UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANGELA DA SILVA MACHADO

Uso de basidiomicetos no tratamento de bagaço de cana como etapa prévia aos
processos de hidrólise enzimática dos polissacarídeos

Lorena–SP

2015

ANGELA DA SILVA MACHADO

Uso de basidiomicetos no tratamento de bagaço de cana como etapa prévia aos processos de hidrólise enzimática dos polissacarídeos

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr André Luis Ferraz

Versão Original

Lorena – SP

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Machado, Angela da Silva

Uso de basidiomicetos no tratamento de bagaço de cana como etapa prévia aos processos de hidrólise enzimática dos polissacarídeos / Angela da Silva Machado; orientador André Luis Ferraz - Versão Original. - Lorena, 2015.
87 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: André Luis Ferraz

1. Bagaço de cana. 2. Tratamento biológico. 3. Basidiomicetos. 4. Hidrólise enzimática. I. Título. II. Ferraz, André Luis , orient.

Dedico esse trabalho ao meu pai Antenor,

*Que sempre me ensinou o valor da educação e a certeza de que
podemos sempre mais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antenor e Ivani, pelo apoio incondicional às minhas decisões e pelo amor dado sem reservas. E a minha família, pelo amor e incentivo imenso que eu sempre recebi de vocês. Amo muito vocês!

Um grande agradecimento ao meu orientador, André Ferraz, por toda dedicação, paciência e ensinamentos ao longo desse projeto e da minha vida acadêmica.

As minhas amigas de todas as horas, Kátia, Nati, Midori e Jana pelos maravilhosos momentos de alegria, amor e amizade que passamos. Foi fácil ser anjo de pessoas maravilhosas como vocês, sisters! E a todas as minhas Joaninhas queridas, que me acolheram tão bem e transformaram a nossa “rep” em um doce lar.

Aos meus amigos do laboratório Ciências da Madeira: Thales, Gabi, Omar, Dayelle, Ana Paula, Victor e Raphael pelos bons momentos. Em especial, a minha amiga Fernanda Valadares, cuja amizade foi fundamental durante esse percurso. Tu és demais guria, te adoro!

Aos técnicos/amigos indispensáveis, Zé Moreira, por toda a ajuda, ensinamentos e por sempre me ajudar a enxergar o lado bom das coisas. E ao Zé Cobrinha, pela ajuda, amizade e pelo café de todo dia. Esses dois são gente boa!

Aos meus colegas do Lab Ecotox e do DEBIQ pelo companheirismo e auxílio. Em especial aos meus amigos, Lucas e Andrés pela parceria e amizade, cachorros quentes e arepas e claro, as aulas de dança.

As pessoas que, literalmente, sem eu não chegaria no destino todos os dias, Fer, Valadares, Rafael, Germano e Mateus. A amizade, carona, paciência e bondade de vocês foram essenciais.

Aos meus amigos da biologia da UFRGS, que mesmo de longe sempre me acompanharam e me fizeram sentir que nem a distância muda a nossa grande amizade. Amo vocês! À Nicole Sehnem pela parceria e companhia sempre e à Elisângela Aquino e sua família por me acolher como família em sua casa.

Nessa reta final há o balanço de tudo que foi vivido nessa etapa. Foi mais que um mestrado, foi um aprendizado sobre novos amigos, nova casa, novas culturas mas que não deixaram pra trás o apoio de casa, dos que de lá apoiam todas as minhas decisões e celebram comigo mais essa etapa.

À Escola de Engenharia de Lorena e ao Departamento de biotecnologia por fazer possível minha participação no programa de Biotecnologia Industrial.

Por fim a CAPES pelo auxílio financeiro.

Resumo

Machado, A.S. **Uso de basidiomicetos no tratamento de bagaço de cana como etapa prévia aos processos de hidrólise enzimática dos polissacarídeos** 2015. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

O bagaço de cana é um importante material lignocelulósico gerado no Brasil e pode ser uma fonte de açúcares monoméricos. No entanto, a conversão eficiente de seus polissacarídeos via hidrólise enzimática requer processos de pré-tratamento para diminuir sua recalcitrância. Fungos basidiomicetos são reconhecidos como os organismos mais efetivos na degradação dos componentes lignocelulósicos em madeira e podem, potencialmente, ser empregados na etapa de pré-tratamento. Para que o balanço de massas de glicose obtida através deste processo combinado de conversão seja positivo, é necessário que a degradação biológica de lignina seja máxima e que a celulose seja preservada na etapa de pré-tratamento. O objetivo deste trabalho foi a avaliação da utilização do fungo de decomposição parda *Laetiporus gilbertsonii* e dos fungos de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora* no pré-tratamento de bagaço de cana para etapas subsequentes de hidrólise enzimática dos polissacarídeos. O pré-tratamento biológico foi realizado em frascos Erlenmeyers de 2L com 25 g de bagaço de cana suplementado com 0,5% de milhocina por períodos de 7 a 60 dias. Após o biotratamento também foi aplicada uma etapa tratamento químico com peróxido de hidrogênio (2%) por 48 h a 40 °C seguido de uma extração alcalina com hidróxido de sódio (5%) a 120 °C por 2 h. Essa etapa também foi aplicada sobre o bagaço original para avaliação da eficiência da combinação dos tratamentos (controle). Para análise da eficiência dos tratamentos, foram realizadas hidrólises enzimáticas dos substratos gerados e do bagaço original. A biodegradação de bagaço de cana por *L. gilbertsonii* e *P. ostreatus* apresentou baixa perda de massa. O bagaço de cana biotratado por *L. gilbertsonii* se mostrou mais recalcitrante à ação das enzimas que bagaço original, enquanto que o bagaço biotratado por *P. ostreatus* apresentou uma conversão superior dos polissacarídeos residuais ao original acima de 30 dias de cultivo. O biotratamento de bagaço de cana por *C. subvermispora* apresentou a mais extensa perda de massa em relação aos outros fungos. Após 60 dias de cultivo, *C. subvermispora* degradou 17%, 49% e 48% da celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente; enriquecendo a fração celulósica do material. A hidrólise deste substrato biotratado alcançou conversão de celulose de 54%, contra somente 23% no material original. Mesmo com o consumo de parte da fração celulósica pelo fungo *C. subvermispora*, a aplicação do biotratamento gerou mais glicose disponível do que o bagaço de cana in natura.

Palavras-chave: Bagaço de cana, Tratamento biológico, Basidiomicetos, Hidrólise Enzimática

Abstract

Machado, A.S. **Use of basidiomycetes in the treatment of sugarcane bagasse as a previous step to enzymatic hydrolysis process of polysaccharides.** 2015. 85p. Dissertação (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

Sugarcane bagasse is one of the most important lignocellulosic raw material in Brazil and may be a source of fermentative sugars. However, for an efficient conversion of these polysaccharides by enzymatic hydrolysis, a pretreatment is required to overcome the material recalcitrance. Basidiomycetes are recognized as the most effective organisms to degrade lignocellulosic materials and may, potentially, be used for the pretreatment step. For a positive balance of glucose in this process, maximal degradation of lignin should be attained with minimal degradation of the cellulosic fraction. The aim of this work is the evaluation of the brown-rot fungi *Laetiporus gilbertsonii* and the white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Ceriporiopsis subvermispora* in the pretreatment of the sugarcane bagasse for subsequent enzymatic hydrolysis of the remaining polysaccharides. The biological pretreatment was carried in Erlenmeyers 2L flasks with 25 g of sugarcane bagasse, supplemented by 0.5% of corn steep liquor for 7 to 60 days. After the biological pretreatment, a chemical processing with hydrogen peroxide (2 %) for 48 h at 40 °C followed by alkaline extraction with sodium hydroxide (5 %) at 120 °C for 2 h was also performed. This chemical step was also applied in the raw bagasse to evaluate the efficiency of the combined treatment. Enzymatic hydrolysis of the solids was performed to analyze the efficiency of the treatments on the pretreated and original bagasse. The biodegradation of sugarcane bagasse by *L. gilbertsonii* and *P. ostreatus* showed low mass loss values. The bagasse treated by *L. gilbertsonii* was even more recalcitrant to enzymes than the raw material, meanwhile the material treated by *P. ostreatus* showed a higher conversion of residual polysaccharide than raw material after 30 days of biotreatment. The biological treatment of bagasse with *C. subvermispora* showed the higher mass loss values among studied fungi. After 60 days of grown, *C. subvermispora* degraded 17 %, 49 % and 48 % of cellulose, hemicellulose and lignin, respectively, enriching the cellulosic fraction of the material. The hydrolysis of this treated substrate reached a cellulose conversion of 54 % against only 23 % found in the raw bagasse. Even considering the cellulosic fraction consumption by *C. subvermispora*, the fungal pretreatment provided more available glucose at the end of the process as compared to the raw bagasse.

Key words: Sugarcane bagasse, Biological treatment, Basidiomycetes, Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.....	20
Figura 2 - Modelo de ação das celulasas sobre cadeias de celulose.....	22
Figura 3 - Aspecto de uma madeira decomposta por fungos de decomposição parda.....	26
Figura 4 - Aspecto de uma madeira decomposta por fungos de decomposição branca.....	28
Figura 5 - Ciclo catalítico simplificado das peroxidases principais do sistema oxidativo da lignina em fungos de degradação branca.....	29
Figura 6 - Ciclo catalítico simplificado da lacase presente no sistema oxidativo da lignina em fungos de degradação branca.....	30
Figura 7 - Via extracelular proposta para redução de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 por <i>G. trabeum</i>	31
Figura 8 - Aspectos macroscópicos dos reatores selecionados após 30 dias de cultivo. <i>P. ostreatus</i> : reator A (a) e reator B (b). <i>L. gilbertsonii</i> : reator C (c) e reator D (d).....	44
Figura 9 - Aspecto macroscópico mais aproximado da colonização da superfície do bagaço de cana (a) reator A. (b) Reator B.....	44
Figura 10 - Cinética da hidrólise enzimática de glucana (A) e da xilana (B) do bagaço controle (autoclavado) e dos bagaços tratados por <i>L. gilbertsonii</i>	50
Figura 11 - Digestibilidade de glucanas (A) e da xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> , antes e após aplicação do tratamento com peróxido de hidrogênio e extração alcalina [(P _a)E], em 48 h de hidrólise enzimática.....	51
Figura 12 - Digestibilidade após 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana autoclavado ou biotratado por <i>L. gilberstonii</i> antes e após aplicação dos tratamentos com peróxido de hidrogênio (P _a) ou extração alcalina (E).....	54

Figura 13 - Cinética da hidrólise enzimática da glucana (A) e da xilana (B) do bagaço controle in natura e dos bagaços tratados por <i>P. ostreatus</i>	58
Figura 14 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e da xilana (B) residual dos bagaços de cana original e biotratado por <i>P. ostreatus</i> antes e depois da aplicação do tratamento peróxido e extração alcalina [(P _a)E].....	59
Figura 15 - Digestibilidade de glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana original e biotratado por <i>P.ostreatus</i> , antes e após a aplicação dos tratamentos peróxido (P _a) ou alcalino (E) em 48 h de hidrólise enzimática.....	61
Figura 16 - Cinética da hidrólise enzimática da glucanas (A) e da hemicelulose (B) do bagaço controle in natura e dos bagaços tratados por <i>C. subvermispota</i>	66
Figura 17 - Digestibilidade da glucanas (A) e da hemicelulose (B) residual dos bagaços de cana autoclavado, biotratado por <i>C. subvermispota</i> e após aplicação do tratamento peróxido alcalino em 48 h de hidrólise enzimática.....	67
Figura 18 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por <i>C. subvermispota</i> antes e após aplicação dos tratamentos peróxido (P _a) ou extração alcalina (E).....	69
Figura 19 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por <i>C. subvermispota</i> antes e após aplicação do tratamento sulfito alcalino.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química, rendimento e balanço de massas dos componentes presentes nas amostras do bagaço de cana <i>in natura</i> e do bagaço autoclavado.....	46
Tabela 2 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado e biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(P _a)E].....	48
Tabela 3 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado ou biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> antes e após a aplicação do tratamento oxidativo [(P _a)] ou extração alcalina (E).....	53
Tabela 4 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado e biotratado por <i>P. ostreatus</i> , antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(P _a)E].....	56
Tabela 5 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado ou biotratado por <i>P. ostreatus</i> antes e depois da aplicação do tratamento oxidativo [(P _a)] ou extração alcalina (E).....	60
Tabela 6. - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controle e biotratado por <i>C. subvermispota</i> antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina.....	63
Tabela 7 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controles ou biotratado por <i>C. subvermispota</i> antes e depois da aplicação do tratamento oxidativo [(P _a)] ou extração alcalina (E).....	68
Tabela 8 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controle ou biotratado por <i>C. subvermispota</i> antes e depois da aplicação do tratamento sulfito alcalino.....	70
Tabela 9 - Glicose potencial (g para cada 100 g bagaço de cana original) dos bagaços de cana que foram biotratados e tratamentos químicos subsequentes.....	73
Tabela 10 - Xilose potencial (g para cada 100 g bagaço de cana original) dos bagaços de cana que foram biotratados e tratamentos químicos subsequentes.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Bagaço de cana.....	19
2.2 Enzimas envolvidas na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica.....	21
2.3 Pré-tratamento biológico.....	25
2.3.1. Fungos degradadores de lignocelulósicos.....	26
2.3.2. Uso de basidiomicetos em pré-tratamentos biológicos.....	31
2.4 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica.....	33
3 OBJETIVO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Fungos utilizados, manutenção da cultura e preparação dos inóculos.....	35
4.2 Ensaio de biodegradação de bagaço de cana em biorreator.....	36
4.3 Ensaios de biodegradação de bagaço de cana em frascos Erlenmeyers de 2L	37
4.4 Tratamento do bagaço de cana com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio.....	38
4.5 Tratamento do bagaço de cana com sulfito alcalino.....	39
4.6 Determinação da composição química do bagaço de cana.....	40
4.7 Hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	41
4.7.1 Eficiência de hidrólise na conversão dos polissacarídeos.....	41
4.7.2 Balanço massa completo para os processos integrados de preparação de glicose e xilose.....	42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Biodegradação de bagaço de cana em biorreatores de 20L, características do substrato de origem industrial e sua composição química.....	43
5.2 Biotratamento de bagaço de cana em Erlenmeyers de 2L.....	46
5.2.1 Biodegradação com <i>Laetiporus gilbertsonii</i>	47
5.2.1.1 Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i>	49
5.2.2 Biotratamento do bagaço de cana por <i>Pleurotus ostreatus</i>	55
5.2.2.1 Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i>	57
5.2.3. Biotratamento do bagaço de cana por <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	62
5.2.3.1 Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por <i>C. subversmipora</i>	65
5.2.3.2 Hidrólise enzimática das amostras biotratadas submetidas ao tratamento com sulfito alcalino.....	70
5.2.4 Açúcares potenciais de cada tratamento para etapas subsequentes de bioconversão.	72
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais materiais lignocelulósicos disponíveis no Brasil é o bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). Este material é o resíduo fibroso obtido após a extração do suco da cana de açúcar, no processo de produção de açúcar e álcool. O processo para utilização de materiais lignocelulósicos em bioprocessos geralmente contém três passos principais: (1) pré-tratamento, para diminuir a recalcitrância do material lignocelulósico; (2) hidrólise enzimática, para converter polissacarídeos (p. ex, celulose e hemicelulose) em açúcares fermentescíveis; e (3) fermentação, para converter os açúcares em etanol ou outros produtos de interesse (TALEBNIA et al., 2010). A etapa de pré-tratamento descrita anteriormente tem como objetivo remover lignina e/ou hemicelulose, diminuir o teor de celulose cristalina e aumentar a porosidade do material (JEYA et al., 2009).

O biotratamento com fungos pode ser uma forma de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, visto que algumas das transformações mencionadas anteriormente podem ser induzidas pela ação do fungo sobre o material lignocelulósico (RAY et al. 2010). Entre os fungos, aqueles que atuam nas frações poliméricas dos lignocelulósicos são os mais promissores para a etapa de pré-tratamento. Estes fungos são classificados como de podridão branca ou parda e pertencem majoritariamente à classe Basidiomycetes (FERRAZ, 2010).

Embora promissor, o pré-tratamento biológico apresenta algumas desvantagens se comparado com os processos químicos e quimiotermomecânicos. Uma limitação do processo biológico é a demanda por ambientes assépticos e o controle do crescimento dos micro-organismos. O longo período necessário para o pré-tratamento (da ordem de 15 a 30 dias) também tem sido apontado como uma limitação dos processos biológicos (SALVACHÚA et al., 2011). Em face destas desvantagens, tem sido proposto que a combinação de pré-tratamentos pode ser uma alternativa para contornar as limitações de métodos individuais. Por exemplo, Yu et al. (2009) reportaram que o rendimento total de açúcar da casca de arroz

depois da combinação de um pré-tratamento com um fungo e o tratamento químico com peróxido de hidrogênio foi maior do que somente a aplicação do pré-tratamento químico. Salvachúa et al. (2011) avaliaram a aplicação da etapa de extração alcalina sobre a palha de trigo biotratada com fungos basidiomicetos, demonstrando que a combinação acarreta na minimização da formação de inibidores para processos posteriores, o que melhorou significativamente a produção de etanol a partir dos hidrolisados obtidos.

Dentro deste contexto, o presente trabalho aborda o emprego do processo de biodegradação de bagaço de cana como uma etapa de pré-tratamento à hidrólise enzimática. Foram avaliados 3 fungos basidiomicetos representativos dos grupos de decomposição branca e de decomposição parda. Os bagaços biotratados também foram utilizados como substrato na aplicação de um pós-tratamento oxidativo com peróxido de hidrogênio e extração alcalina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de carboidratos abundante e renovável. A geração de bioetanol a partir de açúcares derivados de resíduos agrícolas pode substituir em parte o uso de combustíveis fósseis, além de agregar valor a produtos provenientes de atividades agroindustriais. O bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa lignocelulósica residual do processo de moagem e extração do caldo. Em números aproximados, 1 tonelada de cana-de-açúcar (base úmida) gera, 140 kg de bagaço (base seca). A produção total de cana de açúcar no Brasil na safra de 2013/14 foi de 658,82 milhões de toneladas (CONAB, 2014) o que significa a geração de cerca de 92 milhões de toneladas de bagaço de cana.

O bagaço de cana apresenta uma grande heterogeneidade morfológica, sendo constituído de fibras e outros elementos estruturais como: vasos, células de parênquima e células epiteliais (SUN et al., 2004). A constituição da parede destas células é a chave para o uso do bagaço de cana em processos biotecnológicos. O componente mais abundante da biomassa vegetal é a celulose. (LYND et al., 2002). A parede celular contém cerca de 40% de celulose, que é um homopolímero linear de glicoanidropiranoses ligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4). Este polímero possui uma média de 10.000 unidades glicosídicas formando uma cadeia rígida que se agrega a outras cadeias através de ligações de hidrogênio, acarretando na organização de várias moléculas na forma de fibrilas elementares dando origem a estruturas cristalinas. A cristalinidade da celulose também a torna altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (ZHU et al., 2008).

O bagaço de cana contém ainda de 20-30% de hemicelulose ou polioses, que corresponde a polímeros diversos, sempre amorfos, com grau de polimerização entre 100 e 200. As hemiceluloses contém diferentes carboidratos tais como xilose,

arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos urônicos (STAMBUK et al., 2008). Embora a maioria das polioses seja insolúvel em água, o polissacarídeo pode ser dissolvido em soluções de bases fortes. As hemiceluloses também são mais facilmente hidrolisadas por ácido do que a celulose (GOLDSTEIN; LEWIN, 1991).

A xilana é a hemicelulose presente em maior proporção no bagaço de cana (Figura 1) e apresenta uma cadeia principal constituída de D-xilopiranosil com ligações β -(1,4), podendo ser substituída com α -arabinofuranosil, ácidos metilglucurônicos, grupos acetilas, ácidos cumárico e ferúlico (WENDE; FRY, 1997)

Figura 1 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = 1,4-D-xilopiranoose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopiranoúrico; Ac= acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico

Fonte: McDOUGALL, (1993).

A lignina é o terceiro componente da parede celular e pode representar entre 20 e 30% do material. Trata-se de uma macromolécula composta basicamente por unidades de fenilpropano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes β -O-4 e α -O-4 (40-60 %) (ADLER, 1977; HIGUCHI, 1997; HON; SHIRAISHI, 2001; HENRIKSSON, 2009). Na parede celular, a lignina está associada às polioses através de interações físicas e ligações covalentes. Essas interações protegem a planta contra o ataque de microrganismos e confere coesão à estrutura interna, além de auxiliar na resistência ao esforço

mecânico (FENGEL; WEGENER, 1989; HOFRICHTER, 2002). A lignina contida nas paredes celulares permite ainda que elementos condutores de água não colapsem (RAMOS, 2003), além de servir como uma barreira natural contra a degradação enzimática da parede celular (GOLDSTEIN; LEWIN, 1991; LEE; MOON, 2003; ÖNNERUD et al., 2002).

2.2 Enzimas envolvidas na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica

A biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza ocorre majoritariamente pela ação de fungos e constitui um importante processo de reciclagem da matéria orgânica (ARANTES; MILAGRES, 2009). O processo é extracelular, pois, após a penetração das hifas pelo lúmen das células, há liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam os tecidos vegetais (FERRAZ, 2010). O sistema hidrolítico é composto por celulasas e hemicelulasas responsáveis pela degradação da porção polissacarídica do material vegetal e esse sistema é extensivamente utilizado pela indústria na formulação de coquetéis enzimáticos comerciais utilizados para converter materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares monoméricos utilizados nas etapas subsequentes de processos biotecnológicos (KESHWANI; CHENG, 2009).

Os coquetéis enzimáticos mais comuns usam o complexo celulolítico de fungos ascomicetos, como por exemplo, de *Trichoderma reesei*, pois essa espécie exibe a capacidade de secretar grandes quantidades dos diferentes grupos de celulasas e solubilizar eficientemente celulose cristalina, além de rápido crescimento e produção dessas enzimas (GUSAKOV, 2011).

A hidrólise completa da celulose requer um conjunto amplo de enzimas. Os três principais grupos de enzimas que fazem parte do complexo celulolítico são ilustrados na Figura 2 e descritos a seguir (LADISCH et al., 1983; LYND et al., 2002; WRIGHT et al., 1988)

I. Endoglucanases: as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4) atuam nas regiões amorfas da celulose, quebrando ligações glicosídicas randomicamente ao longo da cadeia, criando novos terminais livres na cadeia celulósica, gerando frações com menor grau de polimerização.

II. Exoglucanases: as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) degradam a molécula a partir das extremidades, removendo unidades de celobiose. O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucano-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui mecanismos de hidrólise da cadeia celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). As CBH podem ainda ser divididas em dois tipos, CBH I que atuam sobre terminais redutores, e CBH II que hidrolisam terminais não redutores da celulose.

III. β -glicosídates: as 1,4- β -glicosídases (EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose à glicose (WRIGHT et al., 1998). Em geral a ação dessas enzimas é inibida pela presença do produto (CASTRO;PEREIRA Jr, 2009).

Figura 2 - Modelo de ação das celulasas sobre cadeias de celulose.

Fonte: Adaptado de LYND et al., 2002.

A recente descoberta de um novo grupo de oxidoredutases (GH61) contribuiu para o melhor entendimento da hidrólise da celulose (QUINLAN et al., 2011). Essas enzimas foram classificadas como sendo pertencentes à família 61 das glicosil hidrolases, porém são metaloproteínas capazes de clivar ligações glicosídicas por via oxidativa na superfície da celulose cristalina. Por isso, sofreram recentemente uma atualização na sua classificação, sendo que este grupo de enzimas foi denominado como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (do inglês copper dependent lytic polysaccharide monooxygenases - LPMOs). A identificação do papel dessas e outras enzimas oxidativas sobre a degradação de polissacarídeos é peça chave na eficiente despolimerização das cadeias de celulose.

Outro exemplo é a celobiose desidrogenase (CDH- EC 1.1.99.18), enzima que atua sobre a celobiose, oligômeros de glicose e celulose, oxidando o terminal redutor. O exato papel da CDH *in vivo* não é completamente conhecido, mas sabe-se que atua na remoção da celobiose, que é um inibidor da CBH, e tem capacidade de utilizar quinonas como aceptor de elétrons, interligando dessa forma, os complexos celulolítico e ligninolítico (FERRAZ, 2010; KIRK; CULLEN, 1998). Esta enzima também pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} que, na presença de peróxido de hidrogênio, pode proporcionar o desenvolvimento da reação de Fenton que gera radicais hidroxila aptos a degradar celulose de forma oxidativa.

Além destas enzimas oxidativas, têm sido reportadas proteínas sem atividade hidrolítica, porém capazes de afrouxar a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação, como as expansinas e as swoleninas (ARANTES; SADDLER, 2010). Tem sido sugerido que a ação dessas proteínas é de afrouxar ou perturbar o empacotamento da cadeia de fibrilas da celulose. A atividade de desestruturação destas proteínas pode interagir sinergeticamente com as celulasas, para hidrolisar a celulose insolúvel aumentando a acessibilidade desta às enzimas (ARANTES; SADDLER, 2010).

Para a hidrólise da hemicelulose há uma maior diversidade no coquetel de enzimas, como xilanases, mananases, β -xilosidades e diversas enzimas atuando nos grupos pendentes da hemicelulose como as acetilesterases (DUFF; MURRAY, 1996). Por isso, as enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em

enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). As principais xilanases são a endo-1,4- β -xilanase e a β -xilosidase. As endoxilanases atacam a cadeia principal e β -xilosidases clivam pequenos xilooligossacarídeos e xilobiose liberando resíduos β -D-xilopiranosil da extremidade não redutora. As β -xilosidases preferem xilobiose como substrato e sua afinidade por xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao grau de polimerização do mesmo (TEERI; HENRIKSSON, 2009). Como algumas xilanases não clivam as ligações da cadeia principal nos pontos próximos àquele em que há substituintes, as cadeias laterais devem ser removidas previamente, por isso a atividade de enzimas acessórias como L-arabinofuranosidases, glucuronidases, acetilxilana esterases e feruloil esterases é essencial (SAHA, 2003).

A hidrólise enzimática dos polissacarídeos contidos na parede celular é um caminho promissor para a obtenção de açúcares monoméricos (LYND et al., 2008). Comparado com a hidrólise ácida, a enzimática necessita de condições mais amenas de reação e é mais específica, contudo algumas características intrínsecas do substrato lignocelulósico limitam a hidrólise enzimática dos polissacarídeos (ZHENG et al., 2009). Entre estas características pode-se destacar, a estrutura mais compacta e protegida da parede celular, a cristalinidade e o grau de polimerização de celulose, o teor de umidade, a área de superfície disponível e o teor de lignina e hemicelulose (CHANG et. al., 2000). Devido a essas características, se faz necessário um tratamento prévio do material lignocelulósico para que sua digestibilidade enzimática seja aumentada (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al.; 2010; DESWAL et al.; 2013; MENDES et al; 2011; PARK; KIM, 2012; SALVACHÚA et al; 2011, SHI et al.,2009; ZHAO et al., 2007)

2.3 Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento, é uma ferramenta importante no processo de conversão de biomassa e é requerido a fim de modificar a estrutura da biomassa para aumentar a acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos constituintes da parede celular (MOSIER et al., 2005). A produção eficiente de açúcares fermentáveis requer a desconstrução da parede celular (PINGALI et al., 2010). Um pré-tratamento ideal deve ser capaz de maximizar a recuperação dos carboidratos disponíveis, enquanto minimiza a degradação de açúcares monoméricos e a geração de possíveis inibidores.

O pré-tratamento pode ser feito por processos físicos, químicos ou biológicos (revisto por ALVIRA et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MOSIER et al., 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ZHU et al., 2008). Diversas estratégias têm sido testadas para reduzir a severidade da etapa de pré-tratamento. Propostas com maior aproximação do conceito de processos ambientalmente menos nocivos tem recebido atenção como método de pré-tratamento para melhorar a sacarificação enzimática dos lignocelulósicos em processos de produção de etanol (ALVIRA et al., 2010; CIANCHETTA et al., 2014; DONG et al., 2013; RAY et al., 2010). O uso de agentes biológicos tais como fungos e bactérias tem ganhado importância dentro deste contexto.

2.3.1 Fungos degradadores de lignocelulósicos

A biodegradação da madeira na natureza envolve a ação simultânea de diversos microrganismos tais como fungos, bactérias e parasitas. Os organismos mais eficientes nessa degradação são os fungos, os quais tem extrema importância no ciclo do carbono na natureza, devido à grande capacidade de degradar fontes complexas de carbono, mostrando o importante papel desses fungos no processo de

reciclagem da biomassa das florestas (FENGEL; WEGENER, 1989; LEVY, 1987). Entre as inúmeras espécies de fungos, destaca-se o filo Basidiomycota, que engloba cerca de 30.000 espécies, correspondendo a 37% do número descrito dos fungos verdadeiros (KIRK et al., 2008).

Os fungos degradadores de madeira constituem um grupo não taxonômico (engloba fungos basidiomicetos e alguns ascomicetos) caracterizado pela capacidade de seus organismos em degradar materiais lignocelulósicos de maneira eficiente e pela síntese de enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam sobre substratos ricos em celulose, hemicelulose e lignina. Estes fungos são classificados de acordo com os padrões de degradação que apresentam, levando-se em conta a característica macroscópica da degradação (FERRAZ, 2010).

Os fungos causadores de decomposição parda degradam principalmente os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes no material, enquanto a lignina é modificada estruturalmente através de reações de desmetilação ou hidroxilação (KIRK, 1983). Por degradarem principalmente os polissacarídeos, geram um resíduo enriquecido em lignina, logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil (BLANCHETTE, 1991), como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Aspecto de uma madeira decomposta por fungos de decomposição parda. Nota-se a coloração escura adquirida e a formação de fragmentos cúbicos resultantes da quebra no sentido transversal das fibras vegetais.

Fonte: FERRAZ (2010).

Os fungos de decomposição parda produzem endo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase, mas não a exo-1,4- β -glucanase, que atua nas regiões cristalinas da celulose. Dessa forma, a degradação da celulose, característica comum destes fungos, não pode ser explicada unicamente pela ação enzimática. Uma das formas de explicar a ação destes fungos sobre os polissacarídeos inclui mecanismos não enzimáticos, principalmente no início da degradação do material. Está demonstrado que os fungos de decomposição parda promovem a formação de radicais através da reação de Fenton. A reação de Fenton é baseada na reação entre peróxidos (geralmente H_2O_2) e Fe^{2+} em meio ácido que leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (ARANTES; MILAGRES, 2009), como demonstrada a seguir:

Os fungos causadores de podridão branca são os mais eficientes degradadores de lignina, podendo degradá-la seletivamente ou simultaneamente aos polissacarídeos. A forma de degradação mais típica envolve a remoção simultânea dos três principais componentes dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) e a menos frequente envolve a remoção seletiva da lignina e hemicelulose, mantendo a celulose praticamente intacta. Esse grupo de fungos produz todas as enzimas extracelulares necessárias para a hidrólise completa da celulose, com variação no nível de cada atividade enzimática. Em geral, eles não são bons produtores de celulasas e a seletividade por lignina de alguns está relacionada a uma atividade de celulase total baixa (ARANTES; MILAGRES, 2009). A remoção da lignina faz com que os materiais decompostos por esses fungos adquiram uma cor esbranquiçada (Figura 4) e sejam facilmente rompidos no sentido da fibra (FERRAZ, 2010).

Figura 4 - Aspecto de uma madeira decomposta por fungos de decomposição branca. Nota-se a coloração branca adquirida e a formação de fragmentos fibrosos resultantes da quebra no sentido paralelo das fibras vegetais.

Fonte: Departamento de botânica – Universidade de Winconsin. Tom Volk's Fungi Collection. http://botit.botany.wisc.edu/Resources/Toms%20Fungi/Basidiomycota/Hymenomycetes/General_--Wood_rotters/White_rot_Stromatoscypha_tjv.jpg.html

A habilidade dos fungos de decomposição branca em quebrar e mineralizar a lignina, o componente mais resistente da parede celular, foi extensivamente estudado. O fato da lignina ser hidrofóbica, apresentar elevada massa molar e ser constituída por ligações C-C e C-O-C demanda um processo de degradação extracelular muito peculiar, que é majoritariamente oxidativo ao invés de hidrolítico (BREEN; SINGLETON, 1999)

De modo geral, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas, cuja ação leva a reações de oxidação que progressivamente decompõem a macromolécula até compostos de baixa massa molar que podem ser susceptíveis ao metabolismo intracelular do fungo. Essas enzimas são divididas em dois grupos (KIRK; CULLEN, 1998; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008):

- i) Oxidases e peroxidases: representadas, principalmente, por lacases, Manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidases (LiPs), as quais são organizadas segundo a sua capacidade oxidativa: LiPs > MnPs > Lacases (KIRK; CULLEN, 1998) e;
- ii) Enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (necessário para a ação das peroxidases), como por exemplo, glioxal oxidase e aril álcool oxidase.

A LiP e a MnP possuem modo de ação similares (Figura 5a e 5b), sendo a enzima ativada pela oxidação por H_2O_2 , levando à formação do composto I (CI) que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do CI até a enzima nativa (C0), se dá através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. Quanto à ação da LiP, a degradação de lignina ocorre através da formação inicial de um radical catiônico nos núcleos aromáticos. A formação do radical catiônico induz à ruptura de ligações, principalmente entre os carbonos α e β e a consequente degradação química (pela ação do oxigênio e da água) dos intermediários formados (KIRK; CULLEN, 1998).

Figura 5 - Ciclo catalítico simplificado das peroxidases principais do sistema oxidativo da lignina em fungos de degradação branca. PhOH representa um substrato fenólico. S representa um substrato aromático não fenólico. (a) Ciclo catalítico simplificado de lignina peroxidase (LiP). (b) Ciclo catalítico simplificado da Manganês peroxidase (MnP).

Fonte: FERRAZ (2010).

As MnPs são dependentes de Mn^{2+} e apresentam capacidade oxidativa limitada, podendo abstrair elétrons somente em estruturas fenólicas. As MnPs reduzem o CI à CII as custas da oxidação de uma estrutura fenólica (PhOH) ou de Mn^{2+} . Estas enzimas são dependentes de Mn^{2+} para reduzir o CII a C_0 . O Mn^{3+} formado é bastante reativo e normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. A redução do complexo Mn^{3+} -oxalato, pode se dar através da oxidação de outra estrutura fenólica (FERRAZ, 2010).

O modo de ação das lacases difere das peroxidases (Figura 6). Elas atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração

de 1 elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (FERRAZ, 2010).

Figura 6 - Ciclo catalítico simplificado da lacase presente no sistema oxidativo da lignina em fungos de degradação branca. PhOH representa um substrato fenólico. S representa um substrato aromático não fenólico. Ciclo catalítico de lacase. A estequiometria do ciclo da lacase envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2 .

Fonte: FERRAZ (2010)

Sabe-se que as enzimas lignocelulolíticas não são capazes de penetrar na estrutura da parede celular nas fases iniciais da degradação em razão de sua elevada massa molar e baixa porosidade da parede celular (BLANCHETTE et al., 1997). Neste contexto, muitos dos fungos degradadores de materiais lignocelulósicos produzem compostos de baixa massa molar (CBMM) que poderiam se difundir facilmente desde a hifa e penetrar nos poros da matriz lignocelulósica e, nos estágios iniciais de degradação, provocariam a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos poros já existentes (ARANTES, 2008; AGUIAR, 2008; GOODELL, 1997).

Goodell (1997) demonstrou que um extrato de baixa massa molar (menor do que 1 kg/mol) de um cultivo do fungo *Gloeophyllum trabeum* (fungo de degradação parda) possuía compostos do tipo catecol com atividade redutora de Fe^{3+} . Esses compostos exibiram atividade pró-oxidante, devido à maior formação de radicais hidroxila pela reação do íon metálico e H_2O_2 . Os estudos permitiram concluir que esse fungo usa um ciclo extracelular de oxirredução de quinonas para gerar os dois reagentes de Fenton. Dois anos depois, foram identificados dois agentes redutores em cultivos desse mesmo fungo: 2,5-dimetoxi-hidroquinona e 4,5-dimetoxi-catecol e suas respectivas formas oxidadas (KEREM et al., 1999; PASZCZYNSKI et al., 1999) com mecanismo ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Via extracelular proposta para redução de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 por *G. trabeum*.

Fonte: KEREM et al. (1999).

2.3.2 Uso de basidiomicetos em pré-tratamentos biológicos

O biotratamento dos materiais lignocelulósicos por basidiomicetos se apresenta como uma via possível de pré-tratamento para etapas subsequentes de hidrólise enzimática, pois pode ser realizado em condições amenas de reação, tem o potencial de minimizar a formação de produtos secundários e insumos químicos (LEE, 1997, SALVACHÚA et al., 2011). As principais limitações dos métodos biológicos de pré-tratamento envolvem a necessidade de controle do crescimento dos microrganismos desejados e o longo período de pré-tratamento usado, que é da ordem de semanas ou o consumo extenso de celulose e hemicelulose (SALVACHÚA et al., 2011). Recentemente, pesquisadores tem trabalhado com tratamento biológico como método alternativo, seja para parcialmente substituir ou diminuir a severidade dos processos químicos utilizados em diferentes métodos de pré-tratamento (MENON; RAO, 2012).

O potencial biotecnológico dos basidiomicetos ou seu complexo enzimático ligninolítico é variado (PÉREZ et al., 2002). A aplicação de um pré-tratamento biológico, gera um sólido final ainda composto de celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, a proporção dos componentes pode se mostrar alterada, dependendo do organismo empregado na etapa de pré-tratamento e, principalmente, a parede celular pode estar mais desestruturada em relação à situação inicial. Consequentemente, a subsequente hidrólise enzimática da fração polissacarídica pode, a princípio, ocorrer de forma mais eficiente (LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2013).

Diversos trabalhos foram realizados com fungos degradadores de lignocelulósicos em diferentes substratos com o propósito de facilitar a posterior hidrólise enzimática do material. Taniguchi et al., (2005) avaliaram a aplicação de pré-tratamento biológico com *P. ostreatus* em palha de arroz e observaram que a hidrólise enzimática da palha biotratada por 60 dias foi melhorada, atingindo 44% de conversão da celulose contra 13 % observado no material *in natura*. Keller, Hamilton e Nguyen (2003) observaram um aumento de 3 a 5 vezes na digestibilidade enzimática da celulose de resíduos da plantação de milho (corn stover) devido ao biotratamento por 29 dias com *Cyantus stercoreus*for. Zhang et al. (2007) observaram que o pré-tratamento biológico com *Coriolus versicolor* foi efetivo no melhoramento do rendimento de açúcares redutores produzidos a partir de resíduos de bambu.

Na busca por fungos mais eficientes para o biotratamento de palha de trigo, Salvachúa et al. (2011) fizeram uma avaliação de 21 espécies de basidiomicetos. As diferentes espécies empregadas apresentaram perfis degradativos diferenciados. De forma geral, os dados indicaram que o nível de deslignificação e o consumo de polissacarídeos não refletiu diretamente no aumento de digestibilidade do substrato. Apenas 8 espécies estudadas aumentaram a digestibilidade do material após 21 dias de biotratamento. Entre as espécies mais eficientes se destacaram *Irpex lacteus*, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phlebia radiata* que além de melhorar a digestibilidade do material biotratado, permitiram obter maiores rendimentos na produção de etanol em relação aos experimentos controle feitos com palha não tratada.

2.4 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica

O trabalho de Keller, Hamilton e Nguyen (2003), reforçado pela ampla avaliação de espécies realizadas por Salvachúa et al. (2011), apontam para uma série de requisitos importantes para o biotratamento aplicado como etapa de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Entre os requisitos relevantes para a etapa de biotratamento estão:

1. Baixa perda de massa, especialmente carboidratos;
2. Baixo custo, particularmente relativo ao uso de co-nutrientes, emprego de aeração e um tempo razoavelmente curto de residência;
3. Robustez do fungo para competir com a biota natural.
4. Potencial para diminuir a severidade de um tratamento químico ou mecânico subsequente.
5. Melhorar a hidrólise enzimática.
6. Não gerar compostos inibitórios da fermentação.

Com base neste diagnóstico de aspectos importantes de uma etapa de pré-tratamento biológico, o presente trabalho visa explorar as potencialidades de 3 grupos típicos de basidiomicetos para o biotratamento de bagaço de cana de açúcar. As espécies foram selecionadas para representar os fungos de decomposição parda, os fungos de decomposição branca não seletivos (aqueles que degradam os três principais componentes simultaneamente) e os fungos de decomposição branca seletivos (aqueles que degradam majoritariamente lignina e hemicelulose)

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de três espécies de basidiomicetos para o pré-tratamento do bagaço de cana para etapas subsequentes de hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

Para atingir estes objetivos, as seguintes etapas foram realizadas:

- Cultivo de *Laetiporus gilbertsonii*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora* sobre o bagaço de cana em sistemas de fermentação em meio sólido;
- Aplicação de tratamentos subsequentes ao biotratamento biológico que envolvem métodos oxidativos com H_2O_2 seguidos de extração alcalina dos sólidos residuais;
- Avaliação das mudanças na composição química dos sólidos residuais acarretadas pelas etapas de biotratamento e pós-tratamento químico;
- Avaliação do efeito das etapas de biotratamento e de tratamento químico na eficiência da hidrólise enzimática dos polissacarídeos residuais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fungos utilizados, manutenção da cultura e preparação dos inóculos.

Foram utilizadas três espécies de fungos degradadores de madeira, com características previamente conhecidas quanto ao padrão de decomposição de materiais lignocelulósicos: *Laetiporus gilbertsonii*, com padrão de degradação parda, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispota*, com padrão de degradação branca. As espécies em questão foram originalmente obtidas de coleções de cultura externas, a saber: a) *Laetiporus gilbertsonii* - cepa originalmente obtida junto ao ATCC sob número 52600, catalogada na fonte como *Laetiporus sulfureus*. Um trabalho recente de identificação baseada no DNA extraído do fungo em questão indica sua reclassificação como *L. gilbertsonii* (Squina, F., informação pessoal, não publicada). De fato, artigos que abordam a taxonomia do gênero *Laetiporus* apontam similaridades significativas entre estas duas espécies (BURDSALL Jr; BANIK 2001; BANIK et al., 2012), *Pleurotus ostreatus* - cepa originalmente obtida junto ao Instituto de Botânica (São Paulo) e catalogada sob o número CCIBT - 2347 (MOREIRA-NETO et al., 2013); c) *Ceriporiopsis subvermispota* - cepa originalmente obtida junto ao Forest Products Laboratory (Madison, WI, EUA) e catalogada sob o número SS-3 (AKHTAR et al., 1998). Todas as cepas foram mantidas a 4 ± 2 °C, sem iluminação, em tubos de ensaio com meio ágar - extrato de malte (2 % de extrato de malte, 0,2 % de extrato de levedura e 2 % de ágar) contendo um cavaco de madeira. Todo o processo de repicagem e inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Para a preparação dos inóculos, placas de Petri contendo o mesmo meio de manutenção foram inoculadas com pequenos fragmentos provenientes dos fungos de estoque e incubadas a 27 ± 2 °C. Após atingir o crescimento desejado (cobertura total da placa) foram extraídos 20 discos de 8 mm de diâmetro que foram inoculados

em frascos Erlenmeyers contendo 200 mL de meio composto por 2,4 % de caldo de batata e 0,7% de extrato de levedura. O cultivo estático foi de 15 dias a 27 ± 2 °C.

O micélio obtido dos cultivos descritos anteriormente foi filtrado em funil de Buchner estéril e lavado com água esterilizada. Em um liquidificador com copo de aço inox (estéril), 300 mL de água destilada foram misturados à massa miceliana obtida e macerados com 3 pulsos de 15 segundos (com intervalos de 45 segundos para evitar o aquecimento). Para calcular a quantidade de micélio na suspensão foi feita a determinação da massa seca de fungo presente numa alíquota dessa suspensão. Para determinar a massa seca, 25 mL da suspensão foi filtrada em papel filtro previamente seco e pesado. O material retido no filtro, juntamente com o papel foram secos, inicialmente a 60°C e posteriormente a 105°C, até atingir massa constante. Este procedimento foi realizado para cada fungo utilizado.

4.2 Ensaio de biodegradação de bagaço de cana em biorreator

O bagaço de cana de açúcar utilizado foi doado pela Usina Vale, da filial de Onda Verde, São Paulo, sendo proveniente da safra 2012/2013. O bagaço de cana foi seco ao ar e estocado em condições isentas de umidade.

Em um primeiro momento foi realizado um ensaio de biodegradação de bagaço de cana em biorreator de 20 L. Para isso, foram preparados sacos de polipropileno contendo 500 gramas de bagaço de cana (base seca) que foi previamente submerso em água por 16 horas para inchamento das fibras. Após isso, o excesso de água foi drenado e o material foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

O bagaço foi inoculado com 150 mL de suspensão de micélio de *P. ostreatus* ou *L. gilbertsonii* equivalente a uma carga de inóculo de 500 mg de micélio por quilograma de bagaço (ambos em base seca) e suplementação com milhocina na razão de 5 g de milhocina/kg (ambos em base seca). Em cada saco de polipropileno, o inóculo foi distribuído no bagaço de cana e então homogeneizado e transferido para os reatores até atingir o volume de 15 L no reator. Os reatores foram mantidos a

27 °C com vazão de ar filtrado através de membranas de 0,22 µm a um fluxo de 23 litros por hora. Cada cultivo foi conduzido em duplicata e a avaliação da biodegradação foi no período de 30 dias.

4.3 Ensaio de biodegradação de bagaço de cana em frascos Erlenmeyers de 2L

Devido a diversos problemas de contaminação e dificuldade na realização dos experimentos de biodegradação do bagaço em bioreator de 20L optou-se pela realização de cultivos em menor escala, em frascos Erlenmeyers de 2 L com 25 g de bagaço de cana inicial (seco).

Previamente aos experimentos de biodegradação, 25 g do material (base seca) contidos em Erlenmeyers de 2L foram mantidos imersos em cerca de 1 L de água destilada por 16h. O excesso de água foi drenado e o material resultante foi autoclavado a 121° C por 15 min. Duas etapas de autoclavagem foram realizadas com um intervalo de 24 horas entre elas. Este procedimento de duas autoclavagens visou eliminar eventuais esporos cuja dormência possa ter sido quebrada na primeira etapa.

O bagaço contido nos Erlenmeyers de 2L foi inoculado com uma suspensão de micélio equivalente a uma carga de inóculo de 500 mg de micélio por quilograma de bagaço (ambos em base seca) e suplementado com milhocina na razão de 5 g/kg (ambos em base seca). O cultivo foi mantido estático a 27 ± 2 ° C. Foram inoculados 12 frascos para cada tempo de biodegradação avaliado (todos os cultivos foram realizados simultaneamente). Os períodos de cultivos avaliados foram 7, 14, 30 e 60 dias.

O bagaço contido em três dos frascos amostrados para cada um dos períodos avaliados foi macerado em um liquidificador contendo 400 mL de água por 15 min. Após a maceração, os sólidos foram filtrados em funil de Buchner com uma malha sintética de 200 mesh. Os sólidos retidos foram secos ao ar e então pesados. Uma

alíquota foi utilizada para a determinação de umidade e as massas secas iniciais e finais foram empregadas para cálculo do rendimento do processo. O bagaço contido nos outros frascos amostrados num determinado período de cultivo foi submetido a etapas subsequentes de tratamentos químicos: a) peróxido de hidrogênio (2 %) e/ou b) hidróxido de sódio (5 %), conforme descrito no item 4.4.

4.4 Tratamento do bagaço de cana com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio

Nos frascos Erlenmeyers contendo cerca de vinte gramas de bagaço de cana biotratado (base seca), foi adicionado peróxido de hidrogênio equivalente a 2 g de H_2O_2 para cada 100 g de bagaço (base seca) e água destilada até um volume final de 400 mL de reação. A mistura foi ajustada para pH entre 3 e 4 e mantida a 40 °C sob agitação orbital de 120 rpm por 48 h. Após a reação com peróxido de hidrogênio, a mistura recebeu a adição de NaOH na proporção de 5 g de NaOH para cada 100 g de bagaço (base seca). A extração alcalina foi feita em autoclave, a 121 °C por 2 h. As amostras foram então refinadas em liquidificador por 15 min (conforme descrito no item 4.3). Os sólidos residuais foram secos ao ar e pesados. Uma alíquota foi usada para a determinação de umidade e as massas secas iniciais e finais foram usadas para o cálculo do rendimento do processo [(P_a)E].

Nas amostras biotratadas por 14 e 30 dias de cultivo foi avaliada também a aplicação de cada reagente descrito anteriormente em etapas não simultâneas:

- Peróxido de hidrogênio [(P_a)]: Após o tratamento com H_2O_2 , os sólidos residuais foram refinados em liquidificador sem a etapa de extração alcalina;
- Extração com hidróxido de sódio (E): A primeira etapa de tratamento foi conduzida com água substituindo a solução de peróxido de hidrogênio e então a extração alcalina procedeu conforme descrito anteriormente.

Amostras de bagaço de cana do mesmo lote de partida também foram processadas de maneira idêntica aos procedimentos descritos anteriormente, porém não foram previamente inoculadas com fungo. Estas amostras serviram como material de controle para os processos avaliados e receberam a seguinte denominação:

- a) Controle autoclavado;
- b) Controle autoclavado + [(P_a)E];
- c) Controle autoclavado + (P_a);
- d) Controle autoclavado + E.

Todos os experimentos descritos neste item foram realizados em triplicata.

4.5 Tratamento sulfito alcalino do bagaço de cana

Em frascos Erlenmeyers de 2L contendo cerca de vinte gramas de bagaço de cana biotratado (base seca), foi adicionada uma solução contendo 2,5 g de NaOH para cada 100 g de bagaço (base seca) e 5 g de Na₂SO₃ para cada 100 g bagaço (base seca) em água destilada até um volume final de 400 mL de reação. A reação foi feita em autoclave, a 121 °C por 2 h. As amostras foram então refinadas em liquidificador por 15 min e posteriormente filtradas em funil de Buchner. Os sólidos residuais foram secos ao ar e pesados. Uma alíquota foi usada para a determinação de umidade e as massas secas iniciais e finais foram usadas para o cálculo do rendimento do processo.

Como mencionado no item 4.4 para o tratamento com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, foi também processada uma amostra de bagaço autoclavado sem inoculação pelo tratamento sulfito alcalino, servindo de controle para os processos avaliados e recebeu a seguinte denominação: controle autoclavado sulfito alcalino.

4.6 Determinação da composição química do bagaço de cana.

A remoção de extrativos foi feita com materiais moídos (moinho de facas com malha de 20 mesh) em Soxhlet com etanol 95% por 6 h. O teor foi determinado por gravimetria, sendo a diferença de massa antes e depois da extração em relação à massa inicial ($M_i - M_f / M_i \times 100$) (FERRAZ et al., 2000).

O teor de componentes (glucanas, xilana, arabinosil, acetil e lignina,) foi determinado a partir da hidrólise ácida do material com H_2SO_4 72 % (FERRAZ et al., 2000). Cerca de 300 mg de amostra (base seca) foram tratados com 3 mL de H_2SO_4 72 % (p/p) por uma hora a 30 °C. Em seguida, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 79 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121 °C por 60 min, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3, previamente secos a 105 °C e pesados. O material retido corresponde à lignina insolúvel em ácido. O filtrado foi avolumado a 200 ml e analisado quanto aos teores de açúcares através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna BIORAD HPX-87H, a 45°C e como eluente uma solução de H_2SO_4 5 mM a 0,6 mL/min em um detector de índice de refração (Waters). A concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibrações preparadas com padrões de grau analítico, secos sob sílica e vácuo.

O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura em 205 nm de uma diluição (usualmente 2:10) do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absorvidade de 105 L/g.cm neste comprimento de onda.

4.7 Hidrólise enzimática do bagaço de cana

As reações de hidrólise enzimática foram feitas em tubos tipo Falcon de 50 mL, com volume final de 10 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, contendo 0,01% de azida sódica e consistência de 2%. As amostras foram hidrolisadas com 10 FPU celulasas/g de substrato (Celluclast-Sigma) e 20 UI de β -glicosidase/g de substrato (Novozym 188).

Os frascos foram acondicionados inclinados a 45 ° em banho sob agitação orbital de 120 rpm e temperatura de 45 °C por 72 horas. Em intervalos de tempo de reação definidos em 4, 8, 24, 48 e 72 horas foram retiradas alíquotas de 0,15mL de toda a suspensão. Para a amostragem se empregou uma micropipeta de 1 mL usando uma ponteira com a ponta cortada a fim de amostrar sólidos e líquido homogeneamente. A amostra foi então aquecida em banho de água em ebulição por 5 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 min e o sobrenadante foi diluído e analisado em CLAE para detecção de açúcares com a mesma metodologia descrita no item 4.5.

4.7.1 Eficiência de hidrólise na conversão dos polissacarídeos

Para avaliação da eficiência de hidrólise, foi estimada a conversão enzimática da glucanas (CEG), utilizando-se as concentrações de glicose obtidas após a hidrólise, de acordo com a Equação 1. A conversão enzimática de xilana (CEX) foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{CEG} = \frac{\text{g glicose} \times 0,9}{\text{g de glucanas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{CEX} = \frac{\text{g xilose} \times 0,88}{\text{g de xilana}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.7.2. Balanço massa completo para os processos integrados de preparação de glicose e xilose

Para determinar se os rendimentos da aplicação dos tratamentos sequenciais sobre o bagaço autoclavado aliados ao eventual aumento de digestibilidade foram favoráveis ou não para a preparação de glicose e xilose a partir do bagaço de cana, foi empregado um cálculo de balanço de massa completo para a glicose potencialmente obtida a partir de 100 g de bagaço autoclavado.

No cálculo de glicose potencial (Gp) e xilose potencial (Xp) foi levado em consideração a quantidade residual dos polímeros (glucanas ou xilana) no material, corrigindo esse valor com a respectiva constante de hidrólise (0,9 para glicose e 0,88 para xilose) e esse valor multiplicado pela eficiência de conversão enzimática encontrado para cada material. Então:

$$Gp = \frac{\text{celulose residual}}{0,9} \times \text{conversão de glucanas}$$

$$Xp = \frac{\text{xilana residual}}{0,88} \times \text{conversão de xilana}$$

Esse valor foi utilizado como parâmetro na avaliação do biotratamento e da utilização de etapas adicionais químicas em relação ao bagaço de cana controle e ao máximo teórico do bagaço autoclavado, ou seja, se todo polissacarídeo fosse convertido ao seu respectivo monômero (conversão de 100 %).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biodegradação de bagaço de cana em biorreatores de 20L, características do substrato de origem industrial e sua composição química

O bagaço de cana empregado nos estudos de biodegradação e subsequente hidrólise enzimática foi procedente de uma empresa de açúcar e álcool que processa uma grande diversidade de cultivares de cana, sendo que a amostra utilizada foi coletada ainda úmida, transportada até a Escola de Engenharia de Lorena e seca ao ar para a eliminação de umidade excessiva. Esta amostra foi empregada como substrato em uma série de experimentos iniciais que envolviam a biodegradação pelos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Laetiporus gilbertsonii*.

Estes estudos iniciais foram realizados empregando bagaço de cana autoclavado a 121 °C/15 min contidos em sacos de polipropileno e então transferidos para biorreatores autoclavados de 20 L (Figura 8). O acompanhamento visual destes cultivos por 30 dias mostrou um elevado nível de contaminação dos biorreatores, conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9. Em alguns casos houve maior predominância do basidiomiceto de interesse, mas a presença de fungos contaminantes foi sempre detectada. A contaminação dos cultivos em questão pode ter sido decorrente da presença natural de muitos esporos de fungos nesse resíduo agrícola ou ainda devido às várias etapas de manipulação empregadas na preparação dos cultivos (autoclavagem em sacos de polipropileno, transferência para os biorreatores, inoculação com suspensão de micélio de basidiomiceto e adição de milhocina).

Figura 8 - Aspectos macroscópicos dos reatores selecionados após 30 dias de cultivo. *P. ostreatus*: reator A (a) e reator B (b). *L. gilbertsonii*: reator C (c) e reator D (d).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 - Aspecto macroscópico mais aproximado da colonização da superfície do bagaço de cana (a) reator A. (b) Reator B.

Fonte: Arquivo pessoal

Em função dos resultados obtidos nestes experimentos iniciais, optou-se por alterar o sistema de cultivo, incluindo duas etapas iniciais de autoclavagem a 121 °C/15 min, bem como a condução dos cultivos em frascos Erlenmeyer de 2L, minimizando as etapas de manipulação no procedimento de autoclavagem e inoculação.

Para todos os experimentos realizados subsequentemente, o bagaço foi homogeneizado após a etapa de biotratamento empregando um processo de desfibramento em liquidificador (25 g de bagaço, 400 mL de água por 15 min). As duas etapas de autoclavagem e a homogeneização em liquidificador foram reproduzidas em uma amostra de bagaço que não passou pelo processo de inoculação e biodegradação, servindo assim como o substrato controle para todos os experimentos. Estas etapas de processamento proporcionaram uma perda de massa de $6,3 \pm 0,6$ %. As composições químicas do bagaço não tratado e do bagaço controle mencionados anteriormente estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química, rendimento e balanço de massas dos componentes presentes nas amostras do bagaço de cana *in natura* e do bagaço autoclavado.

	Componente	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço autoclavado
Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)	Glucanas	39,5 $\pm$ 0,1	40,5 $\pm$ 0,4
	Xilana	20,9 $\pm$ 0,3	21,9 $\pm$ 0,2
	Arabinosil	2,1 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,1
	Acetil	3,3 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,4
	Lignina	22,3 $\pm$ 0,4	20,7 $\pm$ 0,8
	Extrativos	3,5 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,1
	Rendimento	100	93,7
Balanço de massa dos componentes (g/100 g bagaço <i>in natura</i>)	Glucanas	39,5	38,0
	Xilana	20,9	20,6
	Arabinosil	2,1	1,6
	Acetil	3,3	2,9
	Lignina	22,3	19,4
	Extrativos	3,5	3,2

Pode-se notar que a perda de massa de 6,3 % não foi seguida de alteração expressiva na composição química do bagaço *in natura*, indicando que não houve solubilização seletiva de algum dos componentes majoritários. O balanço de massas de componentes indicou que os procedimentos de autoclavagem e

desfibramento/lavagem proporcionaram uma solubilização de 9% de extrativos e de 13% de lignina. A solubilização de polissacarídeos foi de 4% para as glucanas e 5% para a hemicelulose. A maior solubilização de extrativos pode ser devida a presença de extrativos solúveis em água, enquanto que a solubilização de parte da lignina poderia ser explicada pela presença de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço que seriam passíveis de hidrólise em meio aquoso sob temperaturas elevadas. Esta suposição está baseada em dados prévios que mostram que parte da lignina detectada em bagaço de cana se deve, efetivamente, aos ácidos hidroxicinâmicos (MASARIN et al., 2011).

A perda de 6,3 % de massa observada no experimento controle foi subtraída de todos os dados de perda de massa detectados após as etapas de biotratamento e lavagem oxidativa que são descritas na sequência desta dissertação. Desta forma, o bagaço autoclavado foi considerado como o substrato controle de todos os experimentos e os dados mostrados na dissertação foram normalizados a fim de indicar o bagaço controle correspondendo a 100% da massa inicial de substrato.

5.2 Biotratamento de bagaço de cana em Erlenmeyers de 2L

Ao contrário do observado nos cultivos em biorreator, os cultivos realizados sobre bagaço contido em Erlenmeyers de 2 L e submetido a duas etapas de autoclavagem, se mostraram livres de contaminantes em todos os casos avaliados. Foram conduzidos experimentos com 3 espécies fúngicas, representando grupos distintos dentro da classe Basidiomycetes, que incluem os fungos de decomposição parda (*Laetiporus gilbertsonii*), os fungos de decomposição branca (*Pleurotus ostreatus*) e o fungo de decomposição branca que é seletivo para a degradação de lignina (*Ceriporiopsis subvermispora*) (FERRAZ et al., 2008). A ausência de contaminantes nestes cultivos reflete uma maior eficácia das duas etapas de autoclavagem, bem como da menor manipulação do bagaço durante a inoculação.

Todos os cultivos foram avaliados quanto à perda de massa e de componentes ocorridas durante 60 dias de biodegradação. Os materiais biotratados serviram então de substrato para a hidrólise direta por celulasas comerciais, bem como foram submetidos a um processo de oxidação com peróxido de hidrogênio e extração alcalina, visando diminuir ainda mais a recalcitrância do bagaço de cana.

5.2.1 Biodegradação com *Laetiporus gilbertsonii*

Os cultivos com o fungo *L. gilbertsonii* mostraram um baixo crescimento do fungo sobre o bagaço de cana, sendo que micélio fúngico visualmente notório sobre o bagaço foi observado somente após 30 dias de cultivo. Entre 30 e 60 dias de cultivo houve progressão da colonização superficial do bagaço por micélio, mas entre as 3 espécies fúngicas estudadas, *L. gilbertsonii* foi aquela que apresentou uma menor quantidade de micélio visível sobre o bagaço. Os dados de composição química e balanço de massas de componentes obtidos a partir dos cultivos de *L. gilbertsonii* sobre o bagaço de cana estão mostrados na Tabela 2.

O rendimento de sólidos residuais após o biotratamento reflete a extensão da degradação provocada pelo fungo. De fato, a perda de massa causada pelo processo biodegradativo corresponde ao valor de 100% menos o rendimento indicado na Tabela 3, para cada um dos períodos de biodegradação avaliados. Nos cultivos de *L. gilbertsonii*, a perda de massa de bagaço foi de 5% após 14 dias de biodegradação, atingindo 12% em 60 dias. Esses baixos níveis de perda de massa são frequentemente descritos para fungos com padrão de degradação parda (ARANTES; GOODELL, 2014).

Tabela 2 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado e biotratado por *L. gilbertsonii* antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(P_a)E]. R (%) = rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(Pa)E], R (%) = rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de Massa dos Componentes (g/100 g bagaço autoclavado)					
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Bagaço Controle													
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4
(Pa)E	47,5 ±0,3	22,7 ±0,1	1,8 ±0,1	0,4 ±0,1	18,3 ±0,8	4,0 ±0,1	82,5	39,2	18,7	1,5	0,3	15,1	3,3
Bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i>													
7 dias	42,7 ±0,2	22,4 ±0,1	1,7 ±0,1	3,7 ±0,1	20,9 ±0,6	1,6 ±0,1	94,8	40,5	21,2	1,6	3,5	19,9	1,5
14 dias	42,8 ±0,2	22,6 ±0,1	1,5 ±0,1	3,5 ±0,4	20,6 ±0,5	2,5 ±0,1	94,9	40,7	21,4	1,5	3,3	19,6	2,4
30 dias	40,4 ±1,0	21,2 ±0,6	1,6 ±0,1	3,1 ±0,2	22,1 ±0,6	3,9 ±0,1	90,4	36,6	19,2	1,5	2,8	20,0	3,6
60 dias	41,4±0,5	21,3 ±0,3	1,3 ±0,1	3,1 ±0,3	22,1 ±0,7	2,2 ±0,1	88,9	36,8	18,9	1,2	2,8	19,7	2,0
Bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio e subsequente extração alcalina													
7 dias	46,1 ±0,6	22,9 ±0,3	1,8 ±0,1	0,5 ±0,3	18,0 ±0,4	2,8 ±0,3	83,8	38,6	19,2	1,5	0,4	15,1	2,3
14 dias	43,2 ±1,7	21,7 ±0,5	1,8 ±0,1	0,8 ±0,1	18,0 ±0,3	1,7 ±0,1	82,8	35,8	17,9	1,5	0,6	14,9	1,4
30 dias	41,9 ±1,2	20,9 ±0,5	1,6 ±0,1	1,5 ±0,6	19,9 ±0,2	4,5 ±0,1	83,4	35,0	17,4	1,4	1,3	16,6	3,8
60 dias	44,6 ±1,3	21,6 ±0,5	1,6 ±0,1	0,6 ±0,1	22,0 ±0,9	2,5 ±0,5	79,8	35,6	17,2	1,3	0,5	17,6	2,0

O balanço de massas dos componentes ao longo da biodegradação aponta para uma degradação progressiva de glucanas (predominantemente celulose) e hemicelulose, enquanto houve uma pequena remoção de lignina no início da biodegradação, sem aumento progressivo ao longo do tempo de cultivo. Este padrão degradativo é característico da ação de fungos de decomposição parda (ZABEL; MORRELL, 1992)

Sobre os bagaços biotratados foi aplicada uma etapa de oxidação com peróxido de hidrogênio, que foi concebida com o objetivo de fomentar, num primeiro momento, o sistema oxidativo de Fenton observado nos fungos de degradação parda (ARANTES; MILAGRES, 2009; KERSTEN; CULLEN, 2014; RILEY et al., 2014). Após essa etapa de oxidação com peróxido de hidrogênio em condições brandas, a suspensão foi aquecida a 120 °C em meio alcalino a fim de maximizar a solubilização de fragmentos de lignina eventualmente oxidados na etapa anterior [tratamento denominado como (P_a)E].

O tratamento [(P_a)E] aplicado às amostras de bagaço biotratado com *L. gilbertsonii* levou a um pequeno aumento no teor de glucanas dos bagaços biotratados (especialmente nas amostras tratadas por 7 e 60 dias), porém o balanço de massas desse componente aponta para uma perda adicional de glucana, além daquela já causada pela ação do fungo. A lignina e a hemicelulose foram removidas em pequena extensão, porém a alteração foi limitada ao já observado com a amostra controle, não havendo alterações expressivas quando se compara o tratamento aplicado às amostras biotratadas por *L. gilbertsonii* (Tabela 2).

5.2.1.1 Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por *L. gilbertsonii*

Os sólidos residuais da etapa de biotratamento com ou sem a etapa subsequente P_aE foram empregados como substratos para um processo de hidrólise com celulasas comerciais. A hidrólise enzimática direta dos materiais biotratados foi avaliada para verificar se as alterações induzidas pela ação fúngica afetariam a digestibilidade do bagaço de cana (Figura 10).

Figura 10 - Cinética da hidrólise enzimática de glucana (A) e da xilana (B) do bagaço controle (autoclavado) e dos bagaços tratados por *L. gilbertsonii*. Bagaço controle (♦), bagaço biotratado: 7 dias (◇), 14 dias (△), 30 dias (○) e 60 dias (□).

Fonte: Arquivo pessoal

A conversão de glucana contida nos materiais biotratados por *L. gilbertsonii* foi levemente menor do que a observada na amostra controle, independentemente do tempo de biotratamento empregado, indicando que o bagaço de cana se tornou mais recalcitrante ou respondeu de forma inalterada à ação das enzimas devido ao biotratamento prévio com esta espécie fúngica. Esse resultado se mostra contrário ao observado na digestibilidade de madeiras moles biotratadas por *Gloeophyllum trabeum* (um fungo de decomposição parda) no trabalho de Schilling, Tewalt e Duncan (2009), que observaram uma hidrólise de

cerca de 2 a 3 vezes maior em madeiras moles biotratadas por *G. trabeum* do que em nas madeiras sem tratamento.

Foi ainda avaliada a digestão enzimática do bagaço biotratado submetido a uma etapa posterior de oxidação e extração alcalina. A influência da aplicação da etapa P_aE sobre o bagaço de cana biotratado pelo fungo foi avaliada utilizando o tempo fixo de 48 h de hidrólise enzimática e pode ser vista na Figura 11.

Figura 11 - Digestibilidade de glucanas (A) e da xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por *L. gilbertsonii*, antes e após aplicação do tratamento com peróxido de hidrogênio e extração alcalina [(P_a)E], em 48 h de hidrólise enzimática. As colunas claras indicam as amostras antes do tratamento (P_a)E e as colunas escuras indicam as amostras tratadas pelo processo (P_a)E.

Fonte: Arquivo pessoal

A aplicação do tratamento (P_a)E aumentou a digestibilidade do bagaço controle (cerca de 2,2 vezes para a glucana e 4 vezes para a xilana). Entretanto, esse aumento de digestibilidade foi levemente inferior nas amostras biotratadas por *L. gilbertsonii* (máximo de 46 e 44 % de conversão de glucanas e xilana, respectivamente, comparado com 52 % de conversão de ambos polímeros observada no controle autoclavado + P_aE).

Considerando que a etapa (P_a)E aumentou significativamente a digestibilidade da amostra controle, bem como das amostras biotratadas, foram realizados alguns experimentos adicionais a fim de avaliar a influência de cada uma destas etapas separadamente sobre a recalcitrância do material resultante.

No caso das amostras biotratadas por *L. gilbertsonii*, foram selecionadas aquelas degradadas por 14 e 30 dias.

No caso da etapa (Pa), ao final das 48 horas de tratamento químico, o material foi refinado e submetido à digestão com celulasas. No caso da avaliação da extração alcalina aplicada isoladamente, a etapa de tratamento com peróxido foi substituída pela imersão do bagaço em água por 48 horas e o material resultante foi submetido à extração alcalina nas mesmas condições anteriormente descritas. Os dados de composição química das amostras geradas, bem como os respectivos balanços de massa são mostrados na Tabela 3.

A aplicação da etapa (Pa) sobre o bagaço de cana original não causou alterações expressivas na composição química do material. O elevado rendimento de sólidos após o tratamento (95,4%) mostra que houve uma solubilização mínima de biomassa e nenhum dos componentes foi seletivamente removido. Por outro lado, a etapa de extração alcalina causou um aumento no teor de glucanas e hemicelulose e uma diminuição simultânea no teor de lignina e grupos acetila. Como o rendimento de sólidos (84,0%) foi menor do que aquele observado na etapa (Pa), o balanço de massas indica que a remoção de lignina e grupos acetila foi expressiva e que os polissacarídeos foram pouco afetados pelo tratamento alcalino em questão. Nas amostras biotratadas por *L. gilbertsonii*, os dados indicam que as etapas (Pa) e extração alcalina aplicadas individualmente, geraram dados que não diferem daqueles já observados com os respectivos controles autoclavados.

Tabela 3 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado ou biotratado por *L. gilbertsonii* antes e após a aplicação do tratamento oxidativo [(P_a)] ou extração alcalina (E). R (%) = rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de Massa dos Componentes (g/100 g bagaço original)					
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Lignina		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Bagaço Controle													
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4
(Pa)	41,7 ±0,4	21,3 ±0,2	1,7 ±0,1	3,5 ±0,3	21,6 ±0,1	3,4 ±0,3	95,4	39,7	20,3	1,6	3,3	20,7	3,2
E	48,5 ±1,3	24,4 ±0,4	2,2 ±0,1	0,5 ±0,1	16,6 ±0,1	2,8 ±0,2	84,0	40,8	20,5	1,9	0,4	13,9	2,3
Bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> (reproduzido da Tabela 3)													
14 dias	42,8 ±0,2	22,6 ±0,1	1,5 ±0,1	3,5 ±0,4	20,6 ±0,5	2,5 ±0,1	94,9	40,7	21,4	1,5	3,3	19,6	2,4
30 dias	40,4 ±1,0	21,2 ±0,6	1,6 ±0,1	3,1 ±0,2	22,1 ±0,6	3,9 ±0,1	90,4	36,6	19,2	1,5	2,8	20,0	3,6
Bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio													
14 dias	41,6 ±1,7	21,6 ±0,8	1,6 ±0,1	3,3 ±0,2	21,2 ±0,9	1,8 ±0,2	93,1	38,7	20,1	1,5	3,1	19,8	1,7
30 dias	41,5 ±1,5	21,2 ±0,6	1,6 ±0,1	3,2 ±0,2	22,3 ±0,1	2,6 ±0,4	95,5	39,7	20,2	1,5	3,0	21,3	2,5
Bagaço biotratado por <i>L. gilbertsonii</i> submetido à extração alcalina													
14 dias	46,7 ±0,6	24,5±1,0	2,5 ±0,3	1,2 ±0,1	18,4 ±0,2	2,9 ±0,1	84,1	39,3	20,6	2,1	1,0	15,5	2,5
30 dias	46,4 ±1,1	22,1 ±0,5	1,8 ±0,1	0,7 ±0,1	19,8 ±1,1	2,5 ±0,2	81,7	37,9	18,0	1,5	0,5	16,2	2,1

O resultado da aplicação, em separado, dos tratamentos químicos sobre a digestibilidade do material pode ser observado na Figura 12, que traz a conversão das glucanas e da xilana residual após 48 h de hidrólise enzimática.

Figura 12 - Digestibilidade após 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana autoclavado ou biotratado por *L. gilberstonii* antes e após aplicação dos tratamentos com peróxido de hidrogênio (P_a) ou extração alcalina (E). Bagaço autoclavado ou biotratado ($\square$), bagaço + P_a ($\boxtimes$), bagaço + E ($\boxplus$).

Fonte: Arquivo pessoal

A aplicação de peróxido de hidrogênio seguiu uma tendência para todos os materiais que foi a de reduzir, levemente a conversão dos polissacarídeos em relação aos materiais originais, se mostrando mais pronunciado na conversão das glucanas (Figura 12A) do material original e biotratado por 30 dias, sendo este último o mais afetado pela aplicação de peróxido.

Assim como na alteração da composição química, a extração alcalina foi a maior responsável pelo ganho de digestibilidade do bagaço de cana, sendo que a conversão de glucanas atingiu 52% no controle autoclavado. Quando a extração alcalina foi aplicada sobre os bagaços biotratados foi observado um aumento similar na conversão dos polissacarídeos residuais. No entanto, quanto maior o tempo de biotratamento, menor foi o ganho na conversão devido à extração alcalina.

5.2.2 Biotratamento do bagaço de cana por *Pleurotus ostreatus*

Os cultivos de *P. ostreatus* apresentaram pouco micélio fúngico sobre o bagaço de cana (micélio superficial observado somente após 30 dias de cultivo) e baixa extensão de colonização do substrato. A Tabela 4 mostra a composição química e o balanço de massas dos componentes para o bagaço biotratado.

O balanço de massas dos componentes mostra que *P. ostreatus* mostrou o padrão característico de biodegradação branca não seletiva. Os três componentes foram removidos progressiva e simultaneamente ao longo dos 60 dias de cultivo. As perdas máximas de componentes foram baixas e mostram uma pequena resistência da celulose neste período de cultivo, já que a perda deste componente atingiu 8% do valor inicial aos 60 dias de cultivo, contra 18% de perda de hemicelulose e 11% de perda de lignina. Padrão semelhante também foi observado por Adamovic et al., (1998), que no estudo da biodegradação de palha de trigo por *P. ostreatus* observou maior degradação de hemicelulose do que de celulose e lignina.

A etapa de oxidação com peróxido de hidrogênio aplicada sobre o material biotratado deveria atuar de forma diferente do que se preconizou para as amostras biotratadas com *L. gilberstonii*. No caso de *P. ostreatus*, o objetivo foi fomentar, num primeiro momento, a ação de peroxidases produzidas pelo fungo que ainda estariam presentes no material biotratado (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Após uma etapa de oxidação em condições brandas e compatíveis com a ação das peroxidases, a suspensão foi aquecida a 120 °C em meio alcalino a fim de maximizar a solubilização de fragmentos de lignina eventualmente oxidados na etapa anterior. A lógica de processo foi similar àquela empregada em processos de biobranqueamento de polpas celulósicas onde uma etapa enzimática oxidativa é seguida de uma extração alcalina a quente (KONDO; KURASHIKI; SAKAI, 1994). Os resultados da aplicação das etapas (Pa)E sobre o teor de componentes do bagaço biotratado por *P. ostreatus* está detalhado na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado e biotratado por *P. ostreatus*, antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(P_a)E]. R (%) = rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de Massa dos Componentes (g/100 g bagaço original)					
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Bagaço Controle													
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4
(P _a)E	47,5 ±0,3	22,7 ±0,1	1,8 ±0,1	0,4 ±0,1	18,3 ±0,8	4,0 ±0,1	82,5	39,2	18,7	1,5	0,3	15,1	3,3
Bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i>													
7 dias	42,1 ±0,6	23,1 ±0,3	2,0 ±0,1	3,2 ±0,2	21,0 ±0,7	3,0 ±0,1	93,13	39,2	21,5	1,9	3,0	19,6	2,8
14 dias	42,7 ±0,9	23,4 ±0,5	2,1 ±0,1	3,5 ±0,3	20,4 ±1,2	4,1 ±0,1	90,48	38,6	21,2	1,9	3,2	18,5	3,7
30 dias	43,3 ±0,6	22,2 ±0,1	1,9 ±0,1	3,4±0,1	20,5 ±1,1	4,0 ±0,1	88,97	38,5	19,8	1,7	3,0	18,3	3,5
60 dias	42,2 ±1,8	20,8 ±0,6	1,5 ±0,1	3,2 ±0,1	20,9 ±0,4	1,8 ±0,3	87,92	37,1	18,3	1,3	2,9	18,4	1,6
Bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i> submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio e subsequente extração alcalina													
7 dias	48,4 ±0,2	24,3 ±0,1	2,2 ±0,1	0,7 ±0,1	16,5 ±0,4	2,8 ±0,3	82,43	39,9	20,0	1,8	0,6	13,6	2,3
14 dias	49,6 ±0,4	24,7 ±0,1	2,1 ±0,1	0,7 ±0,1	17,6 ±0,5	1,5 ±0,1	80,83	40,1	19,9	1,7	0,6	14,2	1,3
30 dias	47,4 ±0,7	22,4 ±0,4	2,1 ±0,4	0,8 ±0,1	17,4 ±0,5	3,1 ±0,1	77,12	36,6	17,3	1,6	0,6	13,4	2,4
60 dias	45,9 ±1,0	20,8 ±0,4	1,6 ±0,1	0,9 ±0,2	17,6 ±0,2	2,3 ±0,2	77,94	35,8	16,2	1,3	0,7	13,7	1,8

O tratamento P_aE aplicado às amostras de bagaço biotratado por *P. ostreatus* levou a um aumento no teor de glucanas dos bagaços biotratados (principalmente nas amostras biotratadas por 7 e 14 dias). O balanço de massas desse componente nesses materiais não aponta para perda adicional de glucana, além daquela causada pela ação do fungo. Já os materiais biotratados por 30 e 60 dias apresentaram uma diminuição na massa de glucanas.

O teor de hemicelulose dos materiais se manteve constante após a aplicação do tratamento químico e o balanço de massa mostra que a remoção de xilana foi semelhante em todos os substratos biotratados. Todos os materiais biotratados que passaram pelo tratamento químico apresentaram teores semelhantes de lignina e, pelo balanço de massas, nota-se que também apresentaram quantidades residuais de lignina semelhantes entre si e todos menores do que o observado para o bagaço controle que passou pelo mesmo tratamento.

5.2.2.1 Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por *P. ostreatus*

Os sólidos residuais da etapa de biotratamento foram empregados como substratos para um processo de hidrólise com celulasas comerciais. O material biotratado foi empregado em experimentos de hidrólise direta ou por hidrólise do material biotratado submetido a etapas posteriores de tratamento químico. Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que a hidrólise enzimática direta dos bagaços tratados por *P.ostreatus* foi superior àquela observada no bagaço de cana autoclavado apenas a partir de 30 dias de biotratamento, sendo até então mais ou tão recalcitrante quanto o controle. Quanto maior o tempo de tratamento, maior foi a conversão encontrada para os polissacarídeos residuais. Essa melhora na conversão dos polissacarídeos residuais coincide com o início da degradação mais expressiva da xilana causada pelo fungo, demonstrando que a deslignificação do material não é o único desafio a ser superado para um eficiente aproveitamento da fração celulósica do material.

Figura 13. Cinética da hidrólise enzimática da glucana (A) e da xilana (B) do bagaço controle in natura e dos bagaços tratados por *P. ostreatus*. Bagaço controle (♦), bagaço biotratado: 7 dias (◇), 14 dias (△), 30 dias (○) e 60 dias (□)

Fonte: Arquivo pessoal

Para avaliar a influência da combinação do tratamento químico com o bagaço de cana biotratado pelo fungo foi utilizado o tempo fixo de 48 h de hidrólise enzimática. A aplicação do tratamento químico aumentou a digestibilidade do bagaço original (cerca de 2,2 vezes para a glucanas e 4 vezes para a xilana) assim como a do material biotratado (Figura 14).

Figura 14 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e da xilana (B) residual dos bagaços de cana autoclavado e biotratado por *P. ostreatus* antes e depois da aplicação do tratamento peróxido e extração alcalina [(P_a)E]. As colunas claras indicam as amostras antes do tratamento (P_a)E. As colunas escuras indicam as amostras tratadas pelo processo.

Fonte: Arquivo pessoal

A conversão da glucanas remanescente no material após a aplicação desse tratamento químico sobre os substratos biotratados foi semelhante à encontrada para o controle (P_a)E. É possível observar ainda que quanto maior o tempo de biotratamento, menor foi a contribuição do tratamento químico no aumento da digestibilidade do bagaço residual (Figura 14A). A hidrólise de xilana (Figura 14B) seguiu um padrão diferente do observado para a hidrólise das glucanas, pois quando aplicado o tratamento químico houve uma diminuição na conversão do polímero quanto maior o tempo de biotratamento do substrato. Isso se deve estar relacionado a uma maior remoção do polímero pela aplicação do tratamento químico (Tabela 5).

Para avaliar a influência de cada etapa do tratamento químico sobre o bagaço de cana biotratado por *P. ostreatus*, cada uma das etapas foi avaliada independentemente. Para isso se empregou as amostras biotratadas 14 e 30 dias (Tabela 5)

Tabela 5 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços autoclavado ou biotratado por *P. ostreatus* antes e depois da aplicação do tratamento oxidativo [(Pa)] ou extração alcalina (E). R (%) = Rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Depois da aplicação do tratamento oxidativo (1.a) ou extração alcalina (2.a), R (%) = Rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.														
Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de massa dos componentes (g/100 g bagaço autoclavado)						
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos	
Bagaço Controle														
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4	
(Pa)	41,7 ±0,4	21,3 ±0,2	1,7 ±0,1	3,5 ±0,3	21,6 ±0,1	3,4 ±0,3	95,4	39,7	20,3	1,6	3,3	20,7	3,2	
E	48,5 ±1,3	24,4 ±0,4	2,2 ±0,1	0,5 ±0,1	16,6 ±0,1	2,8 ±0,2	84,0	40,8	20,5	1,9	0,4	13,9	2,3	
Bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i> (reproduzido da Tabela 5)														
14 dias	42,7 ±0,9	23,4 ±0,5	2,1 ±0,1	3,5 ±0,3	20,4 ±1,2	4,1 ±0,1	90,48	38,6	21,2	1,9	3,2	18,5	3,7	
30 dias	43,3 ±0,6	22,2 ±0,1	1,9 ±0,1	3,4 ±0,1	20,5 ±1,1	4,0 ±0,1	88,97	38,5	19,8	1,7	3,0	18,3	3,5	
Bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i> submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio														
14 dias	43,6 ±0,4	22,9 ±0,3	1,9 ±0,1	3,5 ±0,1	20,5 ±0,1	2,0 ±0,1	91,30	39,8	20,9	1,7	3,2	18,7	1,8	
30 dias	41,5 ±0,3	20,1 ±0,4	1,8 ±0,1	3,1 ±0,1	21,8 ±0,8	3,5 ±0,2	89,44	37,1	18,7	1,6	2,8	19,5	3,1	
Bagaço biotratado por <i>P. ostreatus</i> submetido à extração alcalina														
14 dias	49,1 ±1,1	22,6 ±1,1	2,2 ±0,3	0,9 ±0,1	17,1 ±0,7	3,3 ±0,2	79,86	39,2	18,0	1,8	0,7	13,7	2,6	
30 dias	48,6 ±0,7	22,7 ±0,3	1,9 ±0,1	1,2 ±0,4	17,1 ±0,4	4,9 ±0,3	79,28	38,5	18,0	1,5	0,9	13,5	3,9	

A influência do peróxido de hidrogênio sobre o material biotratado foi mais pronunciada sobre a degradação da lignina. É possível notar que enquanto o peróxido de hidrogênio não removeu lignina quando aplicado sobre o bagaço autoclavado, ocorreu uma pequena remoção desse componente no bagaço de 14 dias e uma maior no de 30 (7 %). Quando aplicada apenas a etapa de extração alcalina (E), a remoção de glucanas no bagaço biotratado por 14 dias foi maior do que a encontrada no controle e quase zero no bagaço de 30 dias.

A remoção de hemicelulose foi superior sobre os bagaços biotratados do que quando a etapa química foi aplicada sobre o bagaço controle. Além disso, a extração alcalina removeu mais lignina quando foi aplicada sobre o bagaço controle (32,5 %) do que quando aplicada sobre o bagaço biotratado por 14 e 30 dias (26 %) por *P. ostreatus*. O resultado da aplicação em separado dos tratamentos sobre a digestibilidade do material pode ser observado na Figura 15, que traz a conversão das glucanas e da xilana residual após um tempo de hidrólise enzimática de 48 h.

Figura 15 - Digestibilidade de glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana autoclavado e biotratado por *P.ostreatus*, antes e após a aplicação dos tratamentos peróxido (P_a) ou alcalino (E) em 48 h de hidrólise enzimática. Bagaço autoclavado ou Biotratado (□), Bagaço+P_a (▨), Bagaço+E (▩).

Fonte: Arquivo pessoal

A aplicação da extração alcalina (E) sobre o bagaço de cana biotratado apresentou o mesmo padrão de quando aliado à uma etapa prévia de tratamento com peróxido de hidrogênio, aumentando a digestibilidade do material. Porém, foi observado que quando foi utilizado em conjunto [(P_a)E] sobre os substratos biotratados, os valores de conversão dos polissacarídeos foram maiores do que quando apenas utilizado o tratamento alcalino. Essa diferença foi mais expressiva para o uso do bagaço biotratado por 14 dias com a extração alcalina (E), situação na qual a hidrólise das glucanas foi cerca de 10 % menor do que a observada para o tratamento em conjunto [(P_a)E]. Essa perda na conversão pode ser vista nos tratamentos que utilizaram apenas o peróxido como agente químico, pois quando aplicado sobre os bagaços biotratados aumentou levemente sua digestibilidade ao contrário do que acontece quando aplicado sobre o bagaço autoclavado, demonstrando uma associação positiva entre os dois tratamentos sobre o material biotratado por *P. ostreatus*.

5.2.3 Biotratamento do bagaço de cana por *Ceriporiopsis subvermispota*

C. subvermispota tem sido reportado como um dos fungos mais seletivos na degradação de materiais lignocelulósicos, decompondo, usualmente, hemicelulose e lignina com baixa decomposição de celulose. Em processos biotecnológicos, tem apresentado os melhores resultados na biopolpação (FERRAZ et al., 2008; RAMOS et al., 2001).

No cultivo do bagaço de cana com o fungo *C. subvermispota* foi observado que havia micélio abundante sobre o bagaço a partir de 14 dias de cultivo. O acúmulo de micélio nos cultivos foi progressivo com o tempo, sendo que esta observação visual foi corroborada por uma perda de massa de bagaço progressiva, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controle e biotratado por *C. subvermispota* antes e após a aplicação do tratamento oxidativo e subsequente extração alcalina [(Pa)E]. R (%)= Rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos.

Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de Massa dos Componentes (g/100 g bagaço autoclavado)					
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Bagaço Controle													
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4
(Pa)E	47,5 ±0,3	22,7 ±0,1	1,8 ±0,1	0,4 ±0,1	18,3 ±0,8	4,0 ±0,1	82,5	39,2	18,7	1,5	0,3	15,1	3,3
Bagaço biotratado por <i>C. subvermispota</i>													
7 dias	40,6 ±0,6	22,2 ±0,5	1,5 ±0,1	3,1 ±0,2	21,8 ±0,1	3,8 ±0,2	90,3	36,6	20,0	1,4	2,8	19,7	3,5
14 dias	42,9 ±0,2	21,1 ±0,3	1,5 ±0,2	3,0 ±0,2	20,9 ±0,3	4,5 ±0,3	77,6	33,4	16,4	1,1	2,4	16,2	3,5
30 dias	46,5 ±0,6	19,4 ±0,2	1,1 ±0,1	2,7 ±0,1	18,5 ±0,6	3,4 ±0,2	72,1	33,5	14,0	0,8	1,9	13,4	2,5
60 dias	51,5 ±0,4	17,4 ±0,2	1,0 ±0,1	2,4 ±0,1	15,9 ±0,4	3,5 ±0,1	67,9	35,0	11,8	0,7	1,7	10,8	2,4
Bagaço biotratado por <i>C. subvermispota</i> submetido ao tratamento com peróxido e subsequente extração alcalina													
7 dias	45,8 ±0,4	22,9 ±0,4	1,6 ±0,1	1,2 ±0,1	18,6 ±0,7	1,8 ±0,2	77,2	35,4	17,7	1,2	0,9	14,4	1,4
14 dias	46,3 ±0,4	20,6 ±0,2	1,4 ±0,1	1,1 ±0,1	19,6 ±1,2	1,4 ±0,1	68,0	31,5	14,0	0,9	0,8	13,3	1,0
30 dias	51,8 ±0,8	19,9 ±0,3	1,3 ±0,1	1,0 ±0,1	16,4 ±0,5	1,8 ±0,1	61,8	32,0	12,3	0,8	0,6	10,2	1,1
60 dias	54,7 ±0,4	17,5 ±0,2	1,1 ±0,1	2,5 ±0,2	15,0 ±0,6	1,5 ±0,2	60,0	32,8	10,5	0,7	1,5	9,0	0,9

Os dados da Tabela 6 mostram que ao longo do biotratamento foi gerado um material enriquecido em glucanas que atingiu a concentração de 51,5% após 60 dias de biodegradação. O balanço de massas calculado para os componentes individuais indica que o perfil de degradação de glucanas foi mais intenso nos primeiros dias de tratamento, atingindo 9,4% e 17,3% de perda de glucanas aos 7 e 14 dias de cultivo, respectivamente. Tempos mais longos de biotratamento não causaram degradação adicional deste componente. Dados similares foram observados em cultivos de *C. subvermispora* sobre palha de milho (WAN;LI, 2012), nos quais foi observado que a perda de celulose atingia um platô com duas semanas de biotratamento. O enriquecimento de glucanas nas amostras biodegradadas por *C. subvermispora* foi decorrente da degradação seletiva de hemicelulose e lignina, conforme pode ser observado nos dados da Tabela 7.

A perda de hemicelulose foi inicialmente similar à da glucana (10%), porém atingiu 25% após 14 dias de biotratamento. Aos 30 dias de cultivo, a perda de hemicelulose já atingia 37 %, chegando a 49 % no material biotratado por 60 dias (perda de 13 g de hemicelulose em relação a 100 g de bagaço controle). O teor de lignina no bagaço biotratado diminuiu significativamente somente após 30 dias de biotratamento (Tabela 6). O balanço de massas para este componente indica que 5% da massa inicial da lignina foi degradada aos 7 dias de cultivo, porém esta perda não foi suficientemente elevada para causar uma diminuição expressiva na concentração de lignina no bagaço pré-tratado, pois no início do cultivo houve maior degradação dos polissacarídeos. Essa maior degradação dos polissacarídeos pode ser atribuída ao consumo inicial das frações de mais fácil assimilação, fomentando o crescimento do fungo e o seu estabelecimento sobre o substrato. Estudos prévios demonstram que a lignina não pode ser utilizada como fonte de carbono ou energia para sustentar a sobrevivência do fungo (SUN et al., 2011). Desta forma, os fungos de degradação branca hidrolisam os polissacarídeos de mais fácil acesso para sustentar o crescimento micelial e o metabolismo degradativo da lignina (SUN et al., 2011; YU et al., 2009; WAN; LI, 2012). A partir de 14 dias de cultivo, a perda de lignina foi mais expressiva (22 %) que, conjuntamente com a degradação de hemicelulose, resultou em um bagaço levemente enriquecido em glucanas. Aos 30 dias de biotratamento,

35 % da lignina original havia sido removida, alcançando 50 % de remoção aos 60 dias de cultivo.

A composição química e o balanço de massas dos componentes determinada após a aplicação do tratamento com peróxido de hidrogênio e extração alcalina em todos os materiais biotratados por *C. subvermispota* também estão detalhadas na Tabela 6. De forma similar ao observado nos bagaços biotratados descritos anteriormente, a aplicação do tratamento PaE no material biotratado causou pequenas alterações nas suas composições químicas. O balanço de massa dos componentes indica que o tratamento PaE solubilizou mais lignina e hemicelulose desde a madeira biotratada do que da amostra controle. No entanto, o material biotratado também perdeu mais glucanas do que o controle, o que resultou num sólido residual cuja composição química não difere significativamente daquela do material original.

5.2.3.1. Hidrólise enzimática do bagaço biotratado por *C. subversmipora*

A Figura 16 apresenta a cinética de hidrólise enzimática dos polissacarídeos contidos nos substratos previamente biotratados. O material biotratado por 7 dias se mostrou mais recalcitrante a ação das enzimas sobre as glucanas (figura 16A) do que o controle, sendo que em 72 h de hidrólise, apenas 17 % da glucanas foram convertidas, contra 23 % no controle. A hidrólise final da xilana foi semelhante nas tratadas por 7 dias e no controle autoclavado (11,5 %).

Figura 16 - Cinética da hidrólise enzimática da glucanas (A) e da hemicelulose (B) do bagaço controle autoclavado e dos bagaços tratados por *C. subvermispota*. Bagaço controle (♦), bagaço biotratado: 7 dias (◇), 14 dias (Δ), 30 dias (○) e 60 dias (□).

Fonte: Arquivo pessoal

Os materiais biotratados por tempos de 14 dias ou mais foram mais facilmente hidrolisados do que o controle autoclavado. Quanto maior o tempo de cultivo, maior foi a velocidade inicial de hidrólise e a conversão do polissacarídeo residual contidos nos bagaços biotratados. Por exemplo, a hidrólise de glucanas no material biotratado por 14 dias atingiu 32 %, subindo para 40 % e 54 % nos bagaços biotratados por 30 e 60 dias, respectivamente. A hidrólise da xilana (figura 16B) também mostrou um perfil semelhante de aumento na eficiência de conversão, sendo que o valor de 11,5 % de conversão observado no controle aumentou para 20, 21 e 26 % nas amostras biotratadas por 14, 30 e 60 dias, respectivamente. A digestibilidade das glucanas dos materiais biotratados por *C. subvermispota* submetidos a uma etapa posterior de

tratamento químico PaE seguiu um comportamento similar ao já discutido para este tratamento aplicado às amostras biotratadas pelos outros dois fungos em estudo. O tratamento PaE aumentou significativamente a digestibilidade dos polissacarídeos contidos no controle autoclavado. Quando aplicado às amostras biotratadas, o tratamento PaE não proporciona uma melhora na digestibilidade acima daquela já observada no controle. De fato, os dados da Figura 17 indicam que quanto maior o tempo de biotratamento, menor foi a contribuição do tratamento químico na digestibilidade do substrato.

Figura 17 - Digestibilidade da glucanas (A) e da hemicelulose (B) residual dos bagaços de cana autoclavado, biotratado por *C. subvermispora* e após aplicação do tratamento peróxido alcalino em 48 h de hidrólise enzimática. As colunas claras indicam as amostras antes do tratamento (Pa)E. As colunas escuras indicam as amostras tratadas pelo processo.

Fonte: Arquivo pessoal

Na hidrólise das xilanas, o material biotratado submetido ao tratamento químico PaE apresentou diminuição nos níveis de digestibilidade (Figura 17B), devido à sua extensa remoção (mais facilmente hidrolisável) ocorrida durante o tratamento químico das amostras biotratadas por *C. subvermispora*.

Como nos casos anteriores, as amostras biotratadas por *C. subvermispora* também foram avaliadas quanto ao tratamento químico subsequente, empregando as etapas Pa e E, separadamente (Tabela 7)

Tabela 7 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controles ou biotratado por *C. subvermispora* antes e depois da aplicação do tratamento oxidativo [(P_a)] ou extração alcalina (E). Rendimento de sólidos insolúveis após os tratamentos (R)

Amostra	Teor dos Componentes (g/100 g bagaço analisado)						R (%)	Balanço de Massa dos Componentes (g/100 g bagaço autoclavado)					
	Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos		Glucanas	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Bagaço controle													
Autoclavado	40,5 ±0,4	21,9 ±0,2	1,7 ±0,1	3,1 ±0,4	20,7 ±0,8	3,4 ±0,1	100	40,5	21,9	1,7	3,1	20,7	3,4
(P _a)	41,7 ±0,4	21,3 ±0,2	1,7 ±0,1	3,5 ±0,3	21,6 ±0,1	3,4 ±0,3	95,4	39,7	20,3	1,6	3,3	20,7	3,2
E	48,5 ±1,3	24,4 ±0,4	2,2 ±0,1	0,5 ±0,1	16,6 ±0,1	2,8 ±0,2	84,0	40,8	20,5	1,9	0,4	13,9	2,3
Bagaço biotratado por <i>C. subvermispora</i> (reproduzido da Tabela 7)													
14 dias	42,9 ±0,2	21,1 ±0,3	1,5 ±0,2	3,0 ±0,2	20,9 ±0,3	4,5 ±0,3	77,6	33,4	16,4	1,1	2,4	16,2	3,5
30 dias	46,5 ±0,6	19,4 ±0,2	1,1 ±0,1	2,7 ±0,1	18,5 ±0,6	3,4 ±0,2	72,1	33,5	14,0	0,8	1,9	13,4	2,5
Bagaço biotratado por <i>C. subvermispora</i> submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio													
14 dias	42,5 ±1,3	20,4 ±0,6	1,3 ±0,1	2,7 ±0,4	21,5 ±0,2	3,1 ±0,1	75,2	32,0	15,4	1,0	2,0	16,2	2,3
30 dias	46,2 ±1,5	19,4 ±0,6	1,1 ±0,1	2,5 ±0,4	18,5 ±0,3	4,1 ±0,2	70,4	32,5	13,7	0,8	1,8	13,0	2,9
Bagaço biotratado por <i>C. subvermispora</i> submetido à extração alcalina													
14 dias	48,6 ±1,0	21,0 ±0,4	1,4 ±0,1	1,5 ±0,1	18,1 ±1,3	2,9 ±0,2	67,3	32,7	14,2	0,9	1,0	12,2	2,0
30 dias	49,1 ±1,2	18,9 ±0,5	1,3 ±0,2	1,5 ±0,4	17,3 ±0,2	1,9 ±0,1	62,9	30,9	11,9	0,8	1,0	10,9	1,2

Também nestas amostras, o tratamento com peróxido causou alterações mínimas nos materiais biotratados. Já o tratamento alcalino afetou as amostras biotratadas de forma similar ao observado no controle autoclavado. A digestibilidade dos materiais submetidos aos tratamentos químicos aplicados separadamente também foi avaliada utilizando o tempo fixo de 48 h de hidrólise. (Figura 18).

Figura 18 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por *C. subvermispota* antes e após aplicação dos tratamentos peróxido (P_a) ou extração alcalina (E). Bagaço autoclavado/biotratado (□), com tratamento de peróxido de hidrogênio (▨), submetido à extração alcalina (▩).

Fonte: Arquivo pessoal

Novamente, o efeito dos tratamentos químicos aplicados isoladamente indica que a extração alcalina aumenta a digestibilidade dos materiais biotratados de forma similar ao observado no controle autoclavado e o tratamento com peróxido de hidrogênio altera muito pouco os níveis de conversão dos polissacarídeos.

5.2.3.2 Hidrólise enzimática das amostras biotratadas submetidas ao tratamento com sulfito alcalino

O bagaço biotratado por *C. subvermispora* por 14 dias também foi utilizado como substrato para um processo de pré-tratamento com sulfito alcalino sob condições brandas de reação (5 % de NaSO₃ e 2,5 % de NaOH) 2h/121 °C (MENDES et al., 2011). O objetivo básico deste grupo de experimentos foi verificar se amostras biotratadas por um fungo que já havia se mostrado eficiente para melhorar a digestibilidade do bagaço de cana, poderiam ser ainda mais digeríveis após a aplicação de um pré-tratamento químico sob condições brandas de reação.

Os dados da Tabela 8 e da Figura 18 indicam que a aplicação do tratamento sulfito alcalino sobre o controle autoclavado levou a um enriquecimento no teor de glucanas (5 %) do material. Este enriquecimento em glucanas foi consequência de uma remoção expressiva de hemicelulose (17 %) e lignina (23 %), conforme evidenciado pelo balanço de massa dos componentes, corroborando dados anteriores de Mendes et al. (2011).

Tabela 8 - Composição química, rendimento e balanço de massa dos componentes dos bagaços controle ou biotratado por *C. subvermispora* antes e depois da aplicação do tratamento sulfito alcalino.

	Componentes	Bagaço Controle		Biotratado por <i>C. subvermispora</i>	
		Autoclavado	Sulfito Alcalino	14 dias	Sulfito Alcalino
Componente (g/100 g bagaço)	Glucanas	40,5 ±0,4	45,7 ±0,7	43,0 ±0,2	45,6 ±0,9
	Xilana	21,9 ±0,2	23,0 ±0,2	21,1 ±0,3	20,2 ±0,4
	Arabinosil	1,7 ±0,1	2,0 ±0,1	1,5 ±0,2	1,6 ±0,1
	Acetil	3,1 ±0,4	1,8 ±0,2	3,0 ±0,2	1,6 ±0,1
	Lignina	20,7 0,8	19,2 ±0,7	20,9 ±0,3	18,6 ±0,1
	Extrativos	3,4 ±0,1	2,2 ±0,3	4,5 ±0,3	3,9 ±0,1
	Rendimento	100	82,3	77,6	76,6
Balanço de massa dos componentes (g/100 g bagaço autoclavado)	Glucanas	40,5	37,6	33,4	34,9
	Xilana	21,9	18,9	16,4	15,5
	Arabinosil	1,7	1,7	1,1	1,2
	Acetil	3,1	1,5	2,4	1,2
	Lignina	20,7	15,8	16,2	14,3
	Extrativos	3,4	1,8	3,5	3,0

O bagaço biotratado por 14 dias submetido ao tratamento com sulfito alcalino mostrou um menor enriquecimento no teor de celulose (2 %) do que havia sido observado no controle autoclavado (5%). O balanço de massa dos componentes mostra que a amostra biotratada sofreu menor remoção de hemicelulose e lignina, pois já se partia de menores teores destes componentes no material biotratado.

Figura 19 - Digestibilidade em 48 h de hidrólise enzimática das glucanas (A) e xilana (B) residual dos bagaços de cana controle e biotratado por *C. subvermispota* antes e após aplicação do tratamento sulfito alcalino. Bagaço controle/biotratado (▤), bagaço submetido ao tratamento sulfito alcalino (▨).

Fonte: Arquivo pessoal

A avaliação da digestibilidade dos materiais gerados neste grupo de experimentos (Figura 19) indica que ambos substratos apresentam maior digestibilidade dos polissacarídeos do que o observado nos controles não submetidos ao tratamento com sulfito alcalino. No entanto, a combinação de biotratamento prévio ao tratamento com sulfito alcalino não mostrou melhora expressiva na digestibilidade quando se compara com os resultados observados para o controle autoclavado.

5.2.4 Açúcares potenciais de cada tratamento para etapas subsequentes de bioconversão.

Açúcares como glicose, frutose, manose, xilose, arabinose podem ser convertidos em diversos produtos (incluindo etanol) por via fermentativa (PEREIRA; DE ANDRADE, 1998). Neste sentido, um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da aplicação de um determinado tratamento sobre uma biomassa lignocelulósica é a quantificação de açúcar recuperado em relação à biomassa inicial que ingressa no processo (SALVACHÚA et al., 2011). Por esta razão, foi feito, um estudo de balanço de massas de açúcares monoméricos recuperáveis após as diversas etapas de tratamento estudadas na presente dissertação.

No que diz respeito à glicose, a Tabela 10 apresenta o balanço de massas para a preparação hipotética deste monossacarídeo calculada com base na integração de todas as etapas de processo aplicadas no decorrer desta dissertação. Os dados da Tabela 9 permitem verificar, por exemplo, se a perda de glucanas decorrente da ação fúngica afetou de forma significativa ou não o rendimento final de glicose recuperável do bagaço. Os dados da Tabela 10 foram também codificados em uma escala de cores que variou do azul (menores valores) até o vermelho (maiores valores) a fim de facilitar a visualização simultânea de um conjunto grande de dados.

Pode-se notar que apenas dois fungos foram capazes de gerar um balanço positivo na geração de glicose em relação ao controle autoclavado, sendo que ambos são fungos de degradação branca: *C. subvermispota* e *P. ostreatus*. Quanto maior o tempo de biotratamento do bagaço, maior foi a liberação de açúcar, porém materiais de tempos mais curtos de degradação mostraram um balanço negativo de glicose, como o de 7 dias para *C. subvermispota* e 7 e 14 dias para *P. ostreatus*. A mudança para um balanço positivo coincide nesses materiais com uma maior degradação de hemicelulose e lignina no material e baixa degradação de celulose, apresentando uma conversão mais efetiva desse polímero.

Tabela 9 - Glicose potencial (g para cada 100 g bagaço de cana autoclavado) dos bagaços de cana que foram biotratados e tratamentos químicos subsequentes
Escala: 10 g 45 g

Amostra de bagaço	Glicose potencial (g/100 g de bagaço autoclavado)		
	<i>C. subvermispora</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. gilbertsonii</i>
Controle autoclavado	10,4	10,4	10,4
Biotratado 7 dias	6,9	7,6	9,4
Biotratado 14 dias	12,2	8,7	8,1
Biotratado 30 dias	14,7	11,1	8,7
Biotratado 60 dias	20,9	14,1	8,3
Máximo teórico	45	45	45
Submetido ao tratamento com peróxido e extração alcalina			
Controle	24,0	24,0	24,0
Biotratado 7 dias	12,4	23,1	18,5
Biotratado 14 dias	18,3	25,0	18,4
Biotratado 30 dias	18,6	20,4	16,2
Biotratado 60 dias	21,6	21,6	15,7
Máximo teórico	45	45	45
Submetido ao tratamento com peróxido			
Controle	7,5	7,5	7,5
Biotratado 14 dias	11,6	10,2	8,2
Biotratado 30 dias	13,6	12,6	7,0
Máximo teórico	45	45	45
Submetido à extração alcalina			
Controle	23,6	23,6	23,6
Biotratado 14 dias	20,3	19,9	19,8
Biotratado 30 dias	18,6	20,6	14,4
Máximo teórico	45	45	45
Submetido ao tratamento sulfito alcalino			
Controle	21,9		
Biotratado 14 dias	17,8		
Máximo teórico	45		

O balanço mais favorável foi observado pela aplicação de *C. subvermispora* sobre o bagaço de cana, mesmo com o consumo maior de glucanas que o observado para *P. ostreatus*. O material biotratado por 60 dias proporcionou valores de glicose recuperável de 21 g/100 g de bagaço autoclavado, sendo este valor obtido somente quando se emprega um tratamento químico como o P_aE no bagaço controle (24 g/100 g de bagaço autoclavado). Já o bagaço biotratado pelo fungo de degradação parda, *Laetiporus gilbertsonii* gerou um balanço negativo de liberação de glicose para todos os tempos de tratamento.

Quando analisada a combinação de tratamentos químicos subsequentes ao tratamento biológico pode se observar que o material resultante varia de acordo com o substrato empregado. Nos bagaços biotratados por *C. subvermispora*, quanto maior o tempo de cultivo, maior a liberação de açúcar, porém quanto maior esse tempo, menor a contribuição das etapas químicas em relação ao material original. Nenhum dos materiais resultantes dos tratamentos químicos posteriores ao biotratamento gerou mais açúcar do que quando o tratamento químico foi aplicado sobre o bagaço controle (24 g/100 g de bagaço autoclavado).

Outro padrão observado pela aplicação desse tratamento de dados pode ser visto quando utilizado os bagaços biotratados por *P. ostreatus* e *L. gilbertsonii*. Nestes casos, os materiais com mais tempo de biotratamento (30 e 60 dias) mostraram um valor inferior de glicose potencial quando comparados com aqueles obtidos com tempos mais curtos de biotratamento (7 e 14 dias). No caso de *L. gilbertsonii*, quanto maior o tempo de biotratamento, menor foi a recuperação de glicose após o tratamento químico. Já para *P. ostreatus*, não foi observado esse padrão, sendo o maior valor de açúcar liberado quando utilizado o bagaço biotratado por 14 dias (25 g/100 g de bagaço biotratado), sendo inclusive levemente maior que o controle utilizando bagaço de cana autoclavado.

A aplicação de peróxido apresenta uma influência mais sutil na geração de glicose. Foi observada uma leve diminuição em relação ao controle autoclavado, e nos materiais biotratados por *C. subvermispora* e *L. gilbertsonii*, Já a influência de peróxido sobre o bagaço biotratado por *P. ostreatus* foi positiva.

O bagaço submetido à extração alcalina apresenta maiores valores de glicose potencial que os bagaços autoclavados e biotratados. Quando aplicado sobre o bagaço biotratado, a geração de glicose foi sempre menor quando comparada ao controle. A extração alcalina sem a etapa prévia de peróxido auxilia na elucidação da etapa de peróxido sobre a digestibilidade final do material. Em relação ao seu material biotratado que passou pelas duas etapas, para os bagaços de 14 dias *C.subvermispota* e de *L. gilbertsonii*, a liberação de glicose foi superior. Já para o material de *P. ostreatus*, foi menor que o bagaço que passou pelas duas etapas, cujo valor foi o único que ultrapassou o controle (quando o tratamento foi aplicado sobre o bagaço autoclavado), demonstrando que a etapa de peróxido sobre o bagaço residual de *P. ostreatus* é benéfica para geração de glicose.

No que diz respeito à xilose potencialmente obtida após cada etapa de tratamento, pode-se notar que nenhum biotratamento favoreceu a liberação de xilose, conforme mostrado na Tabela 10. Os dados indicam que os materiais biotratados gerariam cerca de 3 g de xilose/100 g de bagaço autoclavado, sendo este valor similar ao observado para a hidrólise do bagaço autoclavado. Houve maior liberação de xilose após os tratamentos químicos, mas o valor obtido com os materiais biotratados nunca superou aqueles já observados com o mesmo tratamento químico aplicado sobre o bagaço autoclavado. Esse grupo de resultados pode ser atribuído ao consumo ou degradação de xilana pelos fungos em estudo.

Tabela 10 - Xilose potencial (g para cada 100 gramas de bagaço de cana original) dos bagaços de cana que foram biotratados e tratamentos químicos subsequentes

Escala: 3 g 25 g

Amostra de bagaço	Xilose potencial (g)		
	<i>C. subvermispora</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. gilbertsonii</i>
Controle autoclavado	3,3	3,3	3,3
Biotratado 7 dias	2,3	1,9	2,7
Biotratado 14 dias	3,8	2,4	2,6
Biotratado 30 dias	3,6	2,9	2,5
Biotratado 60 dias	3,4	3,3	2,3
Máximo teórico	25	25	25
Submetido ao tratamento com peróxido e à extração alcalina			
Controle	10,3	10,3	10,3
Biotratado 7 dias	6,4	10,5	9,1
Biotratado 14 dias	5,5	10,1	7,9
Biotratado 30 dias	4,8	7,9	6,9
Biotratado 60 dias	4,0	7,2	6,8
Máximo teórico	25	25	25
Submetido ao tratamento com peróxido			
Controle	4,2	4,2	4,2
Biotratado 14 dias	5,7	2,6	2,3
Biotratado 30 dias	5,8	3,1	2,0
Máximo teórico	25	25	25
Submetido à extração alcalina			
Controle	12,2	12,2	12,2
Biotratado 14 dias	9,0	7,8	8,2
Biotratado 30 dias	7,3	7,3	6,5
Máximo teórico	25	25	25
Submetido ao tratamento sulfito alcalino			
Controle	9,3		
Biotratado 14 dias	8,1		
Máximo teórico	25		

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos cultivos de bagaço de cana em reatores de 20 L pode se concluir que a utilização de grandes quantidades do material requer uma atenção especial quanto à esterilização e manipulação devido à dificuldade em estabelecer cultivos livre de contaminantes com os fungos desejados.

A partir dos resultados obtidos nos cultivos de bagaço de cana em Erlenmeyers, foi possível concluir que o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* foi o organismo que mais eficientemente degradou o bagaço de cana.

A utilização do fungo *Laetiporus gilbertsonii* no tratamento de bagaço de cana não foi efetivo, pois gerou um material mais recalcitrante à ação das enzimas que o bagaço original.

A biodegradação de bagaço de cana pelo fungo *Pleurotus ostreatus* apresentou um padrão de degradação não seletivo do material, reduzindo todos os componentes simultaneamente. A degradação desses componentes gerou um material menos recalcitrante que o bagaço original a partir de 30 dias de biotratamento.

A utilização do fungo *C. subvermispora* sobre o bagaço de cana mostrou um padrão de degradação seletivo, degradando mais extensivamente hemicelulose e lignina, gerando um material final rico em celulose. O material final gerado pelo tratamento com *C. subvermispora* se apresentou menos recalcitrante à ação enzimática do que o material controle, com cerca de duas vezes mais conversão de glucanas.

A combinação dos bagaços de cana biotratados por *P. ostreatus* e *C. subvermispora* com tratamentos oxidativo e alcalinos não apresentaram diferença quando utilizados os bagaços biotratados em relação à utilização do bagaço de cana original. Já quando aplicado sobre o bagaço biotratado por *L. gilbertsonii* houve perda na conversão dos polissacarídeos residuais quando comparado ao bagaço inicial.

O biotratamento com *C. subvermispora* demonstrou um balanço positivo para a liberação de glicose em relação ao bagaço original, comprovando o alto potencial dessa espécie em etapas de biotratamento biológico de lignocelulósicos

É importante avaliar o perfil degradativo dos fungos em função do substrato utilizado, para otimização de processos biotecnológicos de degradação dos materiais lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOVIC M; GRUBIC G; MILENKOVIC I; JOVANOVIC R; PROTIC R; SRETENOVIC L; STOICEVIC L. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. **Animal Feed Science Technology** v. 71, p. 357–362, 1998.
- ADLER, E. Lignin chemistry – past, present and future. **Wood Science Technology**. v. 11, p 169–218, 1977.
- AGUIAR, A. Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota*. 2008. 121f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)**. Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.A.; MYERS, G.; KIRK, T.K.. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R.R; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p. 309-383
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- ARANTES, V. Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina. 2008. 163f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)**. Universidade de São Paulo, 2008.
- ARANTES, V.; GOODELL, B. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: A Review. In: SCHULTZ, T., et al. **Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials**; (ACS Symposium Series); Washington, DC: American Chemical Society: 2014.
- ARANTES, V.; MILAGRES. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos **Química. Nova**, v. 32, n.6., p. 1586–1595. 2009.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3., 2010.
- BANIK, M. T.; LINDNER, D. L.; ORTIZ-SANTANA, B.; LODGE, D.J. A new species of *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales) from the Caribbean basin. **Kurtziana**, v.37, p.15-21, 2012.
- BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 381-398, 1991.
- BLANCHETTE, R.A.; KRUEGER, E.W.; HAIGHT, J.E.; AKHTAR, M.; AKIN DE. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p.203–13, 1997.

BREEN, A.; SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, 1999.

BURDSALL H. H. Jr.; BANIK, M. T. The genus *Laetiporus* in North America. **Harvard Papers in Botany**, v.6, p.43-55, 2001.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia para “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p.48-52, 2010.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.15, p.1-8, 2009.

CHANG V.; HOLTZAPPLE M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84/86, p. 5—37, 2000.

CIANCHETTA, S. ; DI MAGGIO, B. ; BURZI, P. L. ; GALLETT, S. Evaluation of selected white-rot fungal isolates for improving the sugar yield from wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 609–623, 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, Brasília, DF, v.1, n.2, 2014.

DESWAL, D.; GUPTA, R.; NANDAL, P.; KUHAD, R. C. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p. 264–269, 2013

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – Universidade de Wisconsin. Tom Volk's Fungi Collection. Disponível em: <http://botit.botany.wisc.edu/Resources/Toms%20Fungi/Basidiomycota/Hymenomycetes/General_--Wood_rotters/White_rot_Stromatoscypha_tjv.jpg.html>. Acesso em: 12 jan 2015.

DONG, X. Q.; YANG, J. S. ; ZHU, N. ; WANG, E. T. ; & YUAN, H. L.). Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v.131, p. 443–51, 2013.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technology**, v. 55, p. 1–33, 1996.

ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbiological and enzymatic degradation of wood and wood components**. Germany: Springer-Verlag, 1990, p. 560.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v.74, p.201-212, 2000.

FERRAZ, A., GUERRA, A., MENDONÇA, R., MASARIN, F., VICENTIM, M.P., AGUIAR, A., PAVAN, P.C. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, 178-185, 2008

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul. EDUCS, 2010, cap. 6, p. 215-242.

GOLDSTEIN, I.S.; LEWIN, M. **Organic Chemicals from Biomass**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1991.

GOODELL, B. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 419-425, 2011

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

HENRIKSSON, G. Lignin. In: Ek M.; GELLERSTEDT, M.; HENRIKSSON, G **Pulp and Paper Chemistry and Technology**; eds.; De Gruyter: Stocolm, v.1, cap. 4, 2009,

HIGUCHI T. Biochemistry and molecular biology of wood. **Springer Series in Wood Science**. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 362 p.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30. n.4., p. 454-466. 2002.

HON, D. N.-S., SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic chemistry**. 2ed. Boca Raton, FL, CRC Press, 2001 914p.

JEYA, M.; ZHANG, Y.M.; KIM, I.W.; LEE, J.K. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5155-5161, 2009.

KELLER, F. A.; HAMILTON, J.E.; NGUYEN, Q. A. Microbial pretreatment of biomass - potential for reducing severity of thermochemical biomass pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105, p.27-41, 2003

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

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decay Agaricomycetes. **Fungal Genetics and Biology** v. 72, p.124–130, 2014.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Review Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Department of Biological and Agricultural Engineering**. Raleigh:North Carolina State University, 2009, p.1515–1523.

KIRK, T.K. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: SMITH J.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B.**The filamentous fungi. Fungal technology**. New York: Edward Arnold, 1983, p. 266-295.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R; AKHTAR, M. Enviromentally **Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley. 1998, p. 273-308.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. Dictionary of the fungi, 10 ed. Cab International Wallingford., 2008.

KONDO, R.; KURASHIKI, K.; SAKAI, K :In vitro bleaching of hard wood kraft pulp by extracellular enzymes excreted from white rot fungi in a cultivation system using a membrane filter .**Applied and Environmental Microbiology**,v. 60, p. 921–926, 1994.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K.E.L., **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 57, p. 45-126, 1997.

LADISCH, M.R.; LIN, K.W.; VOLOCH, M.; TSAO, G.T. Process considerations in the enzymatic-hydrolysis of biomass. **Enzyme Microbiology Technology**, v.5, p.82–102, 1983.

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

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2003.

LEVY, J.F. The natural history of the degradation of wood. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, Londres. A, v. 321, p. 423 - 433, 1987.

LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M. Enhanced saccharification of biologically pretreated wheat straw for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**; v.169, n.4, p.1147–59, 2013.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Revivs**, v.66, p. 506, 2002.

LYND, L.R., LASER, M.S., BRANSBY, D., DALE, B.E., DAVISON, B., HAMILTON, R. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v.26, p.169–172, 2008.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. **Biotechnology for biofuels**, v.4, p. 1–10, 2011.

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.E.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal Science Food Agriculture**, v. 62, p. 1-20, 1993.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395-401, 2011.

MENON, V.; RAO, M Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v 38, n.4, p. 522–550, 2012.

MOREIRA-NETO, S. L.; MUSSATTO, S. I.; MACHADO, K. M. G.; MILAGRES, A. M. F. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.56, p.283—290, 2013

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v.96, p. 1986-1993, 2005.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation. **The Plant Cell**, Rockyville, v.14, p. 1953-1962, 2002.

PARK, Y. C.; KIM, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v.47 n.1, p.31–35, 2012.

PASZCZYNSKI, A., CRAWFORD, R., FUNK, D., GOODELL, B. De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.674–679, 1999

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 5, n.2, p.53–63, 2002.

PINGALI, S. V.; URBAN, V. S.; HELLER, W. T.; MCGAUGHEY, J.; O'NEILL, H.; FOSTON, M.; MYLES, D. A.; RAGAUSKAS, A.; EVANS, B. R. Breakdown of cell wall nanostructure in dilute acid pretreated biomass. **Biomacromolecules**, v. 11, n.9, p. 2329-35, 2010

QUINLAN, R. J.; SWEENEY, M.D.; LEGGIO, L. L.; OTTEN, H.; POULSEN, J. C. N.; JOHANSEN, K. S.; KROGH, K.; JORGENSEN, C. I.; TOVBORG, M.; ANTHONSEN, A. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.15079–84, 2011.

PEREIRA, P.; DE ANDRADE, J. Sources, reactivity and quantification of atmosphere methanol and ethanol. **Química Nova**. v.21, p. 744-754, 1998.

RAMOS, J.; GONZÁLEZ, M.; RAMÍREZ, F.; YOUNG, R.; ZÚÑIGA, V. Biomechanical and Biochemical Pulping of Sugarcane Bagasse with *Ceriporiopsis subvermispota* Fungal and Xylanase Pretreatments. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.1180–118, 2001.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAY, M.; LEAK, D.; SPANU, P. D.; MURPHY, R. Brown-rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for soft wood biomass in biofuel production. **Biomass Bioenergy**, v.34, p.1257–62, 2010.

RILEY, R.; SALAMOV, A. A.; BROWN, D. W.; NAGY, L. G.; FLOUDAS, D.; HELD, B. W.; LEVASSEUR, A.; LOMBARD, V.; MORIN, E.; OTILLAR, R.; LINDQUIST, E. A.; SUN, H. W.; LABUTTI, K. M.; SCHMUTZ, J.; JABBOUR, D.; LUO, H.; BAKER, S. E.; PISABARRO, A. G.; WALTON, J. D.; BLANCHETTE, R.A.; HENRISSAT, B.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; HIBBETT, D. S.; GRIGORIEV, I. V. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n.27, p.9923–9928, 2014.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 279–291, 2003

SALVACHÚA, D., PRIETO, A., LÓPEZ-ABELAIRAS, M., LU-CHAU, T., MARTÍNEZ, A. T., & MARTÍNEZ, M. J. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.102, n.16, p.7500–7506, 2011.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270-95, 2008.

SCHILLING, J. S.; TEWALT, J. P.; DUNCAN, S. M. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n.3, p. 465-75, 2009.

SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHINN, M.; HOWELL, N. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass Bioenergy**, v.33, p.88–96, 2009.

STAMBUK, B.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 18-926., 2008.

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

SUN, F.-H.; LI, J.; YUAN, Y.-X.; YAN, Z.-Y.; LIU, X.-F. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 931–938, 2011.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621–1651. , 2008.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, p.4744–475, 2010.

TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.6, p. 637–43, 2005.

TEERI, T.; HENRIKSSON, G. Enzymes degrading wood components. In: EK,M.; GELLERSTEDT, G; HENRIKSSON, G. Ed. **Pulp and paper chemistry and technology**. Weinheim: De Gruyter, 2009. Cap. 11. p. 245-27

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass, **Biotechnology Advances**, v.03, 2012.

WENDE, G.; FRY, S.C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side- chains of Grass xylans. **Phytochemistry**, v.44, p.1011-1018, 1997.

WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. **Applied. Biochemistry Biotechnology**, v. 18, p.75–90, 1988.

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

ZABEL R. A.; MORRELL J. J. Wood microbiology: decay and its prevention. San Diego: Academic 1992.

ZHANG, X.; YU,H.; HUANG, H.; LI, Y. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for theenzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 60, p.159–164, 2007.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; HEATHER, M.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E., Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v.68, p. 235–241, 2007.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agriculture & Biology Engineering**; v.2, n.3, p. 51–68, 2009.

ZHU, L.; O'DWYER, J.P.; CHANG, V.S.; GRANDA, C.B.; HOLTZAPPLE. M.T. Structural features affecting biomass digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817-3828, 2008.