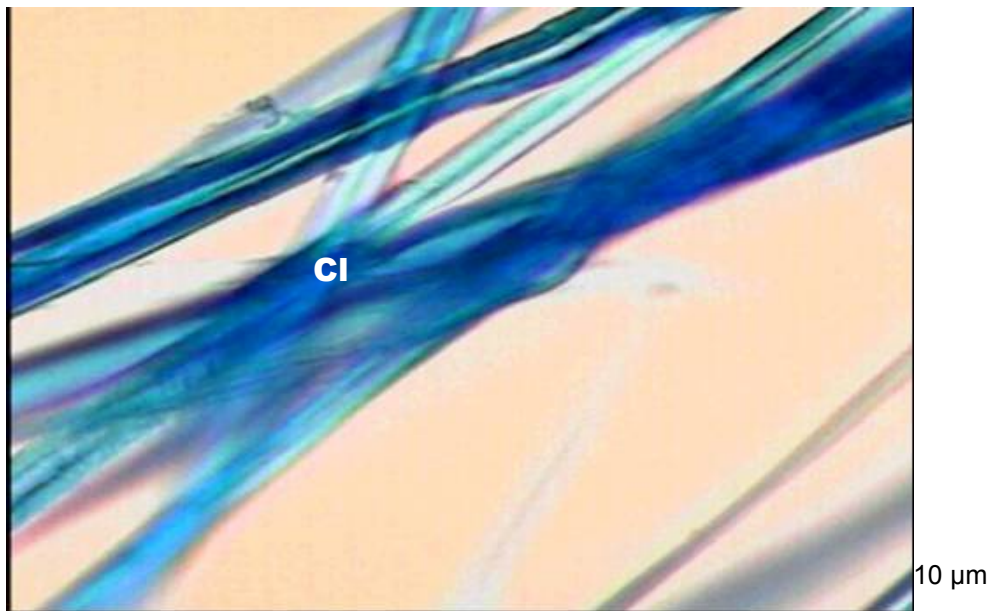


Figura 17- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *P. chrysosporium* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (CI=celulose). Microscópio Zeiss, aumento 20x

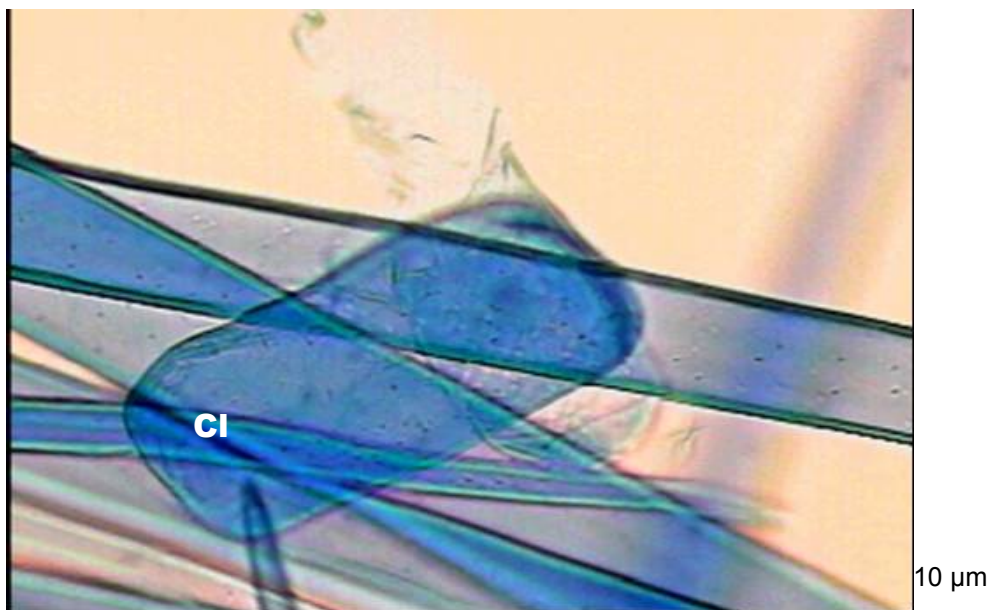


Figura 18- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *P. chrysosporium* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (CI=celulose). Microscópio Zeiss, aumento 20x

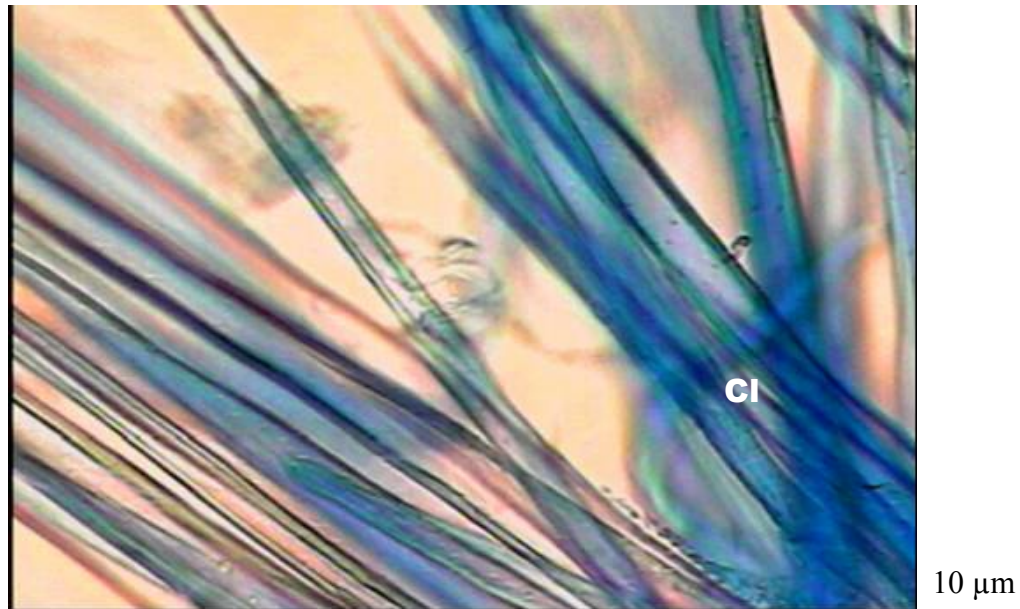


Figura 19- Fotomicrografia evidenciando as fibras de celulose (azul) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *P. chrysosporium* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Cl=celulose). Microscópio Zeiss, aumento 20x

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *T. reesei* após 5 dias foi submetido a coloração com Azul de Astra e Safranina (Figuras 20, 21 e 22). Devido à coloração observa-se que a celulose do bagaço foi hidrolisada pelo fungo, restando as fibras de lignina. O pré-tratamento ácido proporciona a exposição da celulose ao ataque das celulases produzidas por este fungo.

Quando se diz que a celulose foi hidrolisada significa que as celulases do fungo quebraram a molécula em unidades de glicose, que é uma molécula solúvel e passível de fermentação.

Observa-se na Figura 20 a presença de fibras de lignina que restaram após a hidrólise do bagaço pelo *T. reesei*. O mesmo ocorre nas Figuras 21 e 22.

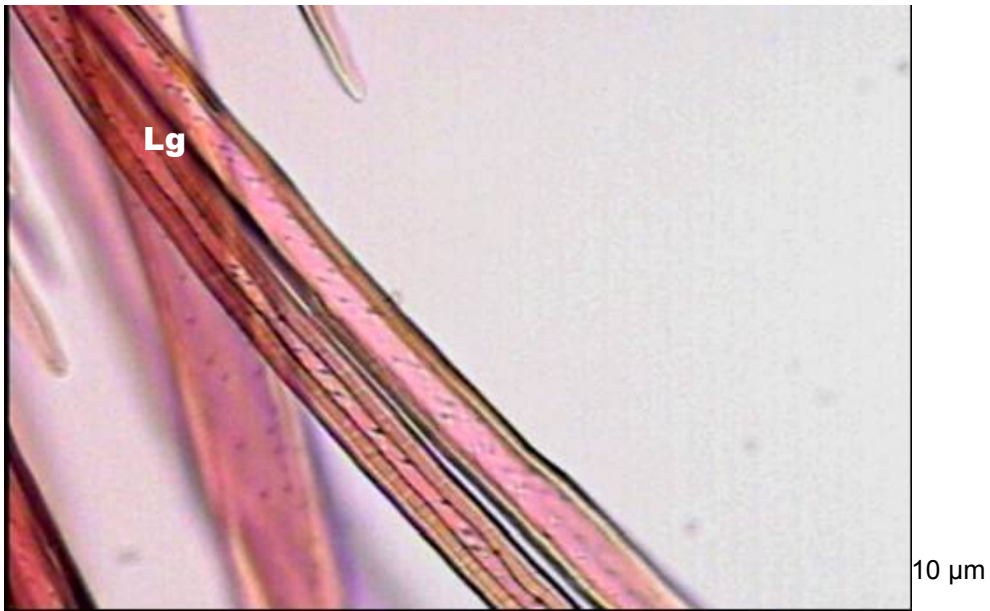


Figura 20- Fotomicrografia evidenciando as fibras de lignina (vermelho) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *T. reesei* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Lg=lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

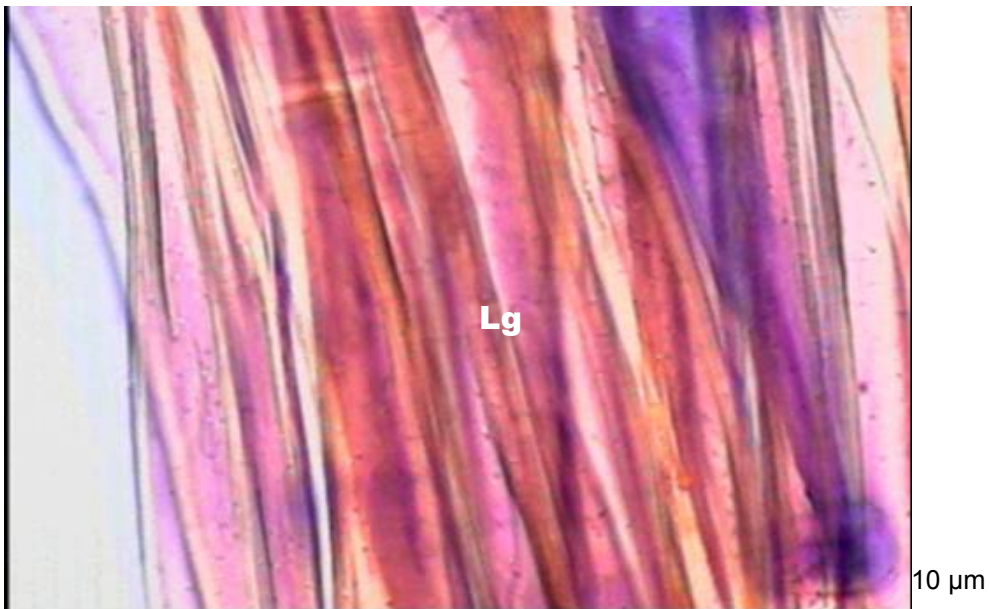


Figura 21- Fotomicrografia evidenciando as fibras de lignina (vermelho) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *T. reesei* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Lg=lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

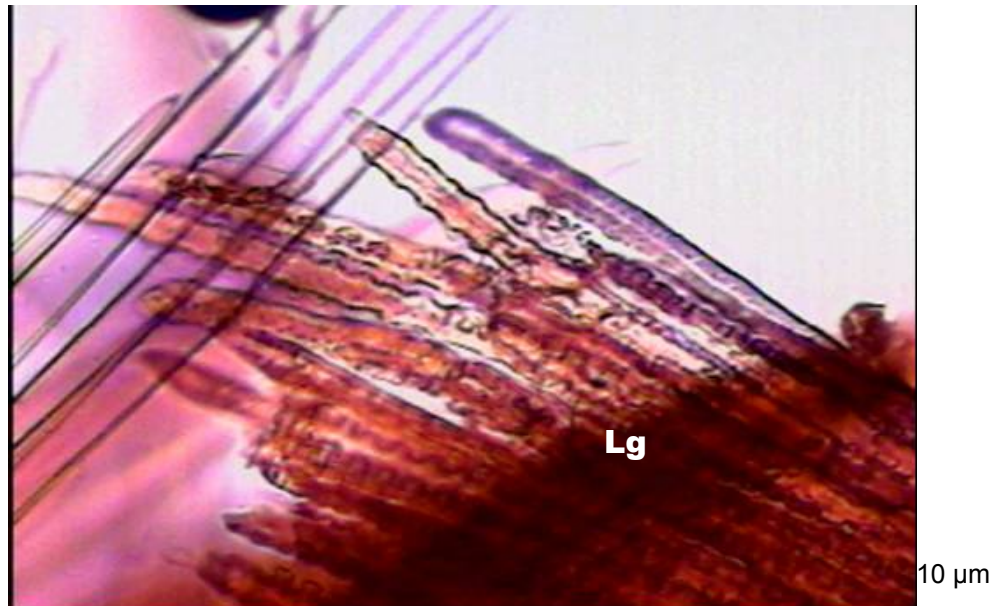


Figura 22- Fotomicrografia evidenciando as fibras de lignina (vermelho) presentes no bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e hidrolisado por *T. reesei* após coloração com Azul de Astra (1%) e Safranina (1%). (Lg=lignina). Microscópio Zeiss, aumento 20x

Visto que todas as lâminas preparadas foram submetidas ao mesmo processo de coloração, pode-se inferir que a ausência de celulose ou lignina se deve, basicamente, à hidrólise enzimática que estes fungos foram capazes de realizar no bagaço de cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na etapa preliminar possibilitaram selecionar os fungos *T. reesei* e *P. chrysosporium*, pois apresentaram melhor desempenho no processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, isto é, maior concentração de açúcares redutores em um período de 5 dias. Quanto ao pré-tratamento, o processo de hidrólise pelos fungos apresentou resultados superiores em bagaço moído pré-tratado por ácido em comparação com o bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

A etapa de otimização das condições de hidrólise de 5 dias em bagaço moído permitiu observar que temperatura e concentração de ácido afetaram a produção de açúcares redutores e hexoses pelos fungos *T. reesei* e *P. chrysosporium*. A análise da superfície de resposta indicou uma produção máxima de açúcares redutores de 20,35 g/L para *T. reesei* e, 19,48 g/L para *P. chrysosporium*. A produção máxima de hexoses foi de 0,018 g/L e 2,52 g/L para *T. reesei* e *P. chrysosporium*, respectivamente. Concentração de ácido apresentou maior influência nas respostas obtidas que temperatura.

Quanto à caracterização do bagaço, *P. chrysosporium* apresentou maior habilidade em degradar lignina antes da celulose no período de 5 dias de hidrólise, e *T. reesei* apresentou grande habilidade em degradar celulose no mesmo período. Foi possível, através do método de coloração e produção de lâminas histológicas observadas por microscopia de luz, constatar a degradação da celulose e da lignina do bagaço de cana-de-açúcar no processo de hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-NASSER, N. H.; HELMY, S. M.; EL GAMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 55, n.7, p. 249-255, 1997.
- ABREU, L. D.; MARINO, R. H.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Degradação de madeira de *eucalyptus sp.* Por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 321-328, 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_4/abreu.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2009.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.
- AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R. A.; SILVA, H.; LAPIERRE, C.; CEASE, K. R.; IBACH, E.; RABAD, A. R.; MUGA, P. Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. **Applied and Environmental Microbiology**, Saint Paul, v. 56, p. 65-74, 1990.
- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ÁLCOOL - ETANOL BRASILEIRO. Cartilha BiodieselBr. Boletim 235. Disponível em: <www.biodieselbr.com> Acesso em: 27 ago. 2006.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/25.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2009.
- APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 438 p.
- BANERJEE R, PANDEY A. Bio-industrial application of sugarcane bagasse: A technological perspective. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 104, n.1238, p. 64-70, 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2003. 401p.
- BETINI, J.H.A. **Estudos comparativos de xilanases produzidas por três espécies de *Aspergillus* visando a aplicação no biobranqueamento de polpa de celulose para fabricação de papel**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BETTIO, M.; REIS, L.; MENEGOL, D.; MICHALSKI, E. Z.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Influência da granulometria da celulose na produção de xilanases e celulases por *Penicillium echinulatum*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 171.

BIOTECHBRASIL: Biotecnologia pode impulsionar a produção de álcool no Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.biotechbrasil.bio.br/2006/08/10/a-biotecnologia-pode-impulsionar-a-producao-de-alcool-no-brasil/>>. Acesso em: 27 ago. 2006.

BJERRE, A.B., OLESEN, A.B., FERNQVIST, T., PLÖGER, A., SCHMIDT, A.S., Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelluloses. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v. 49, p. 568-577, 1996. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/71002965/abstract?cretry=1&srtry=0>>. Acesso em: 16 jun. 2009.

BOGAN, B.W.; LAMAR, R.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Saint Paul, v. 62, n. 5, p. 1597-1603, May 1996.

BON, E. P. S.; GOTTSCHALK, L.M.F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008, cap. 5, p. 95-122.

BON, E. P. S.; WEBB, C. Glucoamylase production and nitrogen nutrition in *Aspergillus awamori*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 39, n. 40, p. 349-369, 1993.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz e Queiroz", Piracicaba, 2007.

BRITO, N. N.; ZAMORA, P. P.; OLIVEIRA NETO, A. L.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J. E. S.; PELEGRINI, R. T. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4, 2004. Rio Claro. **Resumos IV Fórum de estudos contábeis**. Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004. p. 144.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-570-713.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2009.

CARLILE, M.J., WATKINSON, S.C., **The Fungi**. 2nd ed., San Diego: Academic Press 1994, 428 p.

CASTRO, N. F.; ARAÚJO, J. N.; CORDEIRO, M. S. C.; SOUZA, W. S. B. Estudo do ótimo de temperatura para crescimento de fungos xilófagos em meio de cultura. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58, 2006, Florianópolis. Disponível em: <www.sbpnet.org.br/livro/58ra/senior/resumos/resumo_3389.html>. Acesso em: 25 jan. 2009.

CELULOSE ONLINE. Introdução ao Processo de Obtenção da Celulose. Disponível em: <www.celuloseonline.com.br> Acesso em: 20 mar. 2007.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008, cap.4, p. 71-94.

COLETÂNEA. Estado-da-arte da produção de etanol a partir da madeira. Coletânea/ Tecnologia da produção de etanol a partir de materiais celulósicos. Brasília, 1981, v. 1

COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *aspergillus niger* nrri 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz.**1996. 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1996.

CUNHA, H. C. M. **Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos.** 1999. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1999. Disponível em: <http://bd.eel.usp.br/tde_busca/processaPesquisa.php?listaDetalhes%5B%5D=17&processar=Processar>. Acesso em: 13 jul. 2009.

DOMINGUES, D. R., KLEMZ, J. G. D.; ALCÂNTARA, S. R. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em meio semi-sólido: Comparação entre enzimas comerciais e produzidas por FES. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, p. 189.

DRISSEN, R. E. T.; MAAS, R. H. W.; TRAMPER, J.; BEEFTINK, H. H. Modelling ethanol production from cellulose: separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, London v. 27, n. 1, p. 27-35, 2009. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all?content=10.1080/10242420802564358>>. Acesso em: 23 abr. 2009.

EERE. Enzymatic Hydrolysis Technology Background. Disponível em: <www1.eere.energy.gov/biomass/technology_background.html> Acesso em: 15 mar. 2007.

FENGEL, D.; WEGENER G., **Wood**: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlim, 1984. 613 p. Disponível em: <<http://catalogue.nla.gov.au/Record/876242>>. Acesso em: 16 jul. 2009.

FERRARA, M. A.; SEVERINO, N. M. B.; MANSURE, J. J.; MARTINS, A. S.; OLIVEIRA, E. M. M.; SIANI, A. C.; PEREIRA, Jr., N. TORRES, F. A.; BON, E. P. S. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme Microbiology Technology**, Atlanta, v. 39, n. 7, p. 1457-1463, 2006.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biologia de Fungos**. Caxias do Sul: EDUCS 2004, p. 215-242.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; DURAN, N. Softwood Biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia-Sitophila* (TFB 27441-strain). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, n.2, p. 82-86, 1991.

FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin Degradation During Softwood Decaying by the ascomycete *Chrysonilia-Sitophila*. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 6, n. 4, p. 265-274, 1995.

FERRAZ, A.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Characterization of White zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 641-645, 2000.

FINGERUT, J. **Caracterização do material lignocelulósico**. 2006. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidr%F3lise%20Fingerut%20Apresenta%E7%E3o.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2009.

FISHER, F. **Micologia**: fundamentos e diagnósticos. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2001. 337 p.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of materials for efficient bioethanol production. **Advances Biochemistry Engineering Biotechnenology**, v. 108, p. 41-65, 2007. Disponível em: <<resources.metapress.com/pdf-preview.axd?code=g06542h0h4q738q6&size=smal>>. Acesso em: 25 maio 2009.(Não está ainda no texto).

GHOSH, B. K.; GHOSH, A. Degradation of cellulose by fungal cellulose. In: WINKELMANN, G. (Ed.). **Microbial Degradation of Natural Products**, New York: Wiley VCH, 1992. 421 p.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. New York: Ed. W.H. Freeman and Company, 1995. cap. 10, p.335-357

GOMES, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1985, Disponível em:<http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=67>. Acesso em 14 mar. 2009.

GRAF, A.; KOEHLER, T. **Overview of Cellulose-Ethanol Production Technology**. In: _____ Oregon cellulose-ethanol study. An evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks. 2000. Apêndice B, p. 57-60. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/inte-hidrolise-oregon.pdf>> Acesso em: 22 mar. 2007.

GRIFFIN D.H. **Fungal Physiology**, 2nd ed., New York: Wiley-Liss, 1994, 458 p.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; OLIVEIRA, M. M. Q.; BON, E. P.S.; COELHO, R. R. R. Avaliação do uso de resíduos agroindustriais para a produção de celulases pelo fungo *Trichoderma sp.* 676. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 168.

JENNINGS, D. H. Inorganic nutrition. In: BERRY, D. R. (Ed.). **Physiology of industrial fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988, 285 p.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000400014>. Acesso em: 22 fev. 2009.

KAR, S.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 462-464, 2006. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/bjm/v37n4/v37n4a11.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2009.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146%2Fannurev.mi.41.100187.002341>>. Acesso em: 24 maio 2009.

KLINKE, H.B., AHRING, B.K., SCHMIDT, A.S., THOMSEN, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 15-26, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V2444TPKY53&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=958391436&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=91680476facf8e38be39e1b0200c0be5>. Acesso em: 19 abr. 2009.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004. Disponível em: <[www.genencor.com/.../international%20sugar%20journal%20\(april%202004\).pdf](http://www.genencor.com/.../international%20sugar%20journal%20(april%202004).pdf)>. Acesso em: 17 maio 2009.

KRAUS, J.; LOURO, R. RP.; ARDUIN, M.; ESTELITA, M. E. A Célula Vegetal. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.) **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p 32-67.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801542g>>. Acesso em 19 jul. 2009.

LEONTIEVSKY, A. A.; MYASOEDOVA, N. M.; BASKUNOV, B. P.; EVANS, C. S.; GOLOVLEVA, L. A.; Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. **Biodegradation**, Dordrecht, v.11, p. 331-240, 2000. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/klu/biod/2000/00000011/00000005/00310458?crawler=true>>. Acesso em: 16 abr. 2009.

LISSENS, G., KLINKE, H., VERSTRAETE, W., AHRING, B., THOMSEN, A.B. Wet oxidation of organic household waste enriched with wheat straw for simultaneous saccharification and fermentation into ethanol. **Environment Technology**, v. 25, p. 647-655, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V244SN8V2B2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=958394714&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e90d9f564a2e13236e82439cc55f8773>. Acesso em: 12 jul. 2009.

LOPES, D. O.; CELLIGOI, M. A. P. C.; VARGAS, L. H. M.; BUZATO, J. B. Produção de celulase por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 168-169.

MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue r decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 246-252, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822005000300008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 jun. 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (Eds.). **Brock Biology of Microorganisms**. 10th ed., New Jersey: Pearson-Prentice Hall, 2003, 1012 p.

MANDELS, M.; PARRISH, F. W.; REESE, E. T. Sophorose as an inducer of cellulose in *Trichoderma viride*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, n. 2, p. 400-408, 1962. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=277742>>. Acesso em: 03 jul. 2009.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Relação das unidades produtoras cadastradas no departamento de cana-de-açúcar e agroenergia. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/servicos/usinas_destilarias/usinas_cadastradas/ups_15-05-2009_0.pdf. Acesso em: 28 maio 2009.

MARTÍN, C., GONZÁLEZ, Y., FERNÁNDEZ, T., THOMSEN, A.B.,. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 81, n. 10 p. 1669-1677, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1586>>. Acesso em: 20 maio 2009.

MARTÍN, C., KLINKE, H., THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, p. 426–432. 2007a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG14KCXF8C5&_use_r=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=958403473&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=fa37c95f8d2167a759f920a0e198f208>. Acesso em: 22 jul. 2009.

MARTIN, C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, p. 33-39, 2007.

MARTIN, C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, p. 33-39, 2007b.

MARTÍN, C.; ALRIKSSON, B.; SJÖDE, A.; NILVEBRANT N.; JÖNSSON, L. J.; Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136-140, p. 339-352, 2007c. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d55715wrnj366088/>>. Acesso em: 18 abr. 2009.

MARTÍN, C.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oakland, v. 82, n. 2, p. 174-181, 2007d. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1648>>. Acesso em: 20 maio 2009.

MARTÍN, C.; THOMSEN, M. H.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; THOMSEN, A. B.; Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 8777-8782, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=933956109&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=856a5988621de4d571629e8bc3a7f712>. Acesso em: 14 ago. 2009.

MATHEUS, D.R. & OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V.L.R. (Org) **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos**. Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. 2ª ed. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, cap. 4, p. 69 -139, 1998.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; INÁCIO, K. R.; FARIA, A. F.; CARBONE, B. J. L.; DURRANT, L.R. Geração de açúcares fermentáveis para a indústria de etanol através da hidrólise enzimática provinda de *Pleurotus* sp BCCB068 em matriz de celulose. Disponível em: <<http://www.cori.unicamp.br/centenario2008/2007/completos/a37%20%20geracao%20de%20acucares%20fermentaveis%20para%20a%20industria%20de%20etanol.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2009.

MENEZES, T. J. B., HENNIES, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v 31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, L.C.; CAMPANA FILHO, S.P. Carboximetilação de Polpas de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Caracterização dos Materiais Absorventes Obtidos. **Polímeros**, São Carlos, vol. 9, n. 4, p. 46-51, 1999.

NOGUEIRA, R. F. P. **Síntese e degradação de composto-modelo de lignina por *Chrysonilia sitophila* (T F B 27441)**. 1990. 93 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1990.

OLIVERIO, J. L.; HILST, A. G. P. DHR – Dedini Hidrólise Rápida (Dedini Rapid Hydrolysis) – Revolutionary process for producing alcohol from sugarcane bagasse. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 106, n. 1263, p. 168-172, 2004.

OLIVIERI, R. R. B.; OLIVEIRA, R., PROTECTOR, L.; GOTTSCHALK, L. M. F.; BOM, E. P. S. Análise de materiais lignocelulósicos pré-tratados para a obtenção de açúcares fermentáveis mediante hidrólise enzimática. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 190-191.

PALMIERI G.; GIARDINA P; BIANCO C; SCALONI A; CAPASSO A; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Saint Paul, v. 66, p. 920-924, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91923>>. Acesso em: 11 mar. 2009.

PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, Washington, v.27, p. 109-117, 1992.

PAPAGIANNI, M., Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. **Biotechnology Advances**, London, v. 22, p. 189-259, 2004.

PERES, E.; MELO, I. S.; Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/sa/v52n1/09.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2009.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PITARELO, A. P.; ALESSANDRE, T.; RAMOS, L. P. Efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 230-231.

PRIEST, F. G. Enzyme synthesis: regulation and process of secretion by microorganisms. In: FOGARY, W. F. (Ed.). **Microbial Enzymes and Biotechnology**, London: Academic Press, 1983, p. 319-366.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Pleurotus, Mushrooms. Part I – A morphology, life cycle taxonomy, breeding and cultivation. **Culture Collection and Research Center – Food Science Nutrition**, Hsinchu, n. 26, p. 157-311, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3322683>>. Acesso em: 23 jun. 2009.

RIVERS, D. B.; GRACHECK, S. J.; WOODFORD, L. C. Limitations of the DNS assay for reducing sugars from Saccharified lignocellulosics. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, p. 800-802, 1983.

ROCHA, G. J. M. Metodologia analítica para bagaço e palha de cana. In: WORKSHOP PROGRAMA BIOETANOL, 3, 2009. **Anais Bioetanol**. Brasília: Bioetanol, 2009. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Ed, 2005. 325p.

RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; NOGUEIRA, R.F.; FERRER, I; ESPOSITO, E.; DURAN N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 62, n. 3, p. 233-42. 1997.

RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; LEMO, V.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Produção de celulasas por fermentação semi-sólida do bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos Enzitec**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, p. 175.

ROSSELL, C.E.V. O setor sucroalcooleiro e a produção de etanol. 2006. Disponível em: <www.cori.unicamp.br/BrasilJapao3/Palestras/carlos_rossell.ppt>. Acesso em: 07 jan. 2009.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme Microbial Technology**, London, v. 2, n. 2, p. 91-102, 1980.

SACCHS, I.B.; LEATHAM, G.F.; MYERS, G.C.; WEGNER, T.H. Distinguishing characteristics of biomechanical pulp, **Tappi Journal**, Norcross, v. 73, n. 9, p. 249-254, 1990, p. 249-254. Disponível em: <<http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=/1991/v1703/US9104065.xml;US9104065>>. Acesso em: 14 abr. 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS users guide**: statistic. 6. ed. Cary: SAS Institute, 1990. 584 p.

SAVARD, J. **Hydrolysis of wood**. Drevar: Centre technique forestier tropical - CTFT, 1962. 69 p. (Publicação nº 3)

SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006. p 109-119.

SEBRAE - **O novo ciclo da cana**: estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos. Brasília: Ed. IEL/NC, 2005. 344p.

SILVA, K. R. I.; DURRANT, L. R.; MENEZES, C. R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos basidiomicetos de degradação branca cultivados em bagaço de cana-de-açúcar através de fermentação semi-sólida. 2007. In: WORKSHOP INTERNACIONAL BRASIL-JAPÃO EM BIOCOMBUSTÍVEL, MEIO AMBIENTE E NOVOS PRODUTOS DA BIOMASSA, 5, 2007, Campinas, Disponível em: <<http://www.cori.unicamp.br/centenario2008/2007/completos/a21%20%20producao%20de%20enzimas%20lignoceluloliticas%20por%20fungos.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005,. Disponível em: <dspace.c3sl.ufpr.br/.../Dissertação%20de%20Mestrado%20%20Michele%20Rigon%20Spier.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2009.

STURION, G. L. **Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus spp.*)**. 1994. 147p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1994..

TEIXEIRA, C.G.; JARDINE, J.G.; BEISMAN, D.A. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em microdestilaria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 248-251, 1997.

TORGET, R.W.; KIM, J.S.; LEE, Y.Y. Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fractionation kinetics of hardwood carbohydrates. 1. Cellulose Hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 39, p. 2817-2825, 2000.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot-fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**. Amsterdam, v.41, n. 1, p. 1-17, 1995. Disponível em: <linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168165695000420>. Acesso em: 14 abr. 2009.

UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. Disponível em:< <http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 8 mar. 2009.

VARGA, E., SCHMIDT, A.S., RÉCZEY, K., THOMSEN, A.B., Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 104, p. 37–50, 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/mk224004054I4x05/>>. Acesso em: 24 jul. 2009.

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus SP* e seus mutantes isolados de bagaço de cana.** 1988. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988,

WEILAND, P. Principle of solid state fermentation. In: ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. (Ed.). **Treatment of lignocellulosics with white-rot-fungi.** Amsterdam :Elsevier Applied Science, p. 64-76, 1988. Disponível em: <<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19891348744>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

WOOD, T. M.; GARCÍA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 1, n. 2-3, p. 147-161, 1990.

ZHENG, C.; LEI, Y.; YU, Q.; LUI, X.; HUAN, K. Enzymatic hydrolysis of waste sugarcane bagasse in water media. **Environmental Technology**, London, v. 23, p. 1009-1016, 2002. Disponível em:<<http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all?content=10.1080/0959333230861839>>. Acesso em: 12 maio 2009.