

ROSILENE SOUZA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS E AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO
DE BIOMASSAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

ROSILENE SOUZA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS E AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO
DE BIOMASSAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 7 de abril de 2009.

Prof.^a Valéria Monteze Guimarães
(Coorientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)

Prof. Jorge Luiz Colodette

Prof. Maurílio Alves Moreira

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

*À Deus, pela esperança de uma vida mais justa e...
à minha família, pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador Prof. Sebastião Tavares de Rezende, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade durante esses dois anos.

A minha co-orientadora Prof.^a Valéria Monteze Guimarães pelo apoio, pelas correções e sugestões no trabalho e principalmente pela sua amizade.

Aos professores Jorge Luiz Colodette, Luciano Gomes Fietto e Maurílio Alves Moreira, pela participação na banca e pelas correções e sugestões que contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos Profs. Domício do Nascimento Jr., Márcio Henrique Pereira Barbosa e José Lívio Gomide, por terem me ajudado a começar este trabalho, me cedendo às biomassas utilizadas.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, na pessoa da Cláudia Alencar Vanetti, por me permitir usar os equipamentos e reagentes do Núcleo.

Aos professores Jorge Luiz Colodette e Cláudio Mudado por disponibilizarem seus laboratórios para a execução de algumas etapas deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A todos os funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela boa convivência.

Aos funcionários do BIOAGRO pela disponibilidade em me ajudar, em especial o Cássio, por estar sempre disponível na concessão dos materiais.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica e do Laboratório de Análises Bioquímicas: Daniel, Cristina, Evan, Camila, Sérgio, Samara, Dayelle e a todos os demais amigos dos Laboratórios, pela disposição em ajudar, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

À amiga Maíra, pelas sugestões e pela ajuda na execução de algumas análises.

As minhas estagiárias Lídia e Rafaela pela amizade e pela ajuda durante os experimentos.

Aos meus amigos de Viçosa, em especial a Fernanda e o Jairo, pelos conselhos, pelo incentivo e principalmente pela amizade.

À minha Mãe Arlete e ao meu Pai José, por tudo o que fizeram por mim e que me permitiu chegar até aqui.

À minha irmã Sirlene, pela amizade, pelo incentivo, pela presença constante e pela contribuição indispensável para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Felipe, pelo incentivo e pelo carinho.

A Deus, pela minha vida.

Rosilene Souza Rodrigues, filha de José Rodrigues Leocádio e Arlete Souza Leocádio, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, no dia 12 de julho de 1983. Fez o ensino fundamental no Colégio Municipal Altina Olívia Gonçalves e o ensino médio no Colégio São Francisco Xavier, em Ipatinga, concluindo-os em novembro de 2001.

Em janeiro de 2007, graduou-se como Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o período de graduação fez iniciação científica no setor de Meio Ambiente do Laboratório de Celulose e Papel.

Iniciou o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em março de 2007, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em abril de 2009.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>viii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>ix</i>
<i>RESUMO</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xii</i>
<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	<i>1</i>
<i>CAPÍTULO 1</i>	<i>5</i>
<i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	<i>5</i>
1.1. PANORAMA ENERGÉTICO	5
1.2. BIOMASSA	8
1.2.1. Classificação da Biomassa	10
1.2.2. Principais fontes de biomassa	11
1.2.3. Biomassa contendo sacarose	12
1.2.4. Biomassa contendo amido	13
1.2.5. Biomassa lignocelulósica	13
1.3. PRODUÇÃO DE ETANOL DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	16
1.3.1. Pré-tratamentos	17
1.3.2. Sacarificação enzimática	22
1.3.2.1 Celulases	22
1.3.2.2 Hemicelulases	26
1.3.3. Hidrólise enzimática	27
1.3.4. Fermentação	28
<i>CAPÍTULO 2</i>	<i>31</i>
<i>PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES</i>	<i>31</i>
2.1. INTRODUÇÃO	31
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.2.1. Materiais	32
2.2.2. Meio e condições de cultivo dos fungos	33
2.2.3. Ensaio enzimáticos	33
2.2.4. Caracterização enzimática	35
2.2.4.1. Efeito do pH	35
2.2.4.2. Efeito da temperatura	35
2.2.4.3. Análise da termoestabilidade	35
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
2.3.1. Produção das enzimas	36

2.3.2.	Caracterização enzimática	46
2.3.2.1.	Efeito do pH e da temperatura	46
2.3.2.2.	Termoestabilidade.....	50
2.4.	CONCLUSÕES	54
<i>CAPÍTULO 3.....</i>		55
<i>AValiação do pré-tratamento ácido diluído.....</i>		55
3.1.	INTRODUÇÃO	55
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.2.1.	Matéria-prima	56
3.2.2.	Pré-tratamentos.....	56
3.2.3.	Análise dos carboidratos e lignina	57
3.2.4.	Análise de açúcares redutores.....	59
3.2.5.	Quantificação do hidroximetilfurfural.....	59
3.2.6.	Quantificação do furfural.....	59
3.2.7.	Microscopia eletrônica de varredura	60
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.3.1.	Matéria-prima	60
3.3.2.	Pré-tratamentos.....	61
3.3.3.	Análises morfológicas	67
3.4.	CONCLUSÕES	72
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>		73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Evolução da Demanda Mundial de Energia entre 1850 – 2100.	8
Figura 1.2 - Área disponível para a agricultura em alguns países do mundo.	10
Figura 1.3 – Metas esquematizadas do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.	18
Figura 1.4 - Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.	24
Figura 1.5 – Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.	26
Figura 2.1 – Efeito do pH sobre a atividade das enzimas FPase (A), endoglicanase (B), β-glicosidase (C) e celobiase (D) do fungo <i>A. niger</i> LTB crescido em forrageira como fonte de carbono.	47
Figura 2.2 – Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas FPase (A), endoglicanase (B), β-glicosidase (C) e celobiase (D) do fungo <i>A. niger</i> LTB crescido em forrageira como fonte de carbono.	48
Figura 2.3 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da xilanase.	50
Figura 2.4 – Estabilidade térmica das enzimas xilanase (●) e endoglicanase (○).	51
Figura 2.5 – Estabilidade térmica da FPase.	52
Figura 2.6 – Estabilidade térmica das enzimas aril-β-glicosidase (A) e celobiase (B).	53
Figura 3.1 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de bambu.	69
Figura 3.2 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de forrageiras.	70
Figura 3.3 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de cana.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Atividades enzimáticas do fungo <i>Aspergillus niger</i> LTB em cultura submersa.	37
Tabela 2.3 – Atividades enzimáticas do fungo <i>Penicillium expansum</i> LABQ em cultura submersa.....	38
Tabela 3.1: Composição química das matérias-primas ligninocelulósicas	60
Tabela 3.2. Concentração de carboidratos presentes nas biomassas pré-tratadas com ácido sulfúrico nas concentrações de 0,5, 1 e 2%.....	62
Tabela 3.3. Concentração de açúcar redutor presente no hidrolisado hemicelulósico.....	63
Tabela 3.4. Concentração de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) presentes no hidrolisado hemicelulósico.	63

RODRIGUES, Rosilene Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009.
Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol. Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Luciano Gomes Fietto.

Neste estudo investigou-se a capacidade de três espécies de fungos (*Aspergillus niger* LTB, *Aspergillus glaucus* LTB e *Penicillium expansum* LABQ) de produzir celulasas e hemicelulasas em meio líquido (0,2% extrato de levedura, 0,3% NaNO₃, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,01% FeSO₄.7H₂O e 0,1% K₂HPO₄). Fontes de carbono forrageira, bagaço de cana e farelo de trigo foram testadas para a produção das enzimas. Alíquotas diárias foram retiradas durante 15 dias. Avaliou-se a produção de celulasas (FPase, celobiase, endoglicanase e aril-β-glicosidase) e de hemicelulasas (α-galactosidase, L-arabinofuranosidase, β-xilosidase e xilanase). Além disso, foi feita a caracterização das enzimas que apresentaram alta atividade. A forrageira foi a fonte de carbono que mais eficientemente induziu a produção de xilanase pelos fungos *A. niger* LTB, *A. glaucus* LTB e *P. expansum* LABQ; FPase e celobiase pelo fungo *A. niger* LTB; e endoglicanase pelos fungos *A. niger* LTB e *P. expansum* LABQ. O fungo *A. niger* LTB foi o que produziu maiores rendimentos da maioria das enzimas (60,76 U/g de endoglicanase, 48,7 U/g de FPase, 5320 U/g de xilanase e 228 U/g de celobiase). As celulasas apresentaram maiores atividades em pHs ácidos e em temperaturas de 50°C e 60°C, sendo que a FPase e a endoglicanase apresentaram o pH ótimo 4,0. A FPase reteve aproximadamente 76% da sua atividade após ser pré-incubada por 5 horas na sua temperatura ótima (50°C) e a endoglicanase apresentou 68% de atividade residual após 24 horas de pré-incubação na sua temperatura ótima (60°C). A aril-β-glicosidase exibiu maior atividade em pH 4,5 e na temperatura de 60°C, apresentando-se pouco termoestável, retraindo apenas 15% da sua atividade após ser incubada por 3,5 horas. A celobiase apresentou valores diferentes da aril-β-glicosidase, tendo maior atividade em pH 5,0 e na temperatura de 50°C, além de ser mais termoestável, mantendo 53% da sua atividade inicial após pré-incubação por 14 horas a 50°C. A xilanase apresentou alta atividade na faixa de pH de 4,0-6,0, com atividade máxima em pH 5,5 e a 50°C. Esta

enzima foi altamente estável a 50°C, mantendo 68% da sua atividade inicial após 24 horas de pré-incubação. Testou-se também, neste trabalho, várias condições de severidade no pré-tratamento ácido diluído em três biomassas lignocelulósicas (forrageira, bagaço de cana e bambu), a partir da quantificação dos carboidratos na biomassa pré-tratada, dos açúcares redutores e dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural (HMF) presentes no hidrolisado hemicelulósico. Primeiramente, as amostras foram caracterizadas com relação ao teor de carboidratos e lignina. O bambu apresentou em torno de 45% de celulose, 20% de hemicelulose e 22,5% de lignina. O bagaço de cana apresentou um teor de aproximadamente 43% de celulose, 24,7% de hemicelulose e 20,2% de lignina. A forrageira apresentou menor teor de lignina e hemicelulose, com valores em torno de 18,8% e 14,5%, respectivamente; Com relação ao teor de glicanas nas amostras pré-tratadas, não houve grande diferença para as biomassas. Além disso, a hidrólise ácida foi mais eficiente para o bagaço e para a forrageira, visto que 82% e 73,3% de hemicelulose foram liberados destas biomassas, respectivamente. Já o bambu perdeu apenas 65,7% da sua hemicelulose inicial. Assim, para o bambu a condição mais indicada para o pré-tratamento ácido diluído seria de 1% de ácido sulfúrico com um tratamento de 60 min; para a forrageira seria 0,5% de ácido sulfúrico durante 90 min; e para o bagaço de cana seria 0,5% de ácido sulfúrico durante 30 min. Além disso, o bagaço de cana foi a biomassa que se mostrou mais promissora para a produção de bioetanol, visto que necessitou de condições mais brandas e, conseqüentemente, mais baratas.

ABSTRACT

RODRIGUES, Rosilene Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2009.
Production of enzymes and evaluation of acid pretreatment of biomasses for bioethanol production. Advisor: Sebastião Tavares de Rezende. Co-advisors: Valéria Monteze Guimarães and Luciano Gomes Fietto.

In this study the capacity of three species of fungi (*Aspergillus niger* LTB, *Aspergillus glaucus* LTB and *Penicillium expansum* LABQ) of producing cellulases and hemicellulases in liquid medium (0,2% yeast extract, 0,3% NaNO₃, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,01% FeSO₄.7H₂O and 0,1% K₂HPO₄) was investigated. Carbon sources silvergrass, sugar cane bagasse and bamboo were tested for the enzyme production. Daily aliquots were removed for 15 days. The production of cellulases (FPase, cellobiase, endoglucanase e aril- β -glucosidase) and hemicellulases (α -galactosidase, L-arabinofuranosidase, β -xylosidase e xylanase) was evaluated. Besides, the characterization of the enzymes that presented high activity was made. The silvergrass was the carbon source that more efficiently induced the xylanase production for the fungi *A. niger* LTB, *A. glaucus* LTB and *P. expansum* LABQ; the FPase and cellobiase production for the fungus *A. niger* LTB; and the endoglucanase production for the fungi *A. niger* LTB and *P. expansum* LABQ. The fungus *A. niger* LTB was what produced larger revenues of most of the enzymes (60,76 U/g of endoglucanase, 48,7 U/g of FPase, 5320 U/g of xylanase and 228 U/g of cellobiase). The cellulases presented larger activities in acid pHs and in temperatures of 50°C and 60°C, and the FPase and the endoglucanase presented the optimum pH of 4,0. The FPase retained 76% of its activity approximately after being preincubated by 5 hours in its optimum temperature (50°C) and the endoglucanase presented 68% of residual activity after 24 hours of preincubation in its optimum temperature (60°C). The aril- β -glucosidase exhibited larger activity in pH 4,5 and in the temperature of 60°C, coming little thermostable, retaining only 15% of its activity after being incubated by 3,5 hours. The cellobiase presented values different in relation to the aril- β -glucosidase, possessing larger activity in pH 5,0 and in the temperature of 50°C, besides being more thermostable, maintaining 53% of its initial activity after preincubation for 14 hours to 50°C. The xylanase

presented high activity in the strip of pH 4,0-6,0, with maximum activity in pH 5,5 and to 50°C. This enzyme was highly thermostable to 50°C, maintaining 68% of its initial activity after 24 hours of preincubation. It was also tested, in this work, several severity conditions in the dilute acid pretreatment in three lignocellulosic biomasses (silvergrass, sugar cane bagasse and bamboo), starting from the quantification of the carbohydrates in the pretreated biomass, of the reductor sugars and of the inhibitors furfural and hidroximetilfurfural (HMF). Firstly, the samples were characterized with relationship to the carbohydrates and lignin tenor. The bamboo presented around 45% of cellulose, 20% of hemicellulose and 22,5% of lignin. The sugar cane bagasse presented a tenor of approximately 43% of cellulose, 24,7% of hemicellulose and 20,2% of lignin. The silvergrass presented smaller lignin and hemicellulose tenor, with values around 18,8% and 14,5%, respectively. With relationship to the glucans tenor in the pretreated samples, there were not great difference for the biomasses. Besides, the acid hydrolysis went more efficient for the sugar cane bagasse and for the silvergrass, because 82% and 73,3% of hemicellulose were liberated of these biomasses, respectively. The bamboo lost only 65,7% of its initial hemicellulose. Likewise, for the bamboo the most suitable condition for the dilute acid pretreatment would be of 1% sulfuric acid with a treatment of 60 minutes; for the silvergrass it would be 0,5% sulfuric acid during 90 minutes; and for the bagasse it would be 0,5% sulfuric acid during 30 min. Besides, the bagasse was the biomass that was shown more promising for the bioethanol production, because it needed softer conditions and, consequently, cheaper.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

A demanda por energia apresenta-se em constante ascensão no mundo, seja pelo crescimento acelerado dos países em desenvolvimento e seus bilhões de habitantes, seja pela mudança de hábitos que as tecnologias modernas tem proporcionado às populações de países desenvolvidos.

Contraposto a essa realidade, existe uma expectativa de diminuição das reservas de petróleo, com a possibilidade de escassez do mesmo. Aliado com a crescente preocupação com a preservação do meio ambiente, que tem sofrido um aumento do nível de poluentes, notadamente pelo gás carbônico (CO₂), em parte pela contribuição das emissões pelos motores movidos a combustíveis fósseis. Sabe-se que este gás é o maior responsável pelo efeito estufa e, conseqüentemente, pelo aquecimento global. Assim, todos estes fatores têm incentivado pesquisas que visam à substituição deste tipo de combustível.

Diante ao exposto, foi elaborado um tratado para a diminuição dos gases poluentes no mundo, esse foi denominado de Protocolo de Quioto, o qual determina que os países industrializados devam reduzir suas emissões totais de gases de efeito estufa em pelo menos 5,2% abaixo dos níveis de 1990 no período de compromisso de 2008 a 2012 (UNITED NATIONS, 1998). Além disso, no ano de 2004, foi realizada a Conferência Mundial sobre Energias Renováveis, em Bonn (Alemanha). Esta conferência teve por objetivo definir o caminho a ser seguido para expandir o uso de energias renováveis. Os 154 países participantes ratificaram a importância da utilização das energias renováveis como forma de garantir o desenvolvimento sustentável, aumentar o acesso à energia principalmente pelos países pobres, reduzir as emissões de gases de efeito estufa e a poluição do ar (INTERNATIONAL CONFERENCE FOR RENEWABLE ENERGIES, 2004).

A biomassa está sendo uma fonte interessante de energia renovável, já que possui a flexibilidade de suprir as necessidades energéticas tanto para a produção de energia elétrica quanto para mover o setor de transportes. Uma característica importante

da biomassa energética é a capacidade de gerar empregos no meio rural e o balanço próximo à zero entre o lançamento e a absorção de carbonos na atmosfera, o que faz com que sua utilização seja tanto um vetor de inclusão social, quanto um instrumento conveniente para o atendimento das exigências, sempre crescentes, da legislação ambiental.

A Biomassa é a denominação genérica para todas as matérias de origem vegetal ou animal que podem ser aproveitadas como fonte de produção de calor ou eletricidade, como por exemplo, cana-de-açúcar, milho, beterraba, óleos vegetais, madeira. Ela também aparece na forma de resíduos agroindustriais, tais como restos de colheita e esterco animal, ou ainda como dejetos municipais e industriais (SOUZA et al, 2002).

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, representando 50% da biomassa terrestre (SARKO, 1997). O termo estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular (lamela média, paredes primária e secundária), constituída por uma matriz dura e fibrosa, onde fibras flexíveis, celulose, hemicelulose, também pectina, estão embebidas em uma matriz de lignina, uma macromolécula tridimensional de natureza aromática (Figura 1).

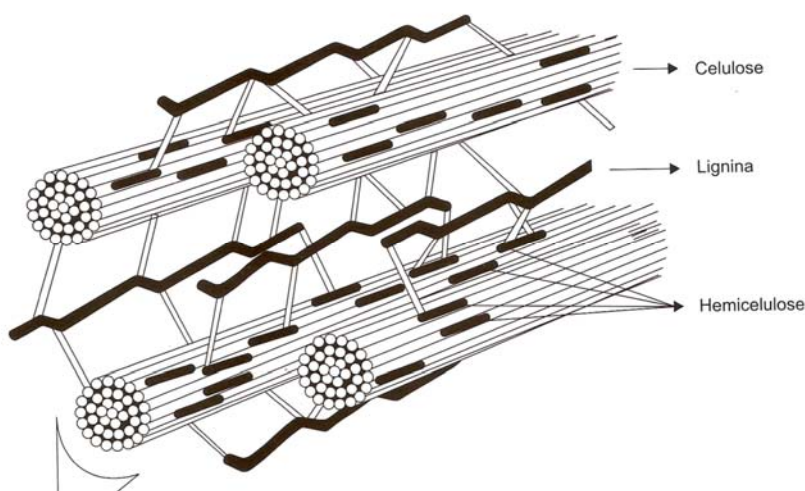


Figura 1- Esquema da estrutura lignocelulósica (SHLESER, 1994).

O grande desafio para viabilizar a produção de bioetanol de biomassas lignocelulósicas está na quebra da estrutura vegetal. A estrutura da fibra é composta de 40-50% de celulose, 20-40% de hemicelulose e de 10-25% de lignina. Estes materiais podem ser utilizados como substratos para processos fermentativos, pois mais de 70%

da matéria seca é constituída de carboidratos. O etanol pode ser obtido, então, a partir da fermentação destes açúcares, utilizando um catalisador biológico, como as leveduras (SAHA, 2003). Para isto, um pré-tratamento é essencial, principalmente quando se considera a hidrólise enzimática da biomassa, pois tem como finalidade alterar a sua estrutura nativa, facilitando a ação subsequente dos biocatalizadores. Os pré-tratamentos mais utilizados atualmente são os que utilizam soluções alcalinas ou soluções ácidas diluídas. Entretanto, estes pré-tratamentos podem gerar inibidores da fermentação. Logo, estudos devem ser feitos no sentido de otimizar as condições dos pré-tratamentos, aumentando o rendimento em carboidratos e diminuindo a formação de inibidores.

Atualmente, a degradação da biomassa lignocelulósica tem sido feita principalmente por processos físicos e químicos que podem gerar inibidores da fermentação. Como solução para este problema tem sido estudada a hidrólise dos carboidratos por enzimas celulasas e hemicelulasas, que juntamente com pré-tratamentos químicos adequados, disponibilizam a maior parte dos açúcares para fermentação e produção de álcool. Entretanto, as enzimas comerciais atualmente disponíveis são de alto custo o que inviabiliza a aplicação desta tecnologia. Portanto, a busca por novas fontes de enzimas capazes de contribuir para este processo é de grande interesse e tem grande apelo sócio-econômico.

OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de se aperfeiçoar as tecnologias de produção do bioetanol, a partir da fermentação de biomassas lignocelulósicas, buscando obter, em todas as etapas do processo, altos rendimentos e, conseqüentemente, diminuir os custos de produção, este trabalho teve como objetivos:

- i) produzir celulasas e hemicelulasas a partir de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, utilizando fontes indutoras de baixo valor econômico, como forrageira, bagaço de cana e farelo de trigo, além de caracterizar as enzimas que apresentaram alta atividade;
- ii) analisar várias condições de severidade do pré-tratamento ácido diluído a partir da quantificação de carboidratos na biomassa pré-tratada, dos açúcares redutores e dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural produzidos no hidrolisado, visando uma otimização das condições do pré-tratamento.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1.PANORAMA ENERGÉTICO

A demanda projetada de energia no mundo aumentará 1,7% ao ano, de 2000 a 2030, quando alcançará 15,3 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo (TEP, ou toe, na sigla internacional, em inglês) por ano, de acordo com o cenário base traçado pelo Instituto Internacional de Economia (MUSSA, 2003). Contraposto a essa realidade observamos as instabilidades políticas e sociais dos países produtores de petróleo, cujas reservas, dentro de algumas décadas, entrarão em depleção (GOLDEMBERG, 2004).

A Bristish Petroleum, em seu estudo “Revisão Estatística de Energia Mundial de 2004”, afirma que atualmente as reservas mundiais de petróleo durariam em torno de 41 anos, as de gás natural, 67 anos, e as reservas brasileiras de petróleo, 18 anos (<http://www.biodieselbr.com/energia/agro-energia.htm>).

Somada a essa dificuldade, constatamos as evidências de que o aquecimento global e, por consequência, o fenômeno das mudanças climáticas está efetivamente acontecendo nos mais distintos pontos do globo terrestre. Consolidando de forma reducionista a percepção de autoridades e cientistas, verifica-se que os extremos climáticos (secas, cheias, furacões, etc.) tornaram-se mais frequentes e mais severos. ASSAD et al. (2004) apresentaram modelos matemáticos, que projetam alterações profundas na temperatura do planeta e desastrosas consequências para o agronegócio.

Foi perante este contexto que aconteceu várias conferências mundiais, como a Rio-92, Convenção do Clima, Convenção das Partes – COP, Rio +10, Conferência Mundial sobre Energias Renováveis, entre outras. Os temas principais destas conferências foram sempre o meio ambiente e o desenvolvimento, sendo que seus principais objetivos foram introduzir metas concretas de sustentabilidade e deixar explícito a necessidade de investimentos financeiros para se buscar o desenvolvimento sustentável (GUARDABASSI, 2006).

Durante a Terceira Convenção das Partes (COP 3 – QUIOTO, 1997), foi adotado o Protocolo de Quioto, o qual se constitui de um tratado internacional com compromissos mais rígidos para a redução da emissão dos gases que provocam o efeito estufa, considerados, de acordo com a maioria das investigações científicas, como causa do aquecimento global. A redução das emissões deverá acontecer em várias atividades econômicas. O protocolo estimula os países signatários a cooperarem entre si, através de algumas ações básicas, tais como: reformar os setores de energia e transportes; promover o uso de fontes energéticas renováveis; eliminar mecanismos financeiros e de mercado inapropriados aos fins da Convenção; limitar as emissões de metano no gerenciamento de resíduos e dos sistemas energéticos; e, proteger florestas e outros sumidouros de carbono.

A Iniciativa Brasileira de Energia (Brazilian Energy Initiative - BEI) foi apresentada pelo Governo Federal durante a Rio + 10 e propôs que todos os países aumentassem para 10% a participação das energias renováveis em suas matrizes energéticas, até o ano 2010. Essa proposta foi adotada como um dos objetivos da Iniciativa Latino Americana e Caribenha para o Desenvolvimento Sustentável também apresentada na WSSD (PLATAFORMA DE BRASÍLIA SOBRE ENERGIAS RENOVÁVEIS, 2002).

Pode-se constatar que a questão das energias renováveis e do desenvolvimento sustentável tem sido tema recorrente e uma preocupação internacional. Como definido pela DECLARAÇÃO DE BRUNDTLAND (1987) os sistemas sustentáveis são aqueles capazes de “satisfazer as necessidades das gerações atuais sem comprometer as futuras, atendendo ao equilíbrio social e ecológico, bem como às necessidades dos mais pobres”; entretanto a dificuldade em determinar a sustentabilidade de um sistema energético é enorme e depende não apenas do recurso energético propriamente dito e sua origem, mas também da maneira como é empregado.

Neste contexto, as energias renováveis devem ser consideradas como uma grande oportunidade seja para redução das emissões de gases de efeito estufa e dos impactos ambientais associados, seja para a geração de energia em comunidades isoladas, contribuindo para a melhoria das condições sócio-econômicas dessas regiões. Lembrando-se que as fontes de energia precisam ser utilizadas de maneira sustentável, econômica e ambientalmente, para que possam garantir sua utilização de forma contínua e segura. Assim, as fontes renováveis são uma opção para a geração de energia

(eletricidade e calor) que provocam impactos ambientais reduzidos (se comparados a outras fontes) e substituem os combustíveis fósseis (GUARDABASSI, 2006).

Assim, o emprego de energias renováveis implica vantagens em diversas áreas, tais como:

- Aumento da diversificação da matriz energética de um país e a redução da sua dependência de combustíveis fósseis. Desta maneira não se fica tão vulnerável às oscilações dos preços do petróleo e às instabilidades políticas dos países produtores (COELHO, 2005).
- Redução dos gastos com importação de petróleo. No Brasil, com a implementação do Programa do Alcool o país economizou, entre 1975 e 2002, US\$ 52,1 bilhões em divisas (GOLDEMBERG et al., 2003).
- É uma das maneiras de reduzir a emissão de gases de efeito estufa, além de auxiliar na redução dos impactos ambientais locais, regionais e globais. A biomassa sustentável, bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, apresenta balanço nulo de emissões, pois as emissões resultantes da queima do bagaço são absorvidas e fixadas pela planta durante o seu crescimento.
- A geração de empregos diretos e indiretos, o que promove um ciclo virtuoso de aumento dos níveis de consumo e qualidade de vida, inclusão social, geração de mais atividades econômicas, fortalecimento da indústria local, promoção do desenvolvimento regional e a redução do êxodo rural (GOLDEMBERG, 2002).

A Figura 1.1 apresenta a evolução do consumo de energia primária no mundo, desde meados do século XIX, quando a Revolução Industrial deu início ao consumo dos combustíveis fósseis, e propõe um cenário para o ano 2100, no qual as energias renováveis serão as maiores responsáveis pelo suprimento das necessidades energéticas.

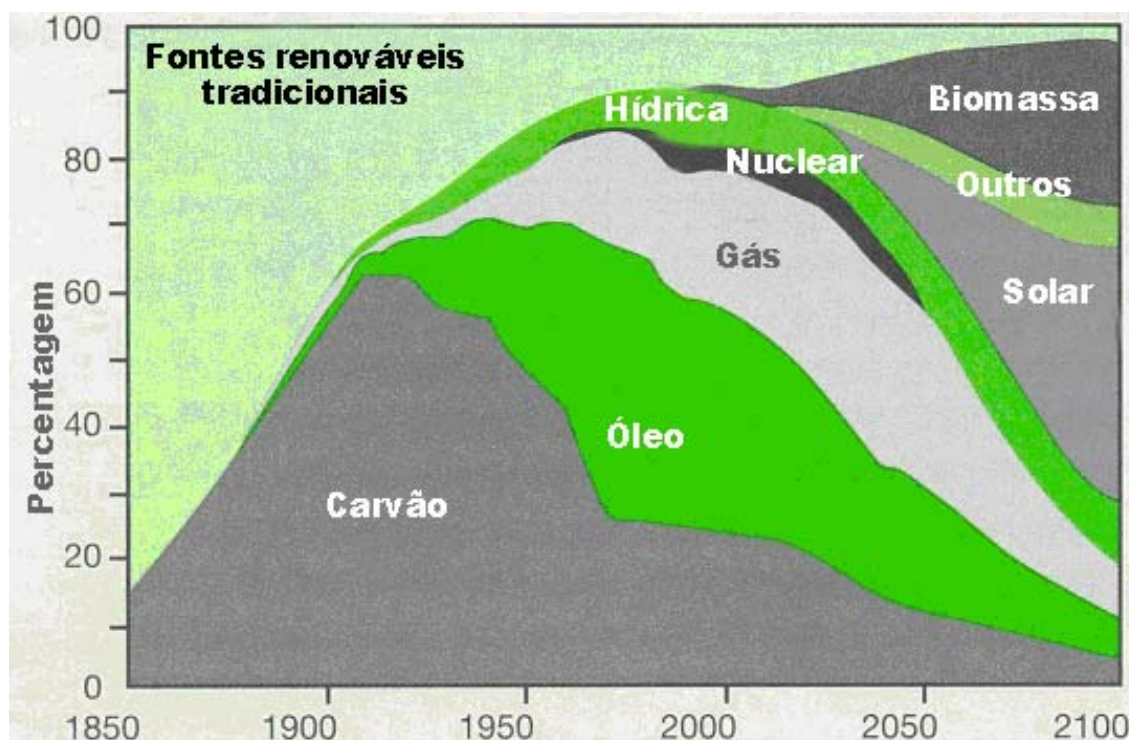


Figura 1.1 - Evolução da Demanda Mundial de Energia entre 1850 – 2100.

Fonte: UNDP; UNDESA; WEC (2000).

As principais barreiras existentes para a maior utilização das energias renováveis são de ordem econômica, pois as tecnologias empregadas são novas, ainda em desenvolvimento e por isso têm custo de implantação muito alto. Contudo, para que esta barreira possa ser superada é preciso suporte governamental e investimentos em tecnologia, para que possam alcançar ganhos de escala e se tornem economicamente competitivas (GOLDEMBERG, 2005).

Um dos exemplos mais importantes é a utilização de etanol como combustível no Brasil, onde as pesquisas em melhoramento das práticas industriais e agrícolas levaram ao incremento dos índices de rendimento, reduzindo o custo de produção do etanol e tornando-o competitivo frente à gasolina no Brasil e no mercado internacional (GOLDEMBERG et al., 2003).

1.2. BIOMASSA

Como o mundo se encontra diante de uma grave situação para o seu suprimento sustentável de energia, e este problema tem um número reduzido de soluções, principalmente no que tange aos combustíveis fósseis, cada país deverá, então,

concentrar esforços de imediato para que ele possa dispor da maior flexibilidade possível de opções no campo energético. Para tal, é essencial inverter o atual quadro de consumo, dependente de poucas fontes energéticas em fase de esgotamento, para uma estrutura de consumo na qual seja utilizado um maior número de alternativas, e dentre estas, principalmente para os países em desenvolvimento como o Brasil, é que surge a biomassa, que por ser renovável constitui a mais promissora fonte alternativa para uma situação de suprimento energético que só tende a se agravar (HALL, 1984).

Uma das grandes vantagens da biomassa é a variedade de formas de sua utilização. Pode-se usar biomassa como combustível na forma de gases, líquidos ou sólidos. É um material versátil e provavelmente o único combustível primário que, na forma de álcool ou óleo, pode substituir a gasolina ou o diesel nos carros e caminhões. Por sua versatilidade, pode-se escolher o material que seja mais adequado ao solo, ao clima, e às necessidades sócio-econômicas. O tempo necessário para a produção desses combustíveis pode variar de semanas a anos (GUARDABASSI, 2006).

Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, ou melhor, todo CO₂ liberado durante o uso da biomassa é absorvido novamente no processo de fotossíntese para sua formação. Todas as formas de matérias e resíduos derivados de plantas e animais sejam aquáticos ou terrestres, cuja composição primária é carbono, hidrogênio e oxigênio são conhecidos como biomassa (HALL, 1984).

A biomassa é utilizada como fonte de energia primária para cerca de 2,4 bilhões de pessoas em países em desenvolvimento (IEA, 2002). Observa-se assim que a biomassa é uma importante fonte de energia para estes países e que o modo como esse combustível é utilizado pode ser aperfeiçoado, por meio de tecnologias mais eficientes promovendo melhorias sócio-ambientais, tais como a redução dos níveis de poluição, aumento da qualidade de vida, geração de emprego e renda. O Brasil possui características especialmente adequadas à produção de biomassa para fins energéticos: clima tropical úmido, terras disponíveis, mão-de-obra rural abundante, carente de oportunidade de trabalho, e nível industrial tecnológico compatível (GUARDABASSI, 2006).

Um novo salto na oferta de biocombustíveis deverá ocorrer com o desenvolvimento das tecnologias de aproveitamento energético da biomassa. A análise da Figura 1.2, recentemente publicada, permite concluir que, uma vez superadas as

barreiras tecnológicas para o aproveitamento energético integral da biomassa, o Brasil consolidará ainda mais seu lugar de destaque no mundo na produção de biocombustíveis renováveis, em função da grande disponibilidade de terra adequada para a agricultura (GUIA EXAME, 2005). Assim, o Brasil pelo seu potencial na geração de matérias-primas renováveis, encontra-se em posição bastante privilegiada para assumir a liderança, no aproveitamento de biomassas; na disponibilidade para culturas agrícolas de grande extensão, intensa radiação solar; água em abundância e diversidade de clima e solo (BON & FERRARA, 2008).

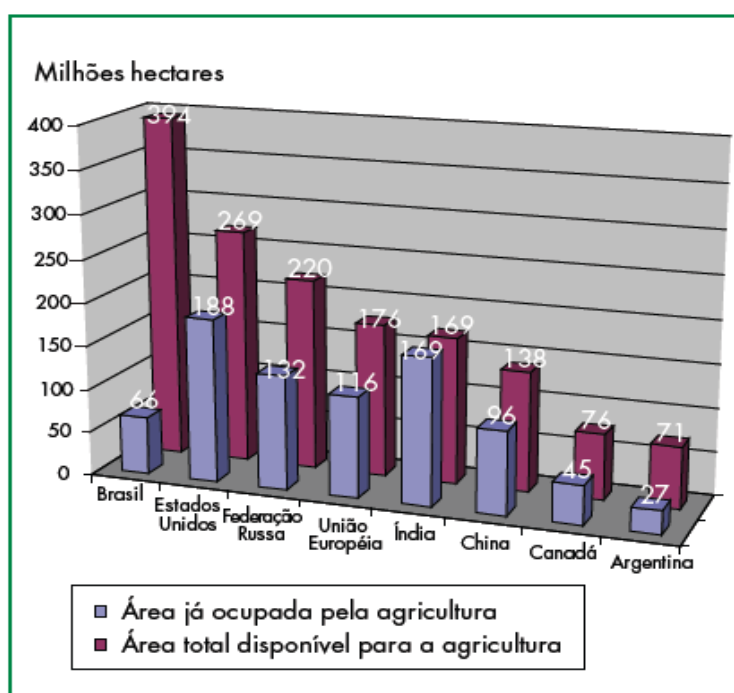


Figura 1.2 - Área disponível para a agricultura em alguns países do mundo.

1.2.1. Classificação da Biomassa

A biomassa é usada desde os tempos antigos como fonte de energia (lenha) das sociedades sem, no entanto, apoiar-se em produção sustentável. Por este motivo, durante muito tempo o termo biomassa foi associado à idéia de desmatamento. Somente no século XX teve início o uso da biomassa moderna, com programa do álcool no Brasil e a prática do reflorestamento para produção de madeira. Assim, pode-se dizer que existem duas categorias de biomassa: a tradicional, da qual fazem parte a lenha, o carvão vegetal, a palha e a casca de arroz, resíduos vegetais e animais; a biomassa

moderna, na qual estão inseridos os resíduos da utilização industrial da madeira, bagaço de cana, culturas energéticas e resíduos urbanos (LORA, 1997).

As chamadas “biomassas tradicionais” são aquelas não sustentáveis, utilizadas de maneira rústica, em geral para suprimento residencial (cocção e aquecimento de ambientes) em comunidades isoladas. Pode-se destacar a madeira de desflorestamento, resíduos florestais e dejetos de animais (KAREKESI et al., 2004). São consideradas “biomassas modernas”, madeira de reflorestamento, bagaço de cana-de-açúcar e outras fontes desde que utilizadas de maneira sustentável, utilizadas em processos tecnológicos avançados e eficientes (GUARDABASSI, 2006).

Existem diversas experiências com o uso de biomassa moderna; um exemplo são os biocombustíveis. No Brasil o Programa do Álcool, por meio da obrigatoriedade da utilização do etanol de cana-de-açúcar em todos os veículos leves do país, foi responsável pelo crescimento do setor sucroalcooleiro que promoveu o desenvolvimento tecnológico de processos industriais e da agroindústria, sendo responsável por 700 mil empregos diretos e mais 3,5 milhões de empregos indiretos (COELHO, 2005). Programas de utilização de biocombustíveis estão sendo disseminados pelo mundo, como mostra o exemplo da Colômbia onde legislação federal prevê a adição de 10% de etanol na gasolina, nas sete maiores cidades do país (GUARDABASSI, 2006).

1.2.2. Principais fontes de biomassa

O processo fermentativo é o mais viável economicamente para a produção de etanol, devido, principalmente, à grande variedade de matérias-primas naturais, açucaradas, amiláceas ou lignocelulósicas, que podem, direta ou indiretamente, servir de substrato para a fermentação alcoólica. Segundo BON et al. (2008), as matérias-primas para a produção de etanol podem ser classificadas em função da sua estrutura e complexidade molecular em:

i) matérias-primas açucaradas (sacarose, glicose, frutose e lactose), as quais são solúveis e facilmente extraídas da cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino e frutas, estão presentes no melaço e no soro do leite;

ii) matérias-primas amiláceas (grãos de milho, mandioca, trigo, cevada, batata) que contêm polissacarídeos insolúveis, necessitando pré-tratamento térmico para a solubilização e hidrólise;

iii) matérias-primas lignocelulósicas, insolúveis e recalcitrantes, necessitando de pré-tratamento de natureza mecânica, física ou química, seguido de hidrólise, preferencialmente enzimática, para produzir açúcares na forma de monômeros, substratos da fermentação alcoólica.

A biomassa lignocelulósica, um complexo que compreende vários polissacarídeos, é uma das matérias-primas mais promissoras, considerando sua grande disponibilidade e seu baixo custo (CARDONA, 2007).

Atualmente, quase todos os combustíveis de etanol são produzidos pela fermentação da glicose do milho nos Estados Unidos e da sacarose da cana de açúcar no Brasil. Entretanto, tem-se desenvolvido novas tecnologias para a produção de etanol de fontes não alimentícias, tornando-se uma realidade para os próximos anos (McDONALD et al., 2001).

1.2.3. Biomassa contendo sacarose

A cana-de-açúcar, tanto na forma de caldo de cana quanto na forma de melaço de cana, é uma das mais importantes matérias-primas utilizadas em países tropicais e subtropicais para a produção de etanol. Em países europeus, o melaço de beterraba é uma das matérias-primas contendo sacarose mais utilizadas. Além destes cultivos energéticos, o sorgo sacarino tem se tornado uma atraente matéria-prima, já que de seu talo pode ser extraído um suco contendo altas concentrações de sacarose. Além disso, o seu grão contém uma alta concentração de amido e o seu bagaço é uma importante fonte de biomassa lignocelulósica (WINNER NETWORK, 2002).

A conversão de sacarose em etanol, comparado com a biomassa de amido e lignocelulósica, é mais fácil, já que sua hidrólise prévia não é requerida, pois seu dissacarídeo pode ser facilmente metabolizado por células de leveduras fermentativas (CARDONA, 2007).

1.2.4. Biomassa contendo amido

A maioria da biomassa que contém amido pode ser usada como um substrato em potencial para produzir etanol a partir de processos microbiológicos, como, por exemplo, fermentação por leveduras. A matéria seca destas matérias-primas contém em torno de 60-75% de amido, que ao ser hidrolisado, gera um aumento significativo de hexose, estequiometricamente a relação de amido e glicose é de 9:10. Assim, este tipo de biomassa é considerada uma boa fonte de glicose em muitos processos fermentativos (JACKMAN, 1987).

A fermentação do amido é um pouco mais complexa que a fermentação de açúcares simples, já que o amido deve ser primeiramente convertido em açúcar monomérico, o qual pode ser convertido em etanol. O amido é inicialmente hidrolisado pela adição de α -amilases e então cozido a altas temperaturas (140-180°C). Posteriormente, o amido liquefeito é hidrolisado a glicose por glicoamilases. A glicose resultante é fermentada a etanol com a ajuda de microrganismos, produzindo CO₂ como co-produto. Durante o processo, o uso de altas temperaturas no cozimento aumenta efetivamente a eficiência de sacarificação do amido e aumenta os níveis de produção de etanol. Entretanto, os custos de produção são altos devido ao alto consumo de energia neste processo e da necessidade de altas quantidades de enzimas amilolíticas (Matsumoto et al., 1985, citado por LIN & TANAKA, 2006).

1.2.5. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma fonte alternativa de energia, pois além de ser renovável, ela está disponível ao longo do globo em grandes quantidades. Esta pode ser obtida de três fontes: madeira em tora tradicional, plantações de biomassa e resíduos de biomassa (FOODY & FOODY, 1991). A Tabela 1.1 mostra a composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 1.1 - Composição química parcial de algumas biomassas lignocelulósicas.

Biomassas Lignocelulósicas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Farelo de cevada	23	32,7	24,4	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	Cruz et al., 2000
Bagaço de cana	40,19	26,42	25,15	Neureiter et al., 2002
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato; Roberto, 2002
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido; Silva, 2002
Casca de aveia	30,51	28,63	23,09	Felipe et al., 2003
Palha de sorgo	34	44	20	Herrera et al., 2004
Hardwoods stems	40-55	24-40	18-25	Sun, 2002
Softwood stems	45-50	25-35	25-35	Sun, 2002
Forrageiras	45	31,4	12	Sun, 2002
Bambusa Vulgaris	59,5	22,8	19,7	Barrichello; Foelkel, 2000

(COUTO et al., 2004).

Este tipo de biomassa além de crescer com grande facilidade em quase todas as regiões, ela também tem uma grande vantagem de conter uma alta quantidade de fibras e uma baixa concentração de lignina. Assim, este tipo de plantação tem um potencial econômico para ser usada como fonte de biomassa.

De acordo com HAHN-HÄGERDAL e colaboradores (2006), existem diversas vantagens de se produzir biocombustíveis a partir de biomassas lignocelulósicas, são elas:

- As fontes de biocombustíveis são mais distribuídas geograficamente que os combustíveis fósseis;
- As matérias-primas lignocelulósicas minimizam o conflito potencial entre o uso da terra para a produção de alimentos ou para a produção de matérias-primas para a produção de combustíveis;
- Os resíduos de biomassa lignocelulósica são mais baratos que a matéria-prima agrícola;
- Os biocombustíveis geram menos quantidade de gases que causam o efeito estufa, reduzindo os impactos ambientais, particularmente as mudanças climáticas;
- Os biocombustíveis também poderiam prover emprego em áreas rurais.

Os resíduos de biomassa podem ser agrupados em duas categorias, resíduos primários e secundários. Os resíduos primários são os resíduos gerados de atividades industriais diretamente associados com florestas e agricultura (restos de madeira, palhas,

bagaço, etc.). Já os resíduos secundários são derivados de atividades domésticas, comercial e industrial (papel, materiais têxtil, madeira de demolição, etc.). O bioetanol obtido a partir de resíduos de biomassa lignocelulósica representa a segunda geração de biocombustíveis (DUFF & MURRAY, 1996).

Os resíduos que se mostram mais apropriados para pronto aproveitamento são aqueles gerados no cultivo da cana-de-açúcar, da indústria de papel e celulose e a serragem e gravetos da indústria madeireira e moveleira. Mais de 300 Mt de bagaço de cana são produzidos anualmente no mundo, em sua maior parte, eles são utilizados para produção de energia local, nas usinas produtoras de açúcar e álcool (<http://www.biodieselbr.com/energia/residuo/index.htm>).

CELULOSE:

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (GALDEANO, 2001).

HEMICELULOSE:

As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Consistem em cadeias ramificadas de açúcares, cujas as unidades incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e aldohexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. Contém também acetatos e substituintes como, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico, ácido D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não

contém regiões cristalinas, e é, portanto, mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas. A hemicelulose está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular e estabelece ligação entre a celulose e a lignina (BON, et al., 2008).

LIGNINA:

A lignina é um polímero vegetal derivado dos compostos fenólicos álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico, também chamados de monolignóis (Figura 1.3). Ela, juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular (FERRAZ, 2001).

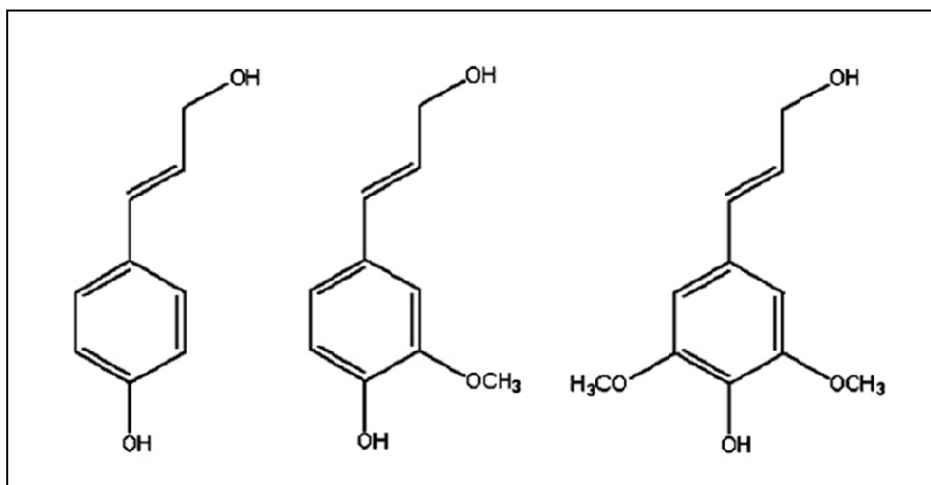


Figura 1.3: Estruturas dos compostos fenólicos precursores de lignina: álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico (SUHAS et al, 2007).

1.3. PRODUÇÃO DE ETANOL DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O bioetanol pode ser produzido de matérias-primas contendo açúcares fermentáveis como cana-de-açúcar e beterraba que são ricos em sacarose. Em adição, o bioetanol pode também ser produzido de alguns polissacarídeos que podem ser hidrolisados para obter açúcares livres, os quais podem ser convertidos em etanol. A

biomassa lignocelulósica é a matéria-prima mais promissora para a produção de bioetanol, considerando a grande disponibilidade e o baixo custo. Entretanto, a produção comercial do combustível etanol de materiais lignocelulósicos não tem sido implementada (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007).

O processo biológico para converter os materiais lignocelulósicos em etanol requer: (1) um pré-tratamento para quebrar a estrutura da lignina e hemicelulose e, assim, liberar uma celulose mais acessível à sacarificação; (2) despolimerização da celulose para produzir açúcares livres; (3) fermentação da glicose resultante para produzir etanol; e (4) Separação do etanol produzido (LEE, 1997).

O principal desafio para a conversão da biomassa em etanol é o passo do pré-tratamento. Devido à estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos, o pré-tratamento é requerido para a sua degradação, remoção da lignina, uma parcial ou total hidrólise da hemicelulose e uma diminuição da estrutura cristalina da celulose. Posteriormente, a celulose deve ser hidrolisada, sendo que a forma mais satisfatória para se fazer isto é a partir da hidrólise enzimática para obter glicose livre que é transformada em etanol por processos microbiológicos. Dependendo do microrganismo usado, as pentoses liberadas durante a hidrólise da hemicelulose podem ser convertidos em etanol tão bem quanto à glicose. Conseqüentemente, as tecnologias envolvidas nestes processos são mais complexas levando a um alto custo de produção de etanol comparando-se com a cana-de-açúcar, milho ou beterraba. Entretanto, o fato que muitos materiais lignocelulósicos são co-produtos de atividades agrícolas, resíduos industriais ou resíduos domésticos, eles oferecem uma enorme possibilidade de produção do combustível etanol em larga escala (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007).

1.3.1. Pré-tratamentos

A biomassa não-tratada é extremamente recalcitrante para digestão enzimática. Então, um grande número de tratamentos termoquímicos tem sido desenvolvido para melhorar a digestibilidade. O pré-tratamento rompe a parede celular da planta e melhora o acesso enzimático aos polissacarídeos. Vários estudos têm mostrado uma direta correlação entre a remoção de lignina e hemicelulose e a digestibilidade da celulose (GRAY et al., 2006). Assim, o pré-tratamento é requerido para modificar a

estrutura da biomassa lignocelulósica para fazer a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis, como apresentado na Figura 1.3. Um pré-tratamento eficiente, pode substancialmente reduzir o requerimento de enzimas no processo de sacarificação da celulose e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção (MOSIER et al., 2005).

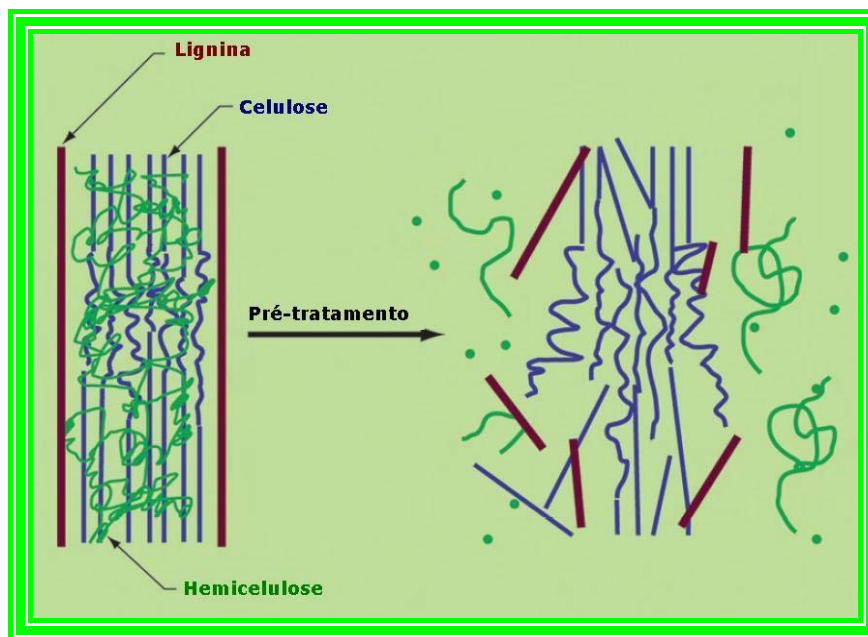


Figura 1.3 – Metas esquematizadas do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).

Vários processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido usados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Entretanto, os pré-tratamentos físicos gastam muita energia e são considerados muito caros, já os pré-tratamentos químicos não são muito caros e liberam uma maior quantidade de celulose como substrato, aumentando o rendimento do processo (McMILLAN, 1994). Os pré-tratamentos químicos variam de muito ácido para bastante alcalino, tendo assim, diferentes efeitos nos principais componentes da biomassa. Por exemplo, o pré-tratamento ácido hidrolisa a fração de hemicelulose, já os pré-tratamentos alcalinos tem mais efeito na estrutura da lignina. Os pré-tratamentos químicos também afetam a composição do açúcar no hidrolisado, por exemplo, o tratamento ácido pode resultar em altas concentrações de furfurais na fase líquida, sendo que os alcalinos podem resultar em altas concentrações de ferulato e acetatos no hidrolisado. Estes compostos presentes

no meio podem ter efeitos deletérios nos microrganismos fermentativos (GRAY et al., 2006).

Assim, os pré-tratamentos ideais têm que alcançar as seguintes exigências: (1) melhorar a formação de açúcares ou a habilidade subsequente destes açúcares sofrerem hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de carboidrato; (3) evitar a formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação; e (4) ser viável economicamente (SUN & CHENG, 2002). Os principais pré-tratamentos com um potencial aplicação industrial são citados a seguir.

ORGANOSOLV:

Os processos organosolv usam somente uma mistura de solventes orgânicos ou aquoso-orgânicos, podendo se adicionar um catalisador alcalino ou ácido, os quais rompem as ligações internas da hemicelulose e da lignina (STOCKBERGER, 1993). Os principais solventes orgânicos usados são acetona, metanol, etanol, glicol etileno, glicol trietileno e álcool tetrahidrofurfuril (THRING et al, 1990). Se o processo é conduzido em alta temperatura (185-210°C), não há a necessidade da adição de ácido, já que a liberação de ácidos orgânicos dos resíduos lignocelulósicos atua catalisando a ruptura do complexo de carboidrato-lignina. Entretanto, quando se usa a catálise ácida, tanto as frações de hemicelulose e lignina são solubilizadas. Quando usada como tecnologia de pré-tratamento, o processo organosolv gera três frações separadas: a lignina seca, a hemicelulose aquosa e uma relativa fração de celulose pura (DUFF & MURRAY, 1996). A fração de celulose do pré-tratamento é muito susceptível a hidrólise enzimática. Esta susceptibilidade aumenta com o aumento da eficiência de remoção da lignina, resultando no aumento da abertura dos poros presentes na estrutura da celulose (THRING et al, 1990).

EXPLOÇÃO COM VAPOR (STEAM EXPLOSION):

No pré-tratamento explosão com vapor, os resíduos lignocelulósicos são aquecidos em alta pressão. Durante este tratamento, o vapor d'água penetra nos resíduos e inicia uma reação de auto-hidrólise, onde os ácidos orgânicos inicialmente formados dos grupos acetila presentes nos resíduos catalisam a hidrólise principalmente da

hemicelulose. Depois de um tempo de reação específica, os resíduos sofrem uma decomposição explosiva. Logo, o pré-tratamento explosão com vapor é uma reação de auto-hidrólise química que remove hemicelulose, e, em menor quantidade, a lignina (DUFF & MURRAY, 1996).

Estudos com microscopia eletrônica, feitos por DONALDSON et al. (1988) mostraram que a porosidade aumentada dos resíduos lignocelulósicos depois de tratados por explosão com vapor é devido à combinação da remoção hidrolítica das hemiceluloses e da redistribuição da lignina.

GROUS e colaboradores (1986) demonstraram que 90% de cavacos de madeira tratados por explosão com vapor poderiam ser hidrolisados enzimaticamente em 24 horas, quando comparado com somente 15% de hidrólise dos mesmos tipos de cavacos não tratados. Pensava-se que o alto nível de digestibilidade provido por este tratamento era devido ao rompimento mecânico da cristalinidade da celulose durante a decomposição explosiva. Entretanto, foi demonstrado que cavacos de madeira que sofreram este tipo de tratamento com uma decomposição suave também eram muito propícios a sofrer hidrólise enzimática, assim como na decomposição explosiva (Brownell & Saddler, 1987, citado por DUFF & MURRAY, 1996).

As variáveis importantes neste tipo de pré-tratamento são o tempo de reação, a temperatura, a umidade e o tamanho dos resíduos lignocelulósicos. Uma boa solubilização e hidrólise da hemicelulose podem ser feitas com uma alta temperatura e um curto tempo de reação (270°C por 1 minuto) ou baixa temperatura e um longo tempo de reação (190°C por 10 minutos); isto vai depender do tamanho dos resíduos que serão usados. Quando são usados resíduos lignocelulósicos maiores, o tempo de cozimento é aumentado e a temperatura é diminuída, assim, evita-se um supercozimento, que está associado com a formação de inibidores. É também importante que os resíduos não contenham um excesso de umidade, pois se tiver água nos poros da hemicelulose, o vapor irá se penetrar rapidamente, e não ocorrerá transferência do calor, a qual deve ser por condução. Assim, esta lenta transferência da temperatura faz com que demore a ocorrer a auto-hidrólise (SADDLER et al., 1993).

GROUS et al. (1986) adicionaram dióxido de carbono no reator para obter grande pressão e observou que melhorou a digestibilidade do tratado. Isto porque o dióxido de carbono reagiu, em altas temperaturas, com o vapor condensado produzindo ácido carbônico, o qual aumenta a reação de auto-hidrólise. Melhorias similares têm

sido observadas quando os resíduos lignocelulósicos são impregnados com baixas quantidades de dióxido sulfuroso ou ácido sulfúrico (DUFF & MURRAY, 1996).

O pré-tratamento de explosão com vapor é reconhecido como um dos melhores processos custo-efetivo para folhosas (hardwoods) e resíduos de agricultura, mas menos efetivo para as coníferas (softwoods). Outras limitações incluem uma destruição parcial da fração de xilana, uma destruição incompleta da lignina e a geração de uma grande quantidade de compostos inibitórios para microrganismos, usados em processos subseqüentes (Clark & Makie, 1987, citado por DUFF & MURRAY, 1996).

PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DILUÍDO:

Ácidos diluídos também podem ser utilizados para hidrólise parcial de materiais lignocelulósicos. Este procedimento, chamado pré-hidrólise, consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, que é mais susceptível ao tratamento ácido, sendo que as frações de celulose e lignina permanecem inalteradas. Ácidos tais como sulfúrico, clorídrico e acético são comumente empregados como catalisadores nestes processos (AGUILAR et al., 2002).

De acordo com SUN & CHENG (2002) há dois tipos de tratamentos de hidrólise com ácidos diluídos: alta temperatura (maior que 160° C), processo contínuo e baixa carga de sólidos (5 a 10% massa de substrato / massa da mistura reacional) e baixa temperatura (menor que 160° C) processo em batelada e alta carga de sólidos (10 a 40%). Estes tratamentos permitem alcançar elevados rendimentos sendo que em temperaturas elevadas há favorecimento da hidrólise da celulose.

Os ácidos utilizados como catalisadores nos processos de hidrólise liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas. O rompimento destas ligações libera uma série de compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose e arabinose. São liberados também produtos indesejáveis para o processo fermentativo tais como furfural, proveniente da degradação de pentoses e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) oriundo da desidratação de hexoses, havendo ainda formação de ácido fórmico pela degradação de compostos derivados do furano (furfural ou 5-HMF) e de ácido levulínico produzido a partir da degradação de 5-HMF. São gerados ainda ácido acético proveniente dos grupos acetil, compostos não estruturais correspondentes à fração extrativa e produtos de degradação

da lignina (fenóis e outros compostos aromáticos) e metais pesados como cromo, cobre, ferro e níquel provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise. Uma vez presentes no hidrolisado, estes compostos são inibidores potenciais do metabolismo microbiano (TAMANINI & HAULY, 2004).

As variáveis que devem ser analisadas nos tratamentos com ácidos diluídos são: o tipo de ácido a ser usado (H_2SO_4 ; HCl ; HNO_3 e H_3PO_4), a concentração destes ácidos (podem variar de 0,5-10%), temperatura ($98-260^{\circ}C$), a relação sólido líquido ($1:20 \leq S:L \leq 1:4$) e o tempo de exposição (podem variar de segundos até horas) (McMILLAN, 1994).

HIDRÓLISE ALCALINA:

Algumas bases podem ser usadas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito deste tratamento depende do conteúdo de lignina nestes materiais (McMILLAN, 1994). O mecanismo de hidrólise alcalina ocorre devido a uma saponificação das ligações ester cruzadas intermolecular entre hemiceluloses e outros componentes, por exemplo, entre hemiceluloses e lignina. A porosidade dos materiais lignocelulósicos aumenta com a remoção destas ligações cruzadas. O tratamento com NaOH diluído causam um inchamento, levando a um aumento na área da superfície interna, uma diminuição no grau de polimerização, uma diminuição da cristalinidade, uma separação da ligação estrutural entre lignina e carboidratos e um rompimento da estrutura da lignina (SUN & CHENG, 2002).

1.3.2. Sacarificação enzimática

1.3.2.1 Celulases

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases, as quais são altamente específicas. Tanto bactérias quanto fungos podem produzir celulases para a hidrólise de resíduos lignocelulósicos, sendo que estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesofílicos ou termofílicos. As bactérias que podem produzir celulases são: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Termomonospora*, *Ruminococcus*,

Bacteriodes Erwinia, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* (SUN & CHENG, 2002). As bactérias *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* tem sido extensamente estudada para a produção de celulases. Embora muitas bactérias celulíticas, particularmente as celulíticas anaeróbias como as *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*, produzem celulases com alta atividade específica, mas elas não produzem altos títulos de enzimas. Além disso, as bactérias anaeróbias crescem em taxas muito menores e requerem condições de crescimento anaeróbico, por isso, muitas pesquisas para a produção de celulases comerciais têm preferido os fungos (DUFF & MURRAY, 1996).

Os fungos que tem sido reportado para produzir celulases incluem: *Scelerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*. Dentre todos estes gêneros de fungos, o *Trichoderma* foi o mais extensamente estudado para a produção de celulases (Sternberg, 1976, citado por DUFF & MURRAY, 1996).

As celulases são usualmente uma mistura de várias enzimas. Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise são: (1) endoglicanases (EG, endo-1,4-D-glicanohidrolase, ou EC 3.2.1.4) que atacam regiões de baixa cristalinidade nas fibras de celulose criando cadeias terminais redutoras e não-redutoras livres; (2) exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4-β-D-glicano-celobiohidrolase, ou EC 3.2.1.91) que degradam a cadeia terminal livre formando unidades de celobiose; (3) β-glicosidase (celobiase ou EC 3.2.1.21) que hidrolisa a celobiose para produzir glicose. Em adição aos três maiores grupos de enzimas celulases, existem também um número de enzimas auxiliares que atacam as hemiceluloses, como as glicouronidase, acetilesterase, xilanase, β -xilosidase, galactomanase, acetilesterase e manase (SUN & CHENG, 2002).

Os diferentes organismos celulíticos têm evoluído para produzir um arranjo de celulases que, por meio de diferentes modos de ação e especificidade de substrato, permitem explorar substratos bastante heterogêneos. Por exemplo, o fungo *Trichoderma reesei* produz quatro endoglicanases e duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII). As CBHI e CBHII de *Trichoderma reesei* são imunologicamente distintas, analisadas por anticorpos policlonais. As unidades de celobiose repetitivas da celulose ocorrem em duas formas estequiométricas diferentes, levando a hipótese que existem duas formas esterioespecíficas de endoglicanases. Esta multiplicidade de formas de celulases

fúngicas poderia ser provocado por uma glicosilação diferencial ou proteólise parcial. Além disso, a partir da clonagem gênica, sabe-se que existe um número limitado de genes de celulase. Logo, a multiplicidade desta enzima deve ser, em grande parte, por modificações pós-traducionais (DUFF & MURRAY, 1996).

O exato mecanismo da hidrólise da celulose não é conhecido, embora um número de possíveis modelos tenha sido proposto. Entretanto, sabe-se que as celulases atuam de maneira corporativa ou sinérgica. A forma corporativa começa quando as endoglicanases abrem a molécula linear de celulose, produzindo extremidades redutoras e não-redutoras que podem ser atacadas pela exoglicanases. Assim, as exoglicanases atuam removendo pequenas cadeias de celulose e expondo mais sítios internos para as endoglicanases poderem se ligar. A atividade de todas as celulases, em particular a CBHI, é inibida pela celobiose. Logo, a clivagem da celobiose em glicose pela β -glicosidase reduz grandemente esta inibição permitindo a continuidade da atividade celulítica (GOYAL et al., 1991). A degradação da celulose cristalina também requer a ação sinérgica entre as endoglicanases e as exoglicanases, pois as exoglicanases rapidamente remove as unidades de celobiose recentemente criadas das extremidades formadas pela ação das endoglicanases, prevenindo, assim, a re-formação das ligações glicosídicas (LEE, 1997). A figura 1.5 esquematiza a ação dessas enzimas sobre celulose.

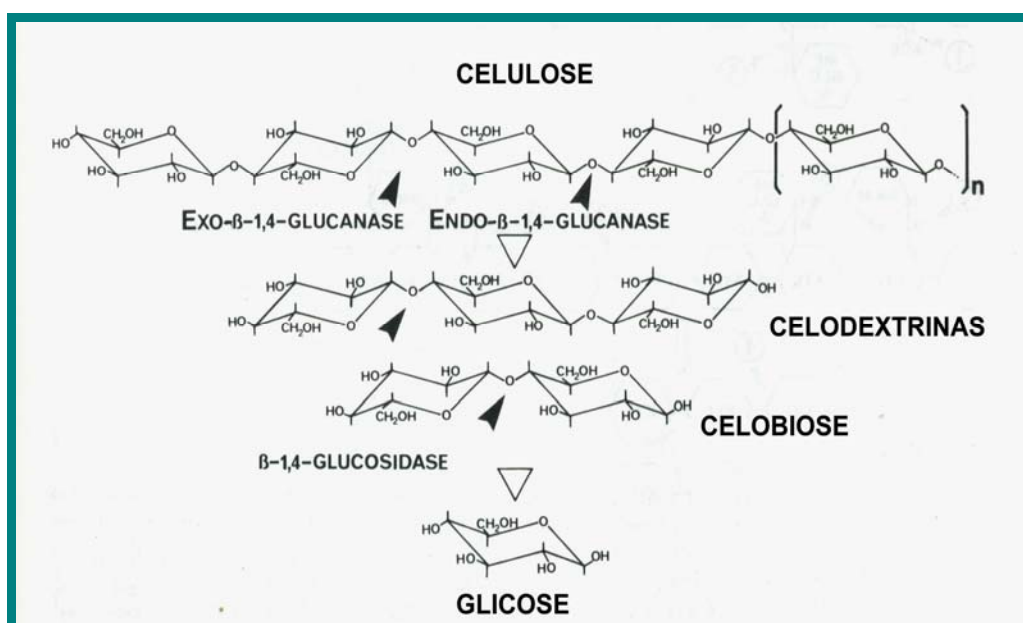


Figura 1.4 - Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose (MALBURG et al., 1992).

O modelo sinérgico das enzimas endo-exoglicanases clássico ainda está sendo elucidado em estudos com fungos ou bactérias celulolíticas, entretanto, a heterogeneidade e multiplicidade dos componentes da celulase mostram uma grande diversidade de possíveis interações sinérgicas. Estudos envolvendo purificação, determinação da sequência e estrutura das celulases mostra interações homólogas e sinérgicas de componentes específicos da enzima. Várias observações destes estudos serviram para mostrar que o modelo original está sendo super-simplificado (HENRISSAT & BAIROCH, 1993). Uma destas observações é que a CBHI de *T. reesei* pode degradar a celulose altamente cristalina sem a ajuda das endoglicanases. Em contraste, a atividade de CBHII é bastante específica a extremidades não-redutoras e trabalha sinérgicamente com as endoglicanases. Além disso, MEDVE et al. (1994) mostraram que CBHI e CBHII competem pelos sítios de ligação, contrapondo-se a hipótese que estas duas CBHs trabalhavam sinérgicamente.

A hidrólise enzimática da celulose consiste em três passos: adsorção das enzimas celulases sobre a superfície da celulose, a biodegradação da celulose em açúcares fermentáveis e a desorção da celulose. A atividade de celulase pode diminuir durante a hidrólise, o que pode estar relacionado com a adsorção irreversível da celulase na celulose. A adição de surfactantes durante a hidrólise pode causar uma modificação das propriedades da superfície da celulose e minimizar a ligação irreversível da celulase na celulose (WU & JU, 1998).

Segundo GRAY e colaboradores (2006), as celulases frequentemente contêm módulos que se ligam ao carboidrato (CBMs), os quais facilitam a interação da enzima com a superfície do substrato. Semelhantemente aos domínios catalíticos das glicosil-hidrolases, as CBMs são divididas em famílias que possuem sequências de aminoácidos e estruturas similares. Assim, sutis diferenças na estrutura das CBMs podem levar a modificações na especificidade do ligante. Durante a ligação do substrato a superfície cristalina da celulose, as CBMs expõem os seus domínios catalíticos para o substrato específico e aumentam a eficiência catalítica. Em adição, tem sido proposto que as CBMs podem ser capazes de romper a estrutura dos polissacarídeos e, assim, aumentar a taxa de hidrólise.

1.3.2.2 Hemicelulases

A característica heteropolissacarídica das hemiceluloses torna complexo o mecanismo de ataque enzimático. Das enzimas conhecidas, as endoxilanases (EC 3.2.1.8) são as mais estudadas. Para degradação da xilana serão necessárias basicamente seis enzimas diferentes. As endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam aleatoriamente o esqueleto de xilana enquanto as β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam os monômeros de xilose a partir das extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos e xilobiose (COLLINS et al, 2005).

A remoção das cadeias laterais deste polímero requer a enzima específica para o tipo de grupo a ser hidrolisado. As enzimas necessárias para esta hidrólise são α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterases (EC 3.1.1.73), *p*-ácido cumárico esterases (EC 3.1.1.-) e α -galactosidases (EC 3.2.1.22) (JEFFRIES, 1994). A Figura 1.5 ilustra o polímero e as enzimas que atuam para sua degradação.

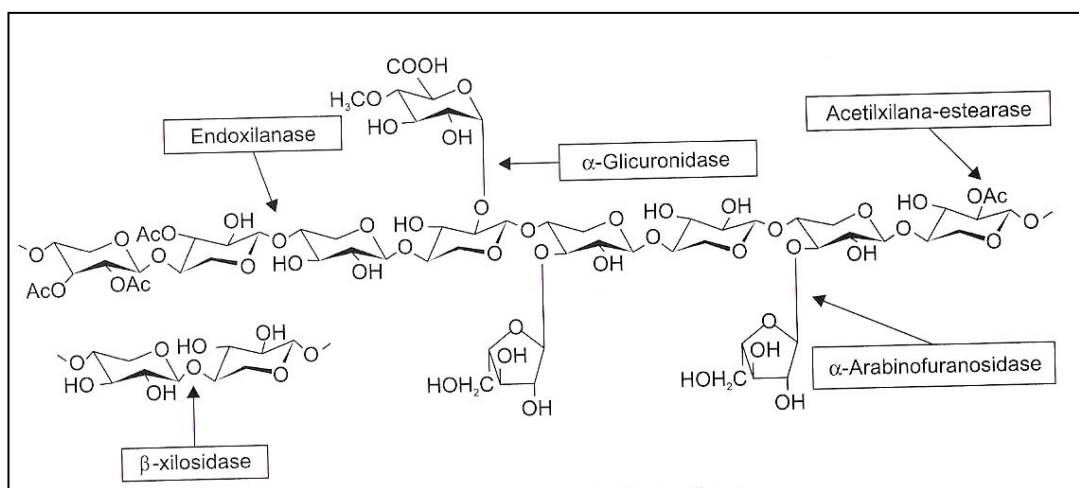


Figura 1.5 – Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana (SUNNA & ANTRANIKIAN (1997)).

1.3.3. Hidrólise enzimática

No processo de hidrólise enzimática, a mistura de celulasas, que pode ser aumentada com β -glicosidase, é adicionada na solução contendo a celulose pré-tratada, como, por exemplo, por ácido diluído. A concentração de substrato raramente deve exceder a 10% (p/v) devido a problemas de saturação enzimática. A taxa de hidrólise aumenta de forma não-linear até a um ponto em que todos os sítios de ligação das celulasas estão saturados com o substrato. Na prática, dependendo do tipo de substrato que está sendo hidrolisado, a quantidade da enzima celulase pode variar de 7 a 33 FPU. g⁻¹ de substrato. Geralmente, uma grande quantidade de enzima é requerida quando a hidrólise é conduzida em uma reação em batelada, onde não há previsão de remoção do açúcar formado. Neste caso, onde existe grande quantidade de açúcares, é crucial adicionar quantidades suficientes de β -glicosidase para converter a celobiose, que é muito inibitória, em glicose, que é menos inibitória para as celulasas (DUFF & MURRAY, 1996).

A hidrólise é usualmente conduzida em pH de aproximadamente 4-8 e a temperatura de 45-50°C. A temperatura de hidrólise é bem abaixo da temperatura de crescimento de muitos microrganismos, incluindo *T. reesei*, assim não ocorrerá perdas de carbono (substrato) devido ao crescimento de microrganismos contaminantes. A solução de hidrólise deve ser suavemente agitada, pois uma agitação intensa pode causar perda de enzimas. A taxa inicial de hidrólise é relativamente alta, entretanto, ela começa a declinar devido a efeitos combinados de inibição pelos produtos finais e perda da atividade da enzima. A hidrólise em batelada é usualmente conduzida por 3-4 dias para alcançar uma possível concentração máxima de glicose (GOYAL et al., 1991).

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática são: (1) concentração de substrato – é um dos fatores que mais afetam a taxa inicial e o rendimento da hidrólise enzimática da celulose. Em baixos níveis de substrato, um aumento na concentração de substrato, normalmente resulta em um aumento no rendimento e na taxa de hidrólise. Entretanto, altas concentrações de substrato podem causar o efeito de inibição por substrato, que substancialmente diminui a taxa de hidrólise, sendo que a extensão da inibição por substrato depende da relação substrato total e enzima total (CHEUNG & ANDERSON, 1997). Além disso, a susceptibilidade dos substratos celulósicos para as celulasas

(fatores estruturais), os quais pode se citar a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área de superfície e a concentração de lignina, também podem alterar a taxa de hidrólise (McMILLAN, 1994); (2) concentração da enzima – Um aumento na dosagem de celulasas no processo, numa certa extensão, pode aumentar o rendimento e a taxa de hidrólise, mas aumentaria significativamente os custos do processo (SUN & CHENG, 2002); (3) presença de inibidores – a atividade da celulase é inibida pela celobiose e, em menor extensão, pela glicose; e (4) condições de reação (temperatura, pH, outros).

1.3.4. Fermentação

A fermentação etanólica é um processo biológico em que matérias orgânicas são convertidas por microrganismos em compostos simples. Estes compostos simples são então fermentados pelos microrganismos para produzir etanol e CO₂. Vários estudos e revisões têm sido publicados, relatando a produção de microrganismos que fazem fermentação etanólica. Assim, várias bactérias, leveduras e fungos usados para a produção de etanol estão sendo reportados (LIN & TANAKA, 2006).

Os microrganismos mais comumente usados para produzir etanol a partir de amido e sacarose são as leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, que pode produzir etanol em altas concentrações. As leveduras têm a flexibilidade de crescer em um meio contendo açúcares simples, como a glicose, e em meio contendo dissacarídeos sacarose.

Os açúcares derivados da biomassa lignocelulósica é uma mistura de hexose (principalmente glicose) e pentoses (principalmente xilose) e a maioria das cepas selvagem de *S. cerevisiae* não são capazes de metabolizar xilose. Logo, várias pesquisas têm sido feitas com o propósito de aumentar o rendimento da fermentação etanólica derivadas de açúcar da biomassa. Um modo de fazer isto seria adicionar nas leveduras e em outros etanologênicos naturais uma rota metabólica adicional para fermentar pentose por métodos da engenharia genética. Além disso, os hidrolisados derivados da biomassa tendem a ter inibidores da fermentação (ácido acético, furfural, etc.), os quais devem ser removidos quando estão em altas concentrações ou, então, requerer o desenvolvimento de cepas resistentes a estes inibidores (GRAY et al., 2006).

Os microrganismos encontrados que fermentam xilose são geralmente bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As bactérias anaeróbicas fermentam pentoses, mas elas são inibidas precocemente com baixas concentrações de açúcar e etanol. A levedura que fermenta naturalmente a xilose, como a *Pichia stipitis* CBS 6054, fermenta a xilose em etanol com um rendimento e produtividade razoáveis, entretanto estas cepas de levedura são altamente inibidas pelos os compostos gerados durante o pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2004). Os fungos filamentosos podem tolerar estes inibidores, mas o processo de fermentação etanólica é muito lento para serem usados em processos comerciais competitivos. Logo, muitos esforços têm sido feitos para obter cepas recombinantes de bactérias e leveduras que podem ser usados na fermentação industrial de materiais lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Assim como muitos microrganismos, a *S. cerevisiae* metaboliza glicose pela rota de Embden-Meyerhof (EM). Sendo que a rota de Entner-Doudoroff (ED) é um meio adicional de consumo de glicose em muitas bactérias, como a *Zymomonas*. O alto rendimento e produtividade observados pelas *Zymomonas* são conseqüências da sua fisiologia única. *Zymomonas* é o único microrganismo que metaboliza glicose anaerobicamente usando a rota ED que contrapõe a rota EM ou glicolítica (MATTHEW et al., 2005).

O metabolismo da glicose via ED rende um mol de ATP por mol de glicose, enquanto as leveduras metabolizam glicose anaerobicamente via glicólise (EM) e obtém dois mols de ATP por mol de glicose. Logo, o uso da rota ED pela *Zymomonas* é o grande motivo da sua importância industrial, já que o baixo rendimento de energia na rota força a bactéria a manter altas taxas de conversão de glicose em etanol em um esforço para manter seu crescimento. Além disso, a *Zymomonas* apresenta uma outra característica importante como fermentar glicose em quantidades equimolares de etanol e CO₂, assim, o substrato glicose não é perdido, como ocorre com as leveduras, as quais também produzem co-produtos como glicerol e outros álcoois superiores (DUFF & MURRAY, 1996). Entretanto, devido a sua robustez, a levedura *S. cerevisiae* ainda é preferida pelas indústrias para a produção de etanol. Todas as enzimas envolvidas na fermentação são expressas constitutivamente, sendo que as enzimas fermentativas compreendem mais que 50% da quantidade de proteínas total da célula (LIN & TANAKA, 2006).

A biotransformação da celulose em etanol também pode ser conduzida por várias bactérias anaeróbicas termofílicas, como a *Clostridium thermocellum*, tão bem como em alguns fungos filamentosos, incluindo *Monilia* sp., *Neurospora crassa*, *Neurospora* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma viride* e *Paecilomyces* sp. Entretanto, estudos mostram que os processos de fermentação que utilizam estes microrganismos são muito lentos (3-12 dias) com um baixo rendimento (0,8-60 g/L de etanol) (PASTORE et al., 1994). Isto ocorre porque estes microrganismos possuem uma baixa resistência para altas concentrações de álcool etílico. Outra desvantagem destes microrganismos (principalmente no caso das bactérias fermentativas) é que eles produzem vários co-produtos, principalmente ácido acético e lático (LIN & TANAKA, 2006).

PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES

2.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse em celulases e hemicelulases tem aumentado devido às muitas aplicações desses tipos de enzimas, como por exemplo, na indústria têxtil e nas indústrias de papel e celulose. Aliado a isto, o crescente consenso sobre a escassez dos combustíveis fósseis, do aumento da emissão dos gases de efeito estufa e da poluição do ar causada pela combustão incompleta dos combustíveis fósseis, tem resultado em intensas pesquisas para produção de bioetanol a partir de biomassas lignocelulósicas (JORGENSEN et al., 2003). Entretanto, para tornar o processo de produção de bioetanol viável economicamente, as enzimas que são usadas na hidrólise da matéria-prima precisam ter suas eficiências aumentadas e seus custos reduzidos. Consequentemente existe um grande interesse em se obter novas celulases e hemicelulases mais específicas e estáveis utilizando-se fontes indutoras de baixo custo.

A celulose é um polímero linear de glicose que pode ser hidrolisado pela ação de endoglicanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), exoglicohidrolases (EC 3.2.1.74) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Já a hemicelulose é um polímero ramificado e heterogêneo de pentoses e hexoses. As xilanas são as maiores hemiceluloses encontradas neste polissacarídeo. A hidrólise enzimática completa da xilana requer a ação das enzimas endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), além de várias enzimas acessórias, como as α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glicuronidase (EC 3.2.1.139), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), acetilxilana esterase (3.1.1.72) e ácido ferulítico esterase (EC 3.1.1.73), as quais são necessárias para hidrolisar os vários substituintes da xilana (SAHA, 2003).

Sabe-se que muitos fungos filamentosos são bons produtores de celulases e hemicelulases, especialmente o fungo *Trichoderma reesei*, cujo complexo celulolítico tem sido detalhadamente estudado devido a sua grande capacidade de secretar grandes quantidades destas enzimas. Entretanto, os fungos *Aspergillus* e *Penicillium* spp. também são capazes de produzir um sistema completo de celulases e hemicelulases, mas eles não têm sido muito estudados para este propósito (JØRGENSEN et al., 2003; STEINER et al., 1996).

Assim, a proposta deste estudo foi investigar a capacidade de três espécies de fungos (*Aspergillus niger* LTB, *Aspergillus glaucus* LTB e *Penicillium expansum* LABQ) de produzir celulases e hemicelulases em cultura submersa. Fontes de carbono de baixo custo, como forrageira, bagaço de cana e farelo de trigo, foram testadas para a produção das enzimas. O objetivo foi, então, avaliar a produção de celulases (FPase, celobiase, endoglicanase e aril- β -glicosidase) e de hemicelulases (α -galactosidase, L-arabinofuranosidase, β -xilosidase e xilanase), assim como a caracterização das enzimas que apresentaram alta atividade.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Materiais

Os substratos p -nitrophenil- α -D-galactopiranosídeo (p NPGal), p -nitrophenil- β -D-glicopiranosídeo (p -NPGlc), p -nitrophenil- α -L-arabinofuranosídeo (p NPAr) e p -nitrophenil- β -D-xilopiranosídeo (p NPXyl) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A xilana de birch wood e a celobiose foram comprados da Sigma Chemical Co. (Germany and USA, respectivamente). Os substratos forrageira (*Brachiaria brizantha* cv. xaraés) e o bagaço de cana (*Saccharum* spp.) foram obtidos em unidades experimentais da Universidade Federal de Viçosa, já o farelo de trigo foi comprado no comércio local. O corte da forrageira foi realizado em março de 2008, com uma intensidade de 20 cm e na frequência de 95% de interceptação da luz. As biomassas foram secadas em estufa a 105°C e moídas.

2.2.2. Meio e condições de cultivo dos fungos

Os fungos *Aspergillus niger* LTB, *Aspergillus glaucus* LTB e *Penicillium expansum* LABQ foram isolados a partir de bagaço de cana em decomposição, no Laboratório de Análises Bioquímicas da Universidade Federal de Viçosa e cedidos para este experimento. Os fungos foram repicados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubados em câmeras tipo B.O.D. a 27°C por 7 dias.

Os três fungos estudados foram cultivados em cultura submersa (SC) e o meio mineral utilizado continha 0,2% de extrato de levedura, 0,3% NaNO₃, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,01% FeSO₄.7H₂O, 0,1% K₂HPO₄ e 1,5% da fonte de carbono (forrageira, bagaço de cana ou farelo de trigo). O pH do meio mineral foi ajustado para 6,0. Frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio mineral, foram inoculados com 10⁶ esporos/mL de meio. Os Erlenmeyers foram acondicionados em “Shaker”, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm e alíquotas diárias foram retiradas durante 15 dias. Posteriormente, estas alíquotas foram centrifugadas a 3,500g, durante 30 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

2.2.3. Ensaio enzimáticos

- **Atividades de α -L-arabinofuranosidase, α -galactosidase, β -xilosidase e aril- β -glicosidase:** consistiram de 500 μ L de tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0), 250 μ L do extrato enzimático e 250 μ L de soluções dos substratos 2 mM pNP Ara, pNP Gal, pNP Xyl, pNP Glc, respectivamente. A reação foi conduzida em banho-maria por 20 min a uma temperatura de 40 °C. Ao final do tempo estipulado, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μ moles de pNP, utilizando uma curva padrão construída com 0-0,2 μ moles de pNP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ M.
- **Atividade de xilanase:** utilizou-se 900-990 μ L de xilana birchwood 1% (em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) e 10-100 μ L do extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria por 10 min a uma temperatura de 40°C. A

reação foi paralisada com a adição de 1 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e colocada em banho fervente por 5 min para o desenvolvimento da cor (MILLER, 1956). O DNS tem a função de reagir com os açúcares redutores (produtos da reação enzimática), formando um composto colorido que tem forte absorção em 540 nm. A quantificação dos produtos foi realizada através de uma curva de calibração, construída com 0-2 μ moles de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1 g/L de glicose.

- **Atividade de endoglicanase:** consistiu de 800 μ L de uma solução de carboximetilcelulose 0,625% (m/v), diluído em tampão citrato pH 6,0, e 200 μ L do extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria por 60 minutos à 50°C. A reação foi paralisada com 1 mL de DNS, como explicado anteriormente.
- **Atividade celulásica total (FPase):** foi determinada utilizando-se como substrato papel de filtro Whatman nº1. Tiras de aproximadamente 1x5 cm (40 mg) foram incubadas a 50°C com 1,4 mL de tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 100 μ L do extrato enzimático. Após 60 min de incubação, a hidrólise foi interrompida com 1 mL de DNS e seguiu-se a quantificação por este método, como descrito anteriormente.
- **Atividade de celobiase:** utilizou-se 10-100 μ L do extrato enzimático, o qual foi pré-incubado com 400-490 μ L de celobiose 8mM, em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, por 30 min a 50°C. A reação foi paralisada pela imersão dos tubos de ensaios em água fervente por 5 min, seguido de uma nova incubação, em água gelada, para redução da temperatura do meio de reação. Ao final desta primeira etapa, 0,5 mL do reativo de glicose oxidase foi adicionada à reação. A mistura foi novamente incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 15 min. Os valores de absorbância foram tomados a 510 nm e convertidos em concentração de glicose, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 – 0,15 μ moles de glicose.

Os valores de atividade enzimática foram expressos na Unidade Internacional (U), sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose, xilose e ρ -nitrophenol (ρNP) por minuto.

2.2.4. Caracterização enzimática

2.2.4.1. Efeito do pH

A influência do pH sobre a taxa de hidrólise das enzimas analisadas foi avaliada. As atividades enzimáticas foram determinadas em uma faixa de pH variando de 3 a 8. Para a determinação dos valores de pH ótimos, para cada enzima, a temperatura de incubação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.2.3, exceto que, os ensaios foram realizados em diferentes valores de pH, utilizando-se tampões citrato-fosfato (McILVAINE, 1921). Além disso, o tempo de incubação para todos os ensaios enzimáticos foi de 20 min.

2.2.4.2. Efeito da temperatura

A influência da temperatura sobre a taxa de hidrólise das enzimas analisadas também foi avaliado. Para a determinação das temperaturas ótimas, para cada enzima, as misturas de reação foram as mesmas descritas no item 2.2.3, exceto que, os ensaios foram conduzidos em diferentes temperaturas, compreendidas entre 20 e 80° C e o tempo de incubação para todos os ensaios foi de 20 min.

2.2.4.3. Análise da termoestabilidade

Para a investigação da estabilidade térmica das enzimas analisadas, foram pré-incubadas amostras das enzimas por períodos de tempos variados à temperatura de maior atividade. A estabilidade térmica de cada enzima foi analisada medindo-se a atividade residual, a partir dos ensaios padrão descritos no item 2.2.3, exceto para o tempo de incubação da reação que foi de 20 min.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1. Produção das enzimas

Os resultados da produção enzimática dos fungos *Aspergillus niger* LTB, *Aspergillus glaucus* LTB e *Penicillium expansum* LABQ crescidos em cultura submersa são mostrados nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, respectivamente.

- ***α -L-arabinofuranosidase***

O *Penicillium expansum* LABQ foi o único fungo que apresentou atividade de α -L-arabinofuranosidase quando se utilizou farelo de trigo como fonte de carbono, sendo que a maior atividade desta enzima foi detectada no sétimo dia de crescimento do fungo (0,01 U/mL) (Tabela 2.3). Entretanto, para os outros fungos analisados, nenhuma das fontes de carbono utilizadas foram bons indutores desta enzima.

JØRGENSEN e colaboradores (2006) testaram a produção de celulases e hemicelulases por três espécies de *Penicillium* visando avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono (celulose Solka-Floc 200 FCC, xilana oat spelts e xilana birchwood) e concluíram que a produção de α -L-arabinofuranosidase foi maior quando as xilanas foram utilizadas como fontes de carbono. Entretanto, para as três espécies, a atividade específica desta enzima foi duas vezes maior quando se utilizou a xilana oat spelts ao invés da birchwood, apresentando atividade máxima com 120-160 horas de crescimento, já que a xilana oat spelts é uma arabinoxilana e a birchwood é uma glicuranoxilana.

A cepa *Thermomyces lanuginosus* produziu uma atividade máxima de 0,11 U/mL quando crescida em xilana oat spelts durante 7 dias (SINGH, et al, 2000) e *Trichoderma reesei* crescido em polpa de beterraba mostrou uma atividade máxima de arabinofuranosidase de 0,02 U/mL (OLSSON, et al, 2003). Assim, comparando os resultados do presente trabalho com os resultados de outros autores, pode-se concluir que para a produção de altas quantidades de α -L-arabinofuranosidase, seria mais indicado o uso da molécula de hemicelulose pura como fonte de carbono, o que não foi feito no presente trabalho.

Tabela 2.1 – Atividades enzimáticas do fungo *Aspergillus niger* LTB em cultura submersa.

Fonte de carbono	p-NPA (0,25mM)	p-NPGal (0,25mM)	p-NPXil (0,25mM)	p-NPGlc (0,25mM)	CMC (0,5%)	FP (40 mg)	Xil (1%)	CB (8mM)
Forrageira	ns	0,001 ¹ /0,07 ¹⁰ /0,05 ¹⁵	0,008 ¹ /0,06 ¹³ /0,05 ¹⁵	0 ¹ /0,05 ¹¹ /0,03 ¹⁵	0,014 ¹ /0,91 ⁸ /0,07 ¹⁵	0,2 ¹ /0,73 ¹⁰ /0,7 ¹⁵	4,8 ¹ /79,8 ⁹ /36 ¹⁵	0,003 ¹ /5,7 ¹⁴ /5,7 ¹⁵
Bagaço de cana	ns	0 ¹ /0,02 ¹² /0,002 ¹⁵	ns	0 ¹ /0,01 ¹² /0 ¹⁵	ns	0 ¹ /0,01 ¹¹ /0 ¹⁵	0,03 ¹ /0,16 ¹³ /0,03 ¹⁵	0 ¹ /0,007 ¹¹ /0 ¹⁵

Tabela 2.2 – Atividades enzimáticas do fungo *Aspergillus glaucus* LTB em cultura submersa.

Fonte de carbono	p-NPA (0,25mM)	p-NPGal (0,25mM)	p-NPXil (0,25mM)	p-NPGlc (0,25mM)	CMC (0,5%)	FP (40 mg)	Xil (1%)	CB (8mM)
Forrageira	ns	0 ¹ /0,05 ¹³ /0,03 ¹⁵	ns	0/0,01 ¹⁰ /0,1 ¹⁵	0,01 ¹ /0,04 ⁹ /0,02 ¹⁵	0,01 ¹ /0,4 ¹¹ /0,2 ¹⁵	0,7 ¹ /3,7 ⁵ /0,6 ¹⁵	ns
Bagaço de cana	ns	ns	ns	ns	0,007 ¹ /0,01 ⁹ /0 ¹⁵	0,01 ¹ /0,03 ⁵ /0,01 ¹⁵	0,14 ¹ /0,31 ¹³ /0,2 ¹⁵	0,002 ¹ /0,005 ¹³ /0 ¹⁵

- ❖ Todas as atividades foram expressadas em U/mL.
- ❖ **p-NPA**: substrato para a atividade da α -L-arabinofuranosidase; **p -NPGal**: substrato para a atividade de α -galactosidase; **p -NPXil**: substrato para a atividade de β -xilosidase; **p -NPGlc**: substrato para a atividade da β -glicosidase; **CMC**: substrato para a atividade da endoglicanase; **FP**: substrato para a atividade da FPase; **Xil**: substrato para a atividade de xilanase (com xilana birchwood); **CB**: substrato para a atividade de celobiase.
- ❖ Todos os desvios padrões foram menores que 10%.
- ❖ ns: valores não significativos
- ❖ O número subscrito indica o primeiro dia de crescimento do fungo (dia 1), o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável) e o ultimo dia analisado (dia 15).

Tabela 2.3 – Atividades enzimáticas do fungo *Penicillium expansum* LABQ em cultura submersa.

Fonte de carbono	p-NPA (0,25mM)	p-NPGal (0,25mM)	p-NPXil (0,25mM)	p-NPβGlc (0,25mM)	CMC (0,5%)	FP (40 mg)	Xil (1%)	CB (8mM)
Forrageira	ns	0,002 ¹ /0,003 ⁸ /0,002 ¹⁵	0,002 ¹ /0,003 ¹⁵ /0,003 ¹⁵	0 ¹ /0,003 ¹⁰ /0 ¹⁵	0 ¹ /0,001 ¹⁰ /0 ¹⁵	0,004 ¹ /0,05 ⁶ /0,2 ¹⁵	0 ¹ /14,6 ¹³ /4,5 ¹⁵	0 ¹ /0,006 ¹⁴ /0,003 ¹⁵
Farelo de trigo	0 ¹ /0,01 ⁷ /0 ¹⁵	0 ¹ /0,02 ¹¹ /0 ¹⁵	0 ¹ /0,001 ¹⁵ /0,001 ¹⁵	ns	ns	0,0003 ¹ /0,04 ⁹ /0,03 ¹⁵	0,06 ¹ /1,03 ¹⁰ /0,3 ¹⁵	0,003 ¹ /0,005 ¹² /0,002 ¹⁵

- ❖ Todas as atividades foram expressadas em U/mL.
- ❖ **p-NPA**: substrato para a atividade da α-L-arabinofuranosidase; **p -NPGal**: substrato para a atividade de α-galactosidase; **p -NPXil**: substrato para a atividade de β-xilosidase; **p -NPβGlc**: substrato para a atividade da aril-β-glicosidase; **CMC**: substrato para a atividade da endoglicanase; **FP**: substrato para a atividade da FPase; **Xil**: substrato para a atividade de xilanase (com xilana birchwood); **CB**: substrato para a atividade de celobiase.
- ❖ Todos os desvios padrões foram menores que 10%.
- ❖ ns: valores não significativos
- ❖ Os números subscritos indicam: o primeiro dia de crescimento do fungo (dia 1), o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável) e o ultimo dia analisado (dia 15).

- ***α-galactosidase***

Para todos os fungos analisados, os níveis de α -galactosidase foram maiores quando se utilizou a forrageira *Brachiaria* como fonte de carbono, apresentando seu máximo de atividade no décimo dia de crescimento do fungo *Aspergillus niger* LTB (Tabela 2.1). Quando se utilizou o bagaço de cana, o *A. glaucus* LTB não produziu quantidades significativas desta enzima (Tabela 2.2). Tanto a *Brachiaria* quanto o farelo de trigo induziram a produção de α -galactosidases em *P. expansum* LABQ, entretanto, o farelo de trigo produziu uma atividade enzimática de forma mais significativa, tendo um pico de atividade no décimo primeiro dia de crescimento (0,02 U/mL) (Tabela 2.3).

AGUIAR & MENEZES (2000) avaliaram a produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus niger* IZ-9 crescidos sobre bagaço de cana tratado quimicamente por hidróxido de sódio 4% e não tratado (*in natura*). Esses autores verificaram que quando esta biomassa é pré-tratada a indução da síntese da maioria das enzimas é maior, pois com o tratamento químico as moléculas de hemicelulose ficam mais “disponíveis” aos microrganismos, induzindo uma maior produção de enzimas. Logo, com uma biomassa *in natura* a indução de hemicelulases é mais difícil, o que também foi verificado no presente trabalho.

- ***β-xilosidase***

Tanto a forrageira *Brachiaria* quanto o bagaço de cana não induziram significativamente o fungo *Aspergillus glaucus* LTB a produzir xilosidase (Tabela 2.2). O *A. niger* LTB, quando cultivado em meio contendo a *Brachiaria* como fonte de carbono, produziu xilosidase com máxima atividade de 0,06 U/mL (Tabela 2.1). Tanto a *Brachiaria* quanto o farelo de trigo foram capazes de induzir a produção de xilosidase em *P. expansum* LABQ, apesar de terem baixas atividades (Tabela 2.3). A baixa produção de xilosidase nos fungos testados usando as diferentes fontes de carbono poderia ser explicada pelo fato dessa enzima precisar de um tempo maior para ser produzida, já que primeiramente há a necessidade da atuação das endo-xilanases para liberar os pequenos oligossacarídeos, os quais posteriormente seriam hidrolisados pela β -xilosidase. Além disso, JØRGENSEN et al. (2005) ao testarem celulose Solka-Floc,

xilana oat spelts e xilana birchwood como fonte de carbono para três espécies de *Penicillium*, concluíram que a atividade de β -xilosidase aumentou em torno de 20 vezes quando se utilizou as hemiceluloses como fonte de carbono em comparação à mistura dos três substratos.

- ***Aril- β -glicosidase***

A fonte de carbono que mais induziu a produção de aril- β -glicosidase foi a forrageira *Brachiaria*, sendo que o *A. niger* LTB foi o que apresentou maior atividade enzimática, com um pico de atividade no décimo primeiro dia (0,05 U/mL) (Tabela 2.1). Além disso, o fungo *A. glaucus* LTB também foi capaz de produzir a enzima utilizando esta fonte de carbono (0,01 U/mL), mas apresentou atividades menores em comparação com a *A. niger* LTB (Tabela 2.2). O fungo *P. expansum* LABQ também produziu aril- β -glicosidase utilizando-se *Brachiaria* como fonte de carbono, entretanto, o valor máximo de atividade enzimática foi muito baixo (0,003 U/mL) (Tabela 2.3).

No presente trabalho, poderia ser usado um tempo de incubação maior para se obter níveis mais altos de atividade, visto que esta enzima é uma das últimas a atuarem na hidrólise desses carboidratos. Nos estudos de BISARIA et al. (1997), foram obtidos níveis de atividade para aril- β -glicosidase de 0,6 U/mL, após 15 dias de incubação, por *Pleurotus sajor caju* cultivado em palha de arroz.

Segundo LATIF et al. (1995), atividades enzimáticas de 0,14 U/mL de aril- β -glicosidase foram obtidas por *Sporotrichum thermophile* crescido sobre resíduos de forrageira (*Leptochloa fusca*), enquanto *Chaetomium thermophile*, *Humicola grisea* e *Torula thermophila* tiveram baixas atividades enzimáticas sobre este substrato. Dentre vários substratos lignocelulósicos, a forrageira foi comparada à palha de trigo ou de arroz e ao bagaço de cana, sendo considerada melhor para a produção de aril- β -glicosidase. Este resultado também foi observado no presente trabalho, visto que a *Brachiaria* foi a fonte de carbono que mais induziu a produção desta enzima.

XIMENES et al. (1996) produziram aril- β -glicosidase do fungo *Aspergillus fumigatus* utilizando várias fontes de carbono (glicose, manose, xilose, lactose, celobiose, xilana, rafinose, Avicel, palha de trigo, CMC, papel de filtro e algodão) e seus resultados mostraram que a maior atividade desta enzima foi obtida quando se utilizou a palha de trigo como substrato (10,4 U/mL). Além disso, a adição de 0,5% de

glicose ao meio contendo papel de filtro aumentou a atividade enzimática substancialmente, entretanto, a atividade caiu drasticamente quando se adicionou 1% de glicose. Logo, a atividade de aril- β -glicosidase mostrou ser inibida por glicose (XIMENES et al., 1996). Este fato poderia explicar no presente trabalho, a não indução da enzima quando se utilizou o bagaço de cana como indutor, pois este poderia conter ainda, resíduo de açúcares redutores, como a glicose.

- ***Endoglicanase***

Para todos os fungos, a maior atividade de endoglicanase foi obtida quando se utilizou a forrageira *Brachiaria* como fonte de carbono, em especial, o *Aspergillus niger* LTB apresentou uma alta atividade com esta fonte de carbono (0,91 U/mL) no seu oitavo dia de crescimento (Tabela 2.1). O *Aspergillus glaucus* LTB também produziu endoglicanase quando se utilizou o bagaço de cana, entretanto, com atividades menores (Tabela 2.2). Já o fungo *P. expansum* LABQ foi o que mostrou menor potencial de produção desta enzima utilizando *Brachiaria* como fonte de carbono (0,001 U/mL) e não apresentou atividade quando se utilizou o farelo de trigo (Tabela 2.3).

JØRGENSEN et al. (2005) testaram a produção de celulases e hemicelulases em três espécies de *Penicillium* (*Penicillium pinophilum* IBT 4186, *P. persicinum* IBT 13226 and *P. brasilianum* IBT 20888) cultivados em celulose pura, em xilana oat spelts, em xilana birchwood e na mistura dos três substratos. Eles observaram que a atividade da endoglicanase era maior quando se utilizava a celulose pura. Além disso, eles também testaram a concentração do substrato, assim, ao variarem a concentração da celulose de 20 para 40 g/L a atividade desta enzima não variou significativamente, mantendo-se em torno de 90 U/mL. Assim, considerando-se que no presente trabalho se usou como fonte de carbono uma biomassa *in natura* e com uma concentração de 1,5% (m/v), o fungo *Aspergillus niger* LTB apresentou uma boa atividade de endoglicanase (0,91 U/mL).

Da mesma forma que no presente trabalho, a baixa atividade de endoglicanase quando se utilizou o bagaço de cana como fonte de carbono também foi observada por MENEZES et al. (2005), que estudaram a utilização dessa biomassa para a produção de enzimas lignocelulolíticas a partir do fungo *Pleurotus tailandia*.

- **Atividade de papel de filtro - FPase**

O fungo *A. niger* LTB e *A. glaucus* LTB apresentaram alta atividade de FPase quando crescidos em meio contendo forrageira *Brachiaria* como fonte de carbono, tendo picos de atividades no décimo (0,73 U/mL) e no décimo primeiro dia (0,4 U/mL) de crescimento, respectivamente. No meio de cultivo contendo bagaço de cana, o *A. niger* LTB e o *A. glaucus* LTB apresentaram atividade de FPase menores, com atividade máxima de 0,01 U/mL no décimo primeiro dia e de 0,03 U/mL no quinto dia de crescimento, respectivamente (Tabela 2.1 e Tabela 2.2). O fungo *Penicillium expansum* LABQ apresentou atividade de 0,05 U/mL no meio contendo *Brachiaria* como fonte de carbono, com máxima atividade no sexto dia. No meio de cultivo contendo farelo de trigo, a atividade máxima de 0,04 U/mL foi observada no nono dia de crescimento do fungo (Tabela 2.3).

Segundo LATIF et al. (1995), atividade enzimática de 0,4 U/mL de FPase foi obtida por *Aspergillus fumigatus* crescido sobre resíduo de forrageira (*Leptochloa fusca*). Logo, observando os resultados obtidos por eles e o resultado deste trabalho, as plantas da família das gramíneas parecem ser boas indutoras de celulases, em especial, de FPase, por fungos do gênero *Aspergillus*, o que poderia ser explicado pelo baixo teor de lignina presente nessas plantas, em comparação às outras biomassas lignocelulósicas, como, por exemplo, o bagaço de cana.

Segundo MENEZES & HENNIES (1994), a atividade celulítica de linhagens fúngicas, como *Aspergillus niger*, desenvolvidas em bagaço de cana foi superior às atividades daquelas cultivadas em carboximetilcelulose e papel de filtro. Eles sugeriram que estas linhagens produzem a fração exoglicanásica, uma vez que o bagaço é uma celulose *in natura* e não havia recebido qualquer tratamento químico, exigindo a ação pré-hidrolítica da exoglicanase antes de ser hidrolizada pelas frações endoglicanase e β -glicosidase. No presente trabalho, as atividades das celulases de *A. niger* LTB e *A. glaucus* LTB também foram altas em forrageira, entretanto a atividade exoglicanásica não foi mensurada.

AGUIAR & MENEZES (2000) estudaram a produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana com e sem tratamentos químicos. Eles verificaram que a produção de FPase foi maior em

bagaço de cana tratado com solução de hidróxido de sódio a 4% e neutralizado com lavagens sucessivas com água destilada. Atividades de FPase acima de 0,25 U/mL (bagaço tratado) e de aproximadamente 0,15 U/mL (bagaço não tratado) foram alcançadas após 168 horas. Possivelmente o maior teor de lignina no bagaço sem tratamento tenha dificultado a indução da atividade enzimática. O resultado obtido no presente trabalho foi inferior ao observado por AGUIAR & MENEZES (2000) quando se utilizou o bagaço de cana (sem tratamento) como substrato, entretanto, a concentração do bagaço usado no trabalho citado foi de 4%, enquanto que neste trabalho a concentração foi de 1,5%. Além disso, as condições e o meio de cultivo do fungo foram diferentes, o que possivelmente explica a diferença dos resultados.

Neurospora crassa produziu 0,23 U/mL de FPase quando cultivado em meio líquido contendo 1% de palha de trigo como fonte de carbono (ROMERO et al., 1999). LIMING & XUELIANG (2004) otimizaram a produção de celulase por uma cepa mutante de *Trichoderma reesei* em cultura submersa utilizando sabugo de milho como fonte de carbono. O máximo rendimento de FPase foi obtido depois de 168 horas quando o fungo foi cultivado com 4% da fonte de carbono. Eles obtiveram 5,2 U/mL de FPase, com um rendimento de 213,4 U/g. O rendimento máximo de FPase obtido no presente trabalho foi de 48,7 U/g, o qual foi alcançado, no décimo dia de crescimento, por *Aspergillus niger* LTB quando se utilizou 1,5% (m/v) de forrageira como fonte de carbono.

- ***Xilanase***

Em todas as fontes de carbono testadas, a xilanase foi encontrada em quantidades significativas. Entretanto, as maiores atividades dessa enzima foram obtidas quando se utilizou a forrageira *Brachiaria* como fonte de carbono, destacando-se o fungo *A. niger* LTB, que apresentou altíssima atividade no seu nono dia de crescimento (79,8 U/mL) (Tabela 2.1). Para os outros fungos analisados, a atividade de xilanase também foi alta quando se utilizou esta biomassa como fonte de carbono. O *A. glaucus* LTB apresentou atividade máxima de 3,7 U/mL no quinto dia de crescimento e o *P. expansum* LABQ apresentou seu pico de atividade no décimo terceiro dia de crescimento (14,6 U/mL) (Tabela 2.2 e Tabela 2.3). Quando o bagaço foi utilizado como fonte de carbono, o fungo *A. glaucus* LTB foi o que apresentou maior atividade,

sendo seu pico no décimo terceiro dia de crescimento (0,31 U/mL) (Tabela 2.2), já o fungo *A. niger* LTB apresentou atividade menor nesta fonte de carbono, sendo sua máxima atividade também no décimo terceiro dia de crescimento (0,16 U/mL) (Tabela 2.1). Pode-se dizer também que o farelo de trigo foi um bom indutor desta enzima para o fungo *P. expansum* LABQ, apresentando alta atividade no décimo dia de crescimento (1,03 U/mL) (Tabela 2.3).

Considerando que a *Brachiaria* utilizada como fonte de carbono no presente trabalho é uma biomassa *in natura*, os resultados de atividade enzimática de xilanase obtidos pelo fungo *A. niger* LTB são bastante consideráveis (79,8 U/mL), visto que SHAH & MADAMWAR (2005) utilizaram como fonte de carbono a hemicelulose pura (xilana birchwood 1%), obtendo atividade máxima de 210 U/mL no terceiro dia de cultivo ao avaliarem a produção de xilanase em cultura submersa a partir de um novo isolado de *Aspergillus foetidus*. Já *Hymenoscyphus ericae*, um fungo endofítico, produziu duas formas de xilanases (5,8 U/mL) em meio líquido com xilana oat spelts (BURKE & CAIRNEY, 1997). *Rhizopus oryzae* produziu, no sexto dia de crescimento, 0,39 U/mL de atividade usando xilana 1% como fonte de carbono; e em 2% de sabugo de milho o fungo produziu uma atividade de 2,8 U/mL de xilanase depois de cinco dias de cultivo. A partir de *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo, foi obtido por fermentação submersa em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, atividade enzimática de 98 U/mL para xilanase (MILAGRES et al., 1994). Além disso, LATIF et al. (1995), ao analisarem a produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus fumigatus* crescidos sobre resíduos de forrageira (*Leptochloa fusca*), obtiveram atividade enzimática de 3,5 U/mL de xilanase, valor bem inferior ao obtido neste trabalho pelo fungo *A. niger* LTB.

O rendimento de xilanase obtido neste trabalho por *A. niger* LTB foi de 5320 U/g. O fungo *P. expansum* LABQ também apresentou um alto rendimento em xilanase quando cultivado com forrageira (973,3 U/g) e com farelo de trigo (68,7 U/g). Resultado inferior a este foi obtido por *Aspergillus oryzae*, o qual produziu 2675 U/g de xilanase em condições otimizadas de fermentação em estado sólido sobre bagaço de cana, e por *Penicillium echinulatum*, que produziu 10 U/g de xilanase quando crescido em farelo de trigo e bagaço de cana pré-tratados (SZENDEFY et al., 2006). Já *Pycnoporus coccineus*, um basidiomiceto, produziu atividade de 135 U/mL de xilanase

crescidos com cascas de banana como fonte de carbono em fermentação em estado sólido (ELISASHVILI & KACHLISHVILI, 2008).

O alto rendimento de xilanase obtido por *A. niger* LTB usando a forrageira *Brachiaria brizantha* pode ser explicado pelo baixo teor de lignina presente neste substrato, assim como pelo meio e pelas condições de crescimento do fungo, que possivelmente são favoráveis à produção desta enzima.

- ***Celobiase***

Assim como a aril- β -glicosidase, a celobiase é uma β -glicosidase (EC 3.2.1.21), diferindo apenas na especificidade pelo substrato. No presente trabalho, analisou-se, além da atividade da aril- β -glicosidase, a ação da β -glicosidase (ou celobiase) utilizando um substrato natural, a celobiose.

Foi observado que o fungo *A. niger* LTB cultivado em *Brachiaria* como fonte de carbono apresentou alta atividade de celobiase, sendo o pico de máxima atividade (5,7 U/mL) no décimo quarto dia de crescimento, mantendo-se constante até o último dia de crescimento (décimo quinto dia) (Tabela 2.1). Já o *A. glaucus* LTB não apresentou atividade de celobiase quando crescido em *Brachiaria* (Tabela 2.2) e o *P. expansum* LABQ apresentou baixa atividade nesta fonte de carbono (0,006 U/mL) e quando crescido com farelo de trigo (0,005 U/mL) (Tabela 2.3). O bagaço de cana não foi um bom indutor de celobiase para o *A. niger* LTB e para o *A. glaucus* LTB, pois em ambos os fungos, as atividades celobiásicas encontradas foram muito baixas. Resultados maiores que 5,7 U/mL poderiam ser obtidos pelo *A. niger* LTB se o tempo de crescimento fosse aumentado, visto que a celobiase é uma das últimas enzimas a atuarem na hidrólise da celulose, necessitando primeiramente da ação das endo e exoglicanases e das celobiohidrolases para liberar os resíduos de celobiose, e que as máximas atividades desta enzima foram obtidas nos últimos dias de crescimento.

Comparando o resultado de celobiase do fungo *A. niger* LTB crescido com forrageira e o de aril- β -glicosidase obtido nas mesmas condições de cultivo, pode-se perceber que a atividade da celobiase, obtida a partir de um substrato natural, foi consideravelmente maior (5,7 U/mL) que a atividade de aril- β -glicosidase (0,05 U/mL), obtida quando se usou substrato sintético (pNPGlc). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, ao longo da evolução, a celobiase sofreu uma seleção natural no meio

onde é produzida pelo fungo, tornando-se “especializada” em hidrolisar a celobiose, que é o seu substrato natural. XIMENES et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a atividade de aril- β -glicosidase e da celobiase por *Aspergillus fumigatus* crescido em diferentes substratos (glicose, manose, xilose, lactose, celobiose, xilana, rafinose, Avicel, palha de trigo, CMC, papel de filtro e algodão). Em todas as fontes de carbono testadas por eles a atividade de celobiase foi maior.

2.3.2. Caracterização enzimática

2.3.2.1. Efeito do pH e da temperatura

A caracterização enzimática relativa ao efeito de pH, temperatura e termoestabilidade foi realizada para as enzimas que apresentaram maiores atividades, ou seja, para as celulases FPase, endoglicanase, celobiase e β -glicosidase e a hemicelulase xilanase, produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* LTB utilizando a forrageira *Brachiaria brizantha* como fonte de carbono. Os resultados do efeito do pH sobre as celulases analisadas estão mostrados na Figura 2.1 e os da influência da temperatura sobre estas enzimas estão mostrados na Figura 2.2.

As celulases apresentaram maiores atividades em pHs ácidos e em temperaturas de 50°C e 60°C. A FPase apresentou uma maior atividade em pH 4,0 e em temperatura de 50°C (Figuras 2.1A e 2.2A). ALMEIDA (2009) produziu e caracterizou celulases e hemicelulases do fungo *Acremonium* sp. em cultura submersa utilizando bagaço de cana e obteve uma maior atividade de FPase em pH 6,0, a 55°C. No presente trabalho, a FPase teve sua atividade reduzida em pHs mais alcalinos, sendo que em pH 8,0 ela teve a perda total da atividade (Figura 2.1A). GAO et al. (2008) produziram e caracterizaram celulases de um novo isolado do fungo termoacidofílico *Aspergillus terreus* M11, utilizando palha de milho como fonte de carbono em fermentação em estado sólido, obtendo altos níveis de FPase semi-purificada em pH 3,0 e a 45°C. Estes resultados assemelham-se com os obtidos no presente trabalho, já que em pH 3,0 a enzima reteve aproximadamente 75% da atividade (Figura 2.1A). Assim, o fungo *A. niger* LTB pode ser considerado termoacidofílico. Estes resultados mostram um grande potencial desta enzima em processos industriais que exigem pHs mais ácidos e temperaturas mais

elevadas. Logo, em termos biotecnológicos, a FPase de *A. niger* LTB é bastante promissora.

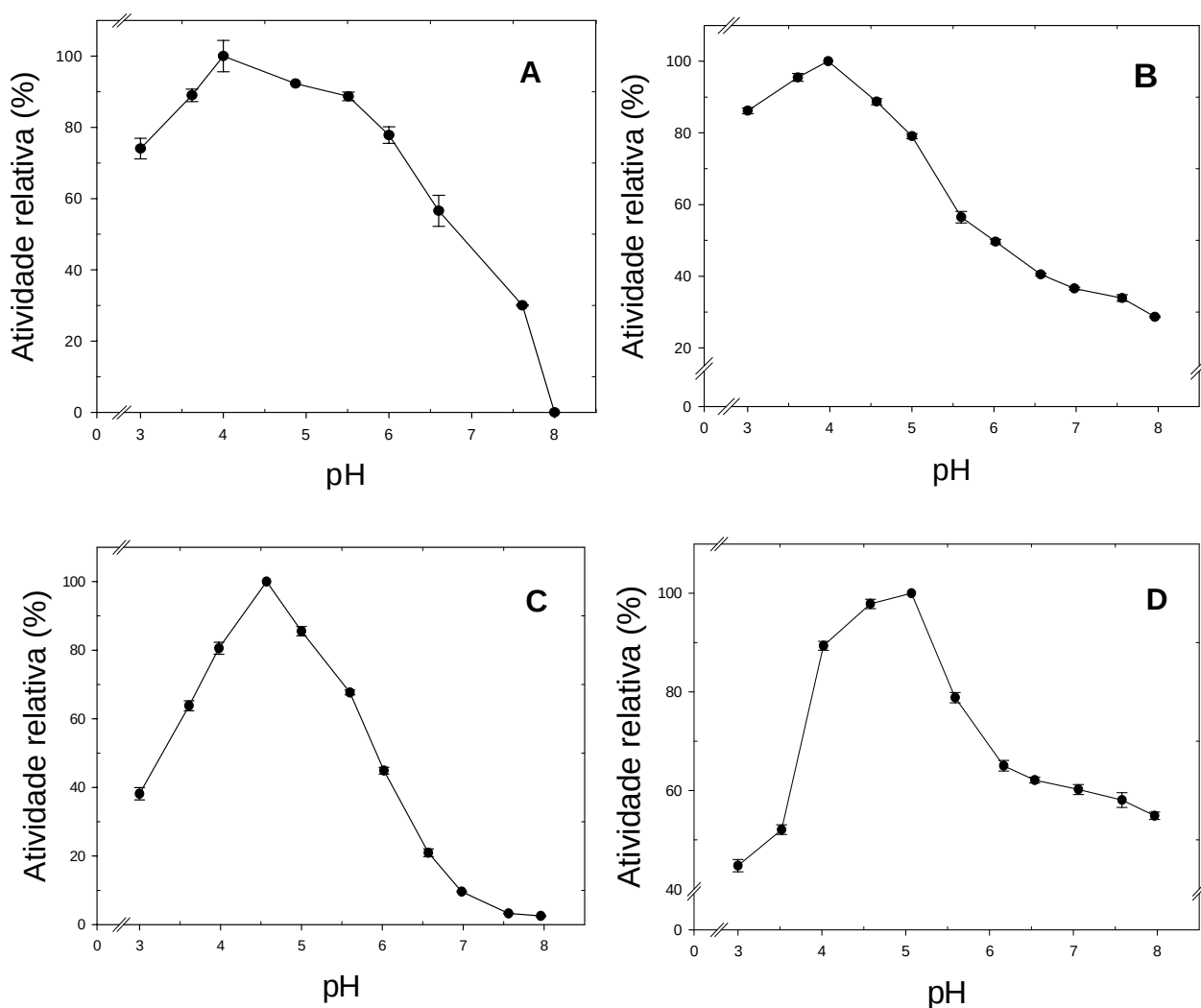


Figura 2.1 – Efeito do pH sobre a atividade das enzimas FPase (A), endoglucanase (B), β-glicosidase (C) e celobiase (D) do fungo *A. niger* LTB crescido em forrageira como fonte de carbono.

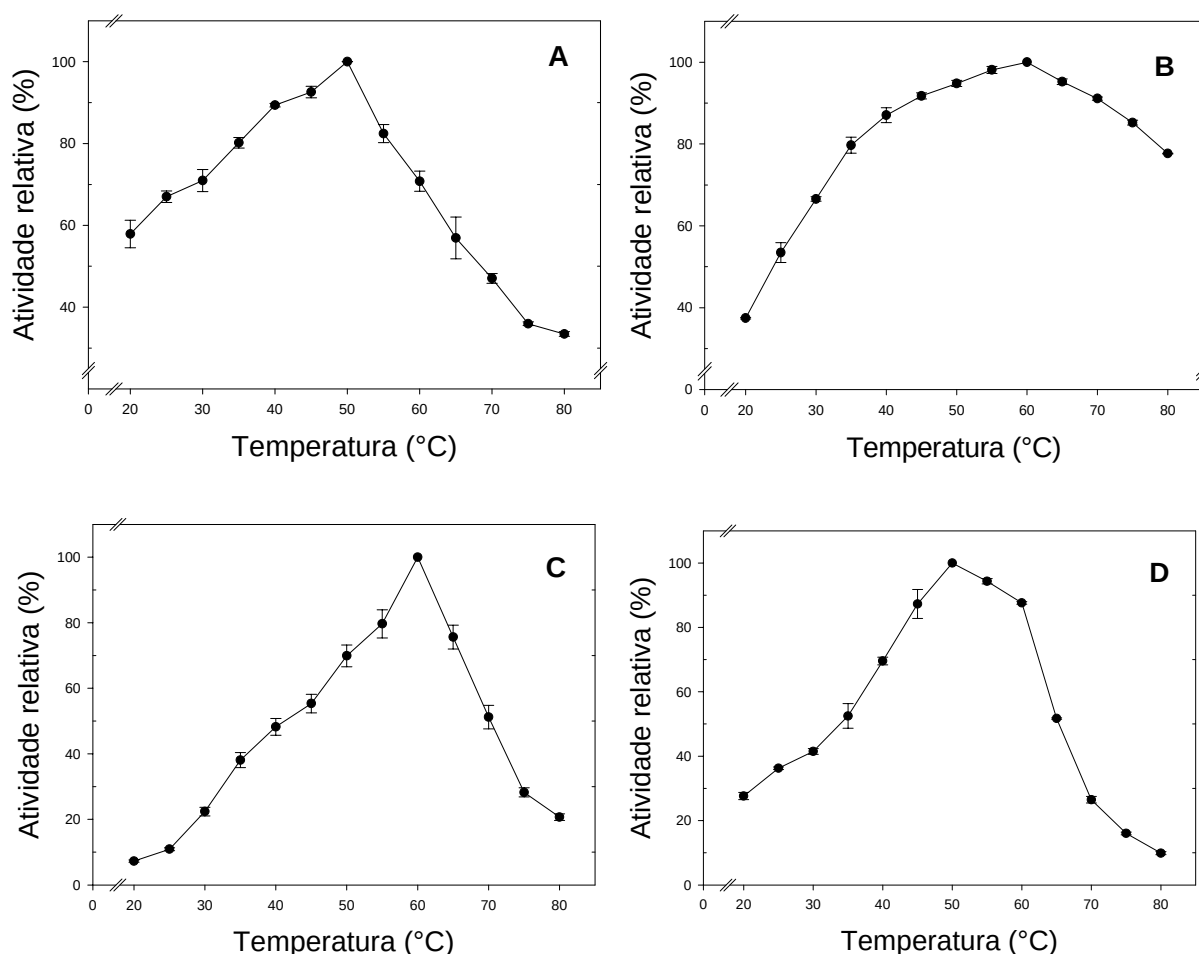


Figura 2.2 – Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas FPase (A), endoglucanase (B), β -glicosidase (C) e celobiase (D) do fungo *A. niger* LTB crescido em forrageira como fonte de carbono.

A maior atividade de endoglucanase foi obtida em pH 4,0 e em temperatura de 60°C. Entretanto, ela também apresentou alta atividade em uma faixa de temperatura de 35 a 80°C, sendo que nestas temperaturas ela ainda reteve aproximadamente 80% de sua atividade. Altas atividades também foram detectadas na faixa de pH 3,0 a 5,0, sendo que em pH 3,0 ela apresentou cerca de 86% de atividade residual e em pH 5,0 teve cerca de 80% de atividade (Figuras 2.1B e 2.2B). Valores semelhantes foram encontrados por SAHA (2003), obtendo máxima atividade de endoglucanase na temperatura de 55°C e em uma faixa de pH de 4,0 a 6,0, utilizando o fungo *Mucor circinelloides* crescido em lactose e celobiose; e por GAO et al. (2008), que produziram e caracterizaram celulases de um novo isolado do fungo termoacidofílico *Aspergillus*

terreus M11 utilizando palha de milho como fonte de carbono em fermentação em estado sólido, encontrando altas atividades de endoglicanase no pH 2,0. Já ARIFOGLU & ÖGEL (2000) avaliaram a produção de endoglicanase adsorvida em Avicel (celulose microcristalina) para os fungos *Torula thermophila* e *Humicola insolens*, os quais apresentaram pH e temperatura ótimas de 6,0/ 65°C e 6,5/65°C, respectivamente.

A aril- β -glicosidase obteve maior atividade em pH 4,5 e na temperatura de 60°C (Figuras 2.1C e 2.2C), sendo que na faixa de pH de 6,0 a 8,0 a enzima apresentou baixas atividades (Figura 2.1C). Resultados semelhantes foram obtidos por KARBOUNE et al (2008) ao caracterizarem enzimas celulolíticas do fungo *Penicillium funiculosum* crescidos em celulose. XIMENEZ et al. (1996) encontraram pH e temperaturas ótimas de 5,0 e 65°C para aril- β -glicosidase para o fungo *Aspergillus fumigatus* crescido em papel de filtro. ALMEIDA (2009) encontrou valores de pH ótimos na faixa de 4,5 a 5,0 e temperatura ótima de 60°C para o fungo *Acremonium* sp. EA0810 cultivado com bagaço de cana.

A celobiase apresentou valores diferentes da aril- β -glicosidase, obtendo maior atividade em pH 5,0 e na temperatura de 50°C. Além disso, a celobiase teve altas atividades na faixa de pH de 4,0 a 5,5 e na faixa de temperatura 45-60°C. Na faixa de pH de 6,0 a 8,0 a enzima apresentou 65% a 55% de atividade, respectivamente (Figuras 2.1D e 2.2D), o que a torna aplicável em processos industriais que utilizam condições alcalinas e altas temperaturas, como, por exemplo, em indústrias têxteis (BOM & FERRARA, 2008). XIMENES et al. (1996) também encontraram valores diferentes na caracterização das duas β -glicosidases de *Aspergillus fumigatus* crescido em papel de filtro, obtendo pH e temperatura ótimos para a aril- β -glicosidase de 5,0 e 65°C e para a celobiase de 4,0 e 60°C.

O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da xilanase também foi avaliado e os resultados estão apresentados na Figura 2.3. A enzima obteve altos valores de atividade em uma ampla faixa de pH (3,5-6,0), com atividade máxima no pH 5,5 (Figura 2.3A). A temperatura ótima para esta enzima foi de 50°C (Figura 2.3B). SHAH & MADAMWAR (2005) caracterizaram uma xilanase produzida por *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 cultivado com xilana birchwood e encontraram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho. Já a xilanase de *Acremonium* sp. EA0810 mostrou ser uma proteína básica, já que apresentou uma substancial atividade na faixa

de pH de 4,5-8,0, sendo sua atividade máxima obtida em pH 6,5, entretanto sua temperatura ótima também foi de 50°C (ALMEIDA, 2009).

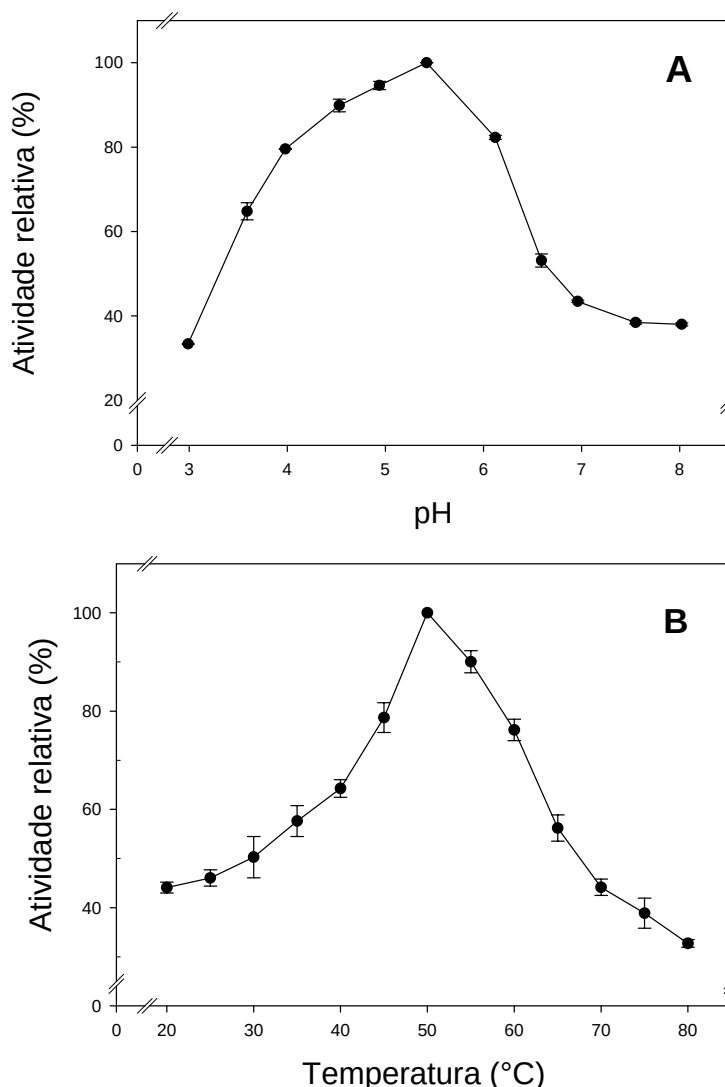


Figura 2.3 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da xilanase.

2.3.2.2. Termoestabilidade

A utilização das enzimas em vários processos industriais frequentemente depara com o problema da inativação da enzima após certo período de tempo, comprometendo o rendimento final do produto; logo, um estudo prévio da termoestabilidade das enzimas é de extrema importância.

A endoglicanase e a xilanase foram muito estáveis em suas temperaturas ótimas. Elas apresentaram 68% de atividade residual após 24 horas de pré-incubação a 60 e a

50°C, respectivamente. A endoglicanase reteve aproximadamente 90% da sua atividade inicial após ser incubada por 15 horas e a xilanase reteve aproximadamente 83% da sua atividade após ser incubada por 12 horas (Figura 2.4). Logo, a xilanase e a endoglicanase produzida por *Aspergillus niger* LTB apresentaram grande termoestabilidade nas suas temperaturas ótimas, podendo ter grande aplicabilidade biotecnológica. Outros autores encontraram valores de termoestabilidade inferiores para essas enzimas. Nos estudos de GAO et al. (2008), a endoglicanase obtida a partir de *Aspergillus terreus* M11 cultivado em fermentação em estado sólido sobre sabugo de milho, reteve 65% da sua atividade inicial após ser incubada a 70°C por 6 horas. A xilanase produzida por *Aspergillus foetidus* cultivado com 1% de xilana birchwood manteve apenas 36% da sua atividade inicial após pré-incubada por 3 horas a 50°C (SHAH & MADAMWAR, 2005). KARBOUNE et al. (2008) produziram endoglicanases de *Penicillium funiculosum* cultivados em celulose pura e verificaram que ela reteve 51% da sua atividade após pré-incubação a 60°C.

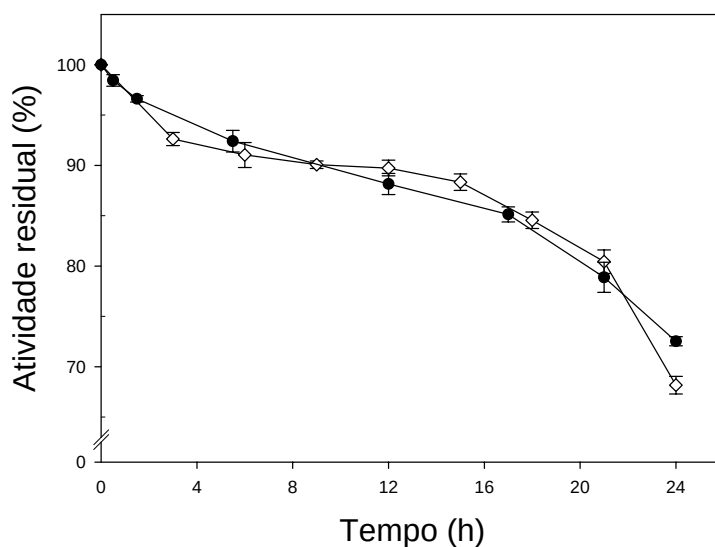


Figura 2.4 – Estabilidade térmica das enzimas xilanase (●) e endoglicanase (◇).

A FPase reteve aproximadamente 76% da sua atividade após ser pré-incubada por 5 horas a 50°C. Entretanto, após este tempo, sua atividade foi caindo gradativamente até 8 horas de pré-incubação, quando ela perdeu totalmente sua atividade (Figura 2.5). A FPase produzida por *Acremonium* sp. EA0810 cultivado com bagaço de cana perdeu 70% da sua atividade quando pré-incubado por 30 minutos a

55°C (ALMEIDA, 2009). DUTTA et al. (2008) reportarem a perda de 70% da atividade inicial de uma FPase de *Penicillium citrinum* após ser pré-incubada por 30 minutos a 55°C.

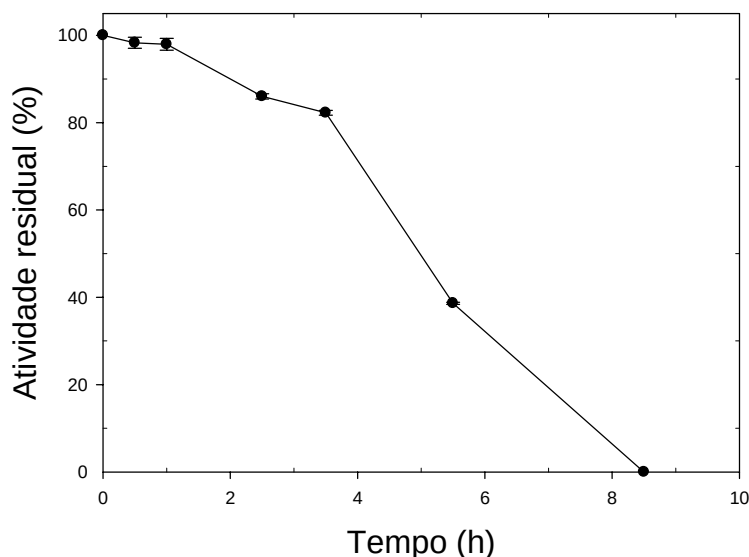


Figura 2.5 – Estabilidade térmica da FPase.

A aril- β -glicosidase do fungo *Aspegillus niger* LTB mostrou-se pouco estável a 60°C, já que ela reteve apenas 15% da sua atividade após ser incubada por 3,5 horas (Figura 2.6A). Uma aril- β -glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* M11, utilizando fermentação em estado sólido com sabugo de milho, mostrou-se mais estável que a enzima analisada neste trabalho, pois reteve 53% da sua atividade original após pré-incubação a 70°C por 6 horas (GAO et al., 2008). Entretanto, a celobiase obteve uma maior estabilidade térmica, já que ela reteve aproximadamente 53% da sua atividade inicial após pré-incubação por 14 horas a 50°C (Figura 2.6B). Para a produção de bioetanol a partir de biomassas lignocelulósicas, este resultado é bastante promissor, visto que a celobiase é uma das últimas enzimas a atuar na hidrólise dos carboidratos, necessitando, portanto, de uma termoestabilidade maior.

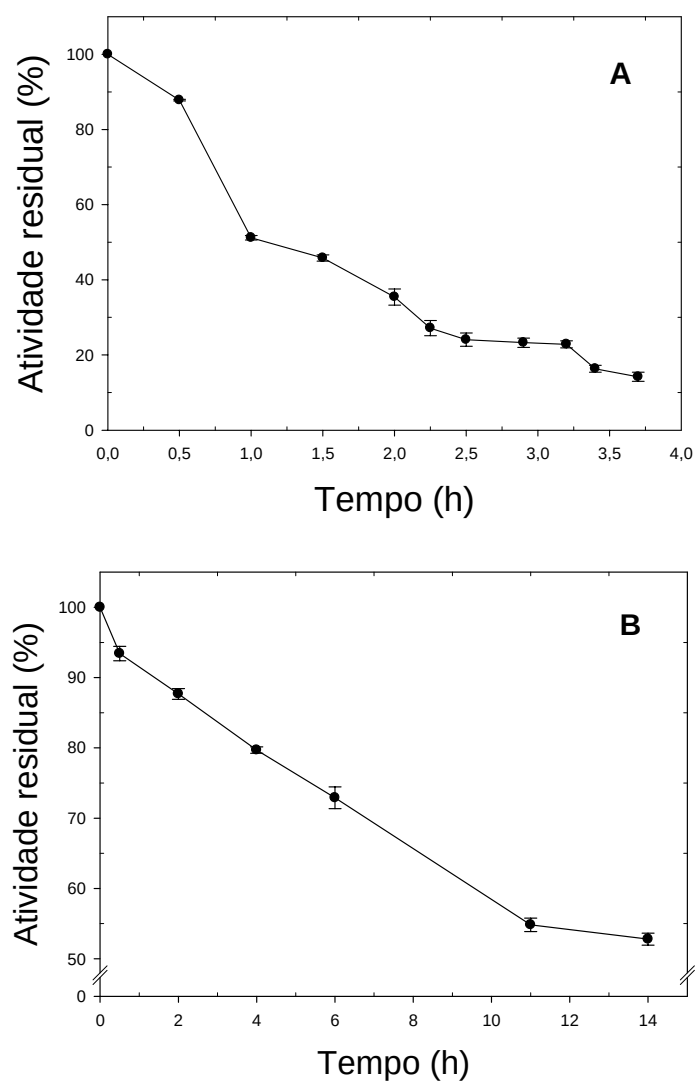


Figura 2.6 – Estabilidade térmica das enzimas aril- β -glicosidase (A) e celobiase (B).

2.4. CONCLUSÕES

- A forrageira *Brachiaria brizantha* foi a fonte de carbono que mais eficientemente induziu a produção de xilanase pelos fungos *A. niger* LTB, *A. glaucus* LTB e em *P. expansum* LABQ; FPase e celobiase pelo fungo *A. niger* LTB; além da endoglicanase pelos fungos *A. niger* LTB e *P. expansum* LABQ;
- O fungo *A. niger* LTB foi o que produziu maiores rendimentos das enzimas endoglicanase (60,76 U/g), FPase (48,7 U/g), xilanase (5320 U/g) e celobiase (228 U/g);
- As celulases apresentaram maiores atividades em pHs ácidos e em temperaturas de 50°C e 60°C;
- A FPase apresentou uma maior atividade em pH 4,0 e na temperatura de 50°C, mostrando-se bastante termotável nesta temperatura, onde reteve aproximadamente 76% da sua atividade inicial após ser pré-incubada por 5 horas;
- A maior atividade de endoglicanase foi obtida em pH 4,0 e em temperatura de 60°C, apresentando alta termoestabilidade, com 68% de atividade residual após 24 horas de pré-incubação na sua temperatura ótima;
- A aril- β -glicosidase mostrou maior atividade em pH 4,5 e na temperatura de 60°C, apresentando-se pouco termoestável, retraindo apenas 15% da sua atividade após ser incubada por 3,5 horas;
- A celobiase apresentou valores diferentes da aril- β -glicosidase, apresentando maiores atividades em pH 5,0 e na temperatura de 50°C, além de ser mais termoestável, com 53% da sua atividade inicial após pré-incubação por 14 horas a 50°C;
- Alta atividade de xilanase foi detectada na faixa de pH de 4,0-6,0, com atividade máxima no pH 5,5. A temperatura ótima para esta enzima foi de 50°C, apresentando alta termoestabilidade nesta temperatura, retraindo 68% da sua atividade inicial após 24 horas de pré-incubação.

AValiação DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DILuíDO

3.1. INTRODUÇÃO

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa essencial quando se considera a hidrólise enzimática da biomassa para a produção de bioetanol. Esta etapa tem como finalidade alterar a estrutura nativa das fibras lignocelulíticas, facilitando a ação subsequente dos biocatalizadores. De acordo com o pré-tratamento utilizado, pode ocorrer a remoção da hemicelulose ou da lignina, em proporções variáveis; a redução da cristalinidade da celulose; e o aumento da porosidade. Um tratamento eficiente pode diminuir de forma substancial a quantidade da enzima necessária para a hidrólise da celulose, o que significa uma grande redução nos custos finais. Não existe um tratamento único aplicável a todas as biomassas e um mesmo pré-tratamento pode ser aplicado com diferentes graus de severidade. Segundo BOM & FERRARA (2008), a severidade de um processo é definida pela concentração do reagente químico, a temperatura, a pressão e o tempo de residência.

Além de facilitar a ação dos biocatalizadores, outros fatores são ainda importantes quando se considera a efetividade de um pré-tratamento, como a preservação da fração hemicelulósica; minimização da formação de produtos de degradação, que atuam como inibidores dos processos enzimáticos e fermentativos subsequentes, além de baixos custos e consumo energético (SUN & CHENG, 2002).

Pré-tratamentos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido propostos para o tratamento de matérias lignocelulósicas (SUN & CHENG, 2002). Cada processo apresenta características que afetam, de forma positiva ou negativa, as etapas subsequentes de recuperação de produtos, subprodutos e reagentes. Além disso, as diferentes severidades respondem por um maior ou menor grau de degradação dos componentes da biomassa.

Nos últimos anos, o pré-tratamento com ácido diluído tem recebido considerada atenção por apresentar maior efetividade e por ter menores custos. Quando adicionado à biomassa, ele remove a hemicelulose desorganizando o complexo lignocelulósico, aumentando, assim, a digestibilidade do sólido residual. Quanto maior a concentração do ácido usada, em determinadas temperaturas e pressão, maior será a desorganização da fibra, entretanto, maior será também a destruição dos carboidratos e a formação de inibidores. Logo, esforços têm sido feitos para otimizar as condições do pré-tratamento ácido diluído.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo testar várias condições de severidade no pré-tratamento ácido diluído em três biomassas lignocelulósicas (forrageira, bagaço de cana e bambu), a partir da quantificação dos carboidratos na biomassa pré-tratada, dos açúcares redutores e dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural (HMF) presentes no hidrolisado hemicelulósico, visando obter um pré-tratamento mais eficaz.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Matéria-prima

As biomassas lignocelulósicas forrageira (*Brachiaria brizantha* cv. xaraés) e o bagaço de cana (*Saccharum* spp.) foram obtidos em unidades experimentais da Universidade Federal de Viçosa, já o bambu (*Bambusa vulgaris*) foi cedido pelo Laboratório de Celulose e Papel. O corte da forrageira foi realizado em março de 2008, com uma intensidade de 20 cm e na frequência de 95% de interceptação da luz. As biomassas foram secadas ao ar livre e moídas.

3.2.2. Pré-tratamentos

As biomassas foram tratadas com soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4) nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% (v/v). As amostras (10 g) foram secadas e adicionadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL das soluções de ácido sulfúrico

e posteriormente colocadas em autoclave a 121°C por 30, 60 e 90 min. A concentração de sólidos no meio foi sempre de 10% (m/v) e cada tratamento foi realizado em duplicata. Por fim, as amostras foram filtradas e lavadas com água deionizada. Tanto o sólido resultante quanto o hidrolisado foram coletados e guardados para posteriores análises. As amostras foram mantidas na geladeira à 4°C para evitar possíveis contaminações.

3.2.3. Análise dos carboidratos e lignina

Os carboidratos presentes nas biomassas pré-tratadas foram quantificados pelo método de WALLIS et al. (1996). Nas biomassas não tratadas, foram quantificados tanto os carboidratos quanto a lignina. A lignina solúvel foi quantificada pelo método proposto por GOLDSCHMID (1971), já a análise da lignina insolúvel foi realizada segundo GOMIDE & DEMUNER (1986). Entretanto, para a quantificação dos carboidratos e da lignina, as substâncias orgânicas de baixo peso molecular, denominadas de extrativos, tiveram que ser previamente removidas das amostras, já que estes compostos podem interferir nos resultados destas análises.

A extração destes compostos ocorreu em aparato soxhlet utilizando 125 mL de acetona. Após 5 horas, as amostras foram retiradas do aparato e acondicionadas em ambiente de temperatura e umidade relativa constante. Para a determinação do teor de umidade, aproximadamente 300 mg das amostras acondicionadas foram secadas a 105°C até peso constante.

- **Determinação do teor de lignina insolúvel**

Após a remoção dos extrativos, pesou-se aproximadamente 300 mg das amostras, com precisão de 0,1 mg, as quais foram transferidas, quantitativamente, para um tubo de ensaio com cerca de 60 mm de comprimento e 15 mm de diâmetro. Adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico 72% (resfriado a 10-15°C) em cada tubo de ensaio, os quais foram mantidos em banho-maria a 30°C por 1 hora. Nesta etapa, as amostras foram, frequentemente, misturadas com o auxílio de um bastonete de vidro. Após este tempo, as amostras já hidrolisadas foram diluídas, transferindo-as quantitativamente, com 84 mL de água deionizada, para “frascos tipo penicilina” de 100

mL de capacidade. Os frascos foram fechados hermeticamente, com tampa de borracha e tampa de alumínio, e colocados numa autoclave a 118°C (27 psi) por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram filtradas em cadinho de vidro sinterizado, previamente preparado com uma camada de amianto lavado com ácido (2 a 3 mm) e tarado. Após a filtração, a lignina retida foi lavada no próprio cadinho com água deionizada quente até completa remoção do ácido. Os cadinhos com a lignina foram colocados na estufa a 105°C até peso constante. O peso final obtido foi transformado em teor de lignina nas biomassas. Os filtrados obtidos foram recuperados para posteriores análises de carboidratos e lignina solúvel.

- **Determinação do teor de lignina solúvel em ácido**

Os filtrados obtidos na análise de lignina insolúvel foram diluídos para 250 mL. Deste volume foram retirados alíquotas de 25 mL, os quais foram diluídos para 100mL. As amostras que sobraram foram usadas para a análise de carboidratos. Já as amostras mais diluídas foram usadas na análise de lignina solúvel, a partir das suas leituras de absorbância a 215 nm e a 280 nm. O branco foi obtido diluindo-se 3 mL de ácido sulfúrico 72% para 1000 mL.

$$\text{Teor de lignina solúvel (\%)} = 4,53 \times (A_{215\text{nm}} - A_{280\text{nm}}) / 300 \times P$$

onde, P = Peso seco das amostras, em gramas.

- **Determinação dos carboidratos**

A concentração de glicose, xilose, galactose, manose e arabinose nas amostras pré-tratadas foi determinada por cromatografia líquida (HPLC) segundo WALLIS et al. (1996).

3.2.4. Análise de açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores presentes no hidrolisado hemicelulósico foi realizada utilizando-se o reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1956). Em tubos de ensaio foram colocados 10-50 μ L das amostras, 950-990 μ L de água destilada e 1 mL de DNS. A solução foi colocada em banho fervente por 5 minutos para o desenvolvimento da cor. O DNS tem a função de reagir com os açúcares redutores, formando um composto colorido que tem forte absorção em 540 nm. A quantificação foi realizada através de uma curva de calibração, construída com 0-2 μ moles de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1 g/L de glicose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.5. Quantificação do hidroximetilfurfural

O inibidor hidroximetilfurfural presente no hidrolizado hemicelulósico foi quantificado segundo ZAPPALA et al. (2005). O ensaio foi realizado com 0,4 mL das amostras, 1 mL de paratoluidina 10% (diluída em 10 mL de ácido acético e 90 mL de isopropanol) e 0,2 mL do ácido barbitúrico 5% (v/v). A paratoluidina reage com os hidroximetilfurfurais na presença do ácido barbitúrico formando um produto colorido que pode ser lido a 550 nm. A maior absorvância foi atingida em um intervalo de 3 a 5 minutos. A quantificação foi realizada através de uma curva padrão, construída com 5-40 mg/L a partir de diluições sucessivas da solução padrão de 1 g/L de hidroximetilfurfural. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.6. Quantificação do furfural

O inibidor furfural presente no hidrolizado hemicelulósico foi quantificado segundo NASCIMENTO et al. (1998). A análise foi realizada com 0,9 mL das amostras, 0,9 mL de etanol 95% (v/v), 0,02 mL de anilina e 0,4 mL de ácido acético glacial. O ensaio foi realizado no escuro e com agitação. Após 15 min de incubação as amostras foram lidas a 510 nm. A quantificação foi realizada através de uma curva

padrão, construída a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de 0,02% de furfural. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura

Para visualização morfológica do grau de destruição das biomassas pré-tratadas, foram coletadas amostras tratadas do pré-tratamento mais brando e do mais severo e amostras não tratadas (controle), as quais foram colocadas sobre *stubs*, metalizadas com ouro e examinadas sob microscópio eletrônico de varredura (LEO VP1430).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. Matéria-prima

Os resultados da composição química das biomassas lignocelulósicas estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição química das matérias-primas lignocelulósicas

Composição (%)	Bambu	Bagaço de cana	<i>Brachiaria</i>
Glicanas (	45,10	43,20	42,15
Xilanas	18,65	21,50	12,70
Galactanas	0,30	0,60	0,50
Mananas	0,30	0,35	0,55
Arabinanas	1,20	2,20	0,80
Lignina	22,50	20,20	18,80

Segundo PEREIRA (2007), vários fatores podem afetar a composição bromatológica das plantas como o tipo de adubação, a espécie, o clima, o solo, estágio de desenvolvimento, idade e altura do corte.

O bambu apresentou em torno de 45% de celulose, 20% de hemicelulose e 22,5% de lignina. Estes valores são compatíveis com os obtidos por BARRICHELLO & FOELKEL (1975). O bagaço de cana apresentou um teor de aproximadamente 43% de celulose, 24,7% de hemicelulose e 20,2% de lignina. A forrageira *Brachiaria*

apresentou um menor teor de lignina e hemicelulose, obtendo valores em torno de 18,8% e 14,5%, respectivamente. O teor de celulose foi semelhante aos das outras biomassas, ficando em torno de 42%. Valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram encontrados por PIRES et al. (2006). Tanto o bambu quanto o bagaço apresentaram 65% da sua massa total na forma de carboidratos (holocelulose), já a forrageira apresentou em torno de 56%. O etanol pode ser obtido, então, a partir da fermentação destes açúcares, utilizando um catalisador biológico, como as leveduras (SAHA, 2003).

3.3.2. Pré-tratamentos

Segundo SUN & CHENG (2002), alguns fatores são importantes quando se considera a efetividade de um pré-tratamento, como a preservação da fração celulósica e hemicelulósica e a minimização da formação de inibidores dos processos enzimáticos e fermentativos subsequentes. Assim, o resultado mais indicado para a produção de bioetanol é que se tenha, após o pré-tratamento, uma preservação da celulose na biomassa, uma grande quantidade de açúcares redutores e uma baixa concentração de inibidores no hidrolisado hemicelulósico. Assim, dependendo do microrganismo a ser usado, tanto a celulose na biomassa quanto os açúcares redutores produzidos poderiam ser fermentados a etanol.

Os resultados dos carboidratos presentes nas biomassas pré-tratadas, da concentração de açúcares redutores e inibidores encontram-se na Tabela 3.2, Tabela 3.3 e Tabela 3.4, respectivamente. Foram aplicados testes de Tukey, a 5% de significância, para a interpretação estatística dos dados.

Tabela 3.2. Concentração de carboidratos presentes nas biomassas pré-tratadas com ácido sulfúrico nas concentrações de 0,5, 1 e 2%.

Biomassa	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Glicanas (%)			Xilanas (%)		
		Tempo de Reação (min)					
		30	60	90	30	60	90
Bambu	0,5	57,60 ^{aA}	58,35 ^{aA}	66,3 ^{aA}	11,70 ^{aA}	11,65 ^{aA}	10,55 ^{aA}
	1	60,6 ^{aA}	63,2 ^{abA}	65,5 ^{bB}	8,40 ^{aA}	9,60 ^{bB}	7,14 ^{cB}
	2	58,85 ^{aA}	60,15 ^{aA}	66,1 ^{bB}	10,45 ^{aA}	10,05 ^{aAB}	6,40 ^{bB}
<i>Brachiaria</i>	0,5	42,85 ^{aA}	44,10 ^{aA}	46,00 ^{aA}	12,10 ^{aA}	9,78 ^{aA}	8,13 ^{aA}
	1	45,12 ^{aA}	50,50 ^{aB}	51,55 ^{aA}	9,38 ^{aB}	7,85 ^{aA}	6,17 ^{aA}
	2	50,70 ^{aA}	53,32 ^{aB}	54,63 ^{aB}	4,57 ^{aC}	4,07 ^{bB}	3,39 ^{cA}
Bagaço de cana	0,5	61,15 ^{aA}	64,00 ^{aB}	67,60 ^{bC}	9,95 ^{aA}	7,00 ^{bA}	6,00 ^{cA}
	1	62,40 ^{aA}	67,10 ^{bB}	68,1 ^{cC}	8,32 ^{aA}	7,15 ^{bA}	4,60 ^{cB}
	2	61,15 ^{aA}	65,35 ^{bB}	68,25 ^{bC}	5,55 ^{aA}	4,2 ^{bB}	4,1 ^{bB}

*Letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem (P>0,05) significativamente.

Tabela 3.3. Concentração açúcar redutor presente no hidrolisado hemicelulósico.

Biomassa	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Açúcar redutor (g/g de biomassa seca)		
		Tempo de Reação (min)		
		30	60	90
Bambu	0,5	0,120 ^{aA}	0,122 ^{aA}	0,179 ^{bA}
	1,0	0,176 ^{aB}	0,178 ^{aB}	0,177 ^{aA}
	2,0	0,24 ^{aC}	0,250 ^{abC}	0,260 ^{bB}
Brachiaria	0,5	0,187 ^{aA}	0,211 ^{bA}	0,225 ^{cA}
	1,0	0,251 ^{aB}	0,360 ^{bB}	0,397 ^{cB}
	2,0	0,308 ^{aC}	0,360 ^{bB}	0,393 ^{cB}
Bagaço de cana	0,5	0,474 ^{aA}	0,477 ^{aA}	0,538 ^{bA}
	1,0	0,501 ^{aB}	0,524 ^{aB}	0,537 ^{bA}
	2,0	0,510 ^{aB}	0,518 ^{aB}	0,534 ^{aA}

*Letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente (P>0,05) .

Tabela 3.4. Concentração de furfural e hidroxi metilfurfural (HMF) presentes no hidrolisado hemicelulósico.

Biomassa	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Furfural (mg/g biomassa seca)			HMF (mg/g biomassa seca)		
		Tempo de Reação (min)			Tempo de Reação (min)		
		30	60	90	30	60	90
Bambu	0,5	0,215 ^{aA}	0,312 ^{aA}	0,689 ^{bA}	0,154 ^{aA}	0,235 ^{bA}	0,233 ^{bA}
	1	0,536 ^{aB}	0,542 ^{aA}	0,941 ^{bB}	0,163 ^{aA}	0,241 ^{bA}	1,209 ^{cB}
	2	0,741 ^{aC}	0,829 ^{aB}	1,859 ^{bC}	0,599 ^{aB}	1,049 ^{bB}	1,511 ^{cC}
Brachiara	0,5	0,347 ^{aA}	0,412 ^{bA}	0,542 ^{cA}	0,242 ^{aA}	0,988 ^{bA}	1,162 ^{bA}
	1	1,328 ^{aB}	2,553 ^{bB}	4,104 ^{cB}	0,715 ^{aB}	0,998 ^{aA}	1,766 ^{bB}
	2	2,083 ^{aC}	2,556 ^{aB}	4,16 ^{bB}	1,578 ^{aC}	2,176 ^{bB}	4,541 ^{cC}
Bagaço de cana	0,5	0,514 ^{aA}	0,853 ^{bA}	1,308 ^{cA}	6,06 ^{aA}	17,44 ^{bA}	23,33 ^{cA}
	1	1,188 ^{aB}	2,076 ^{bA}	3,676 ^{cB}	8,11 ^{aA}	17,44 ^{bA}	23,72 ^{cA}
	2	3,247 ^{aC}	4,414 ^{aB}	9,187 ^{bC}	20,27 ^{aB}	35,45 ^{bB}	42,68 ^{cB}

*Letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem significativamente (P>0,05).

Analisando os resultados, pode-se perceber que em todas as biomassas não houve grande diferença, com relação à concentração de glicana, entre os pré-tratamentos realizados. Para as amostras de bambu pré-tratadas, as concentrações de glicanas ficaram em torno de 57,6-66,3%, entretanto, os únicos valores que variaram foram para os tratamentos de 1%/90 min e 2%/90 min, os quais foram iguais estatisticamente, apresentando valores de 65,45% e 66,3%, respectivamente (Tabela 3.2).

Com relação às xilanas, observou-se uma diminuição da sua concentração em todas as amostras, o que pode ser explicado pela hidrólise ácida sofrida por estas biomassas, onde a hemicelulose é hidrolisada e liberada no sobrenadante. O bambu foi a biomassa que apresentou uma menor liberação de hemicelulose hidrolisada nos pré-tratamentos analisados, mantendo aproximadamente 34,3% de hemicelulose na biomassa pré-tratada com 2% de ácido sulfúrico por 90 min. Estes resultados também podem ser verificados pela baixa concentração de açúcares redutores nos hidrolisados hemicelulósicos produzidos (Tabela 3.3). Além disso, as quantidades de açúcares redutores, referentes às três concentrações de ácido sulfúrico, não variaram significativamente nos diferentes tempos de retenção, com exceção do pré-tratamento que se utilizou 0,5% de ácido sulfúrico, onde se observou um aumento significativo de açúcares redutores no tempo de 90 min. Já nas diferentes concentrações analisadas, houve um aumento considerável de açúcares redutores nos três diferentes tempos de residência, com exceção das amostras onde se usou 0,5% e 1% de ácido sulfúrico no tempo de 90 min, onde as quantidades de açúcares redutores não variaram estatisticamente (Tabela 3.3.). Entretanto, houve uma grande formação do inibidor hidroximetilfurfural quando se utilizou a solução de ácido sulfúrico 2% para todos os tempos analisados e solução de 1% de ácido no tempo de 90 min (Tabela 3.4). Para o inibidor furfural observa-se que a sua formação aumentou consideravelmente no tempo de 90 min, para todas as concentrações analisadas. Além disso, dentro de cada concentração, não houve variação significativa de furfural nos tempos de 30 e 60 min, sendo que em 60 min, a concentração de 0,5% não variou estatisticamente da concentração de 1%. Assim, para o bambu, a condição mais indicada para o pré-tratamento com ácido diluído seria de 1% de ácido sulfúrico com um tempo de retenção de 60 minutos.

A *Brachiaria* foi a biomassa que apresentou menor concentração de carboidratos (Tabela 3.1), sendo que os valores de glicanas nas amostras pré-tratadas variaram de 42,85-54,63% (Tabela 3.2), entretanto a eficiência da hidrólise ácida foi alta, visto que a concentração de xilanas ao final do pré-tratamento mais severo foi de 3,39% (Tabela 3.3), o que corresponde a 26,7% da hemicelulose presente na amostra não tratada. Este resultado pode ser explicado pela baixa concentração de hemicelulose nesta forrageira. Estatisticamente, os diferentes pré-tratamentos não mostraram grandes variações de glicanas, diferindo apenas nos tempos de 60 minutos (nas concentrações de 1 e 2 %) e 90 minutos (na concentração de 2%) (Tabela 3.2). Com relação à liberação de açúcares redutores, observou-se uma maior concentração no tempo de 90 minutos nas concentrações de ácido sulfúrico de 1 e 2% (Tabela 3.3), entretanto, neste tempo de retenção, a concentração dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural quando se usou 1 e 2% de ácido sulfúrico foi extremamente alta, logo não seria recomendável estas condições de pré-tratamentos para a forrageira. A concentração de furfural também apresentou altos valores na concentração de 1 e 2% nos tempos de 30 e 60 minutos (Tabela 3.4). Assim, a concentração ideal de ácido sulfúrico para pré-tratar a forrageira foi de 0,5%; e dentro desta concentração, o tempo de 90 minutos seria o mais indicado, já que apresentou maior concentração de açúcares redutores no hidrolisado e um maior teor de glicanas na biomassa.

Entre as biomassas analisadas, o bagaço de cana foi o que apresentou uma maior eficiência na hidrólise ácida, visto que o percentual de hemicelulose resultante na amostra pré-tratada foi de apenas 18%, ou seja, 82% foi hidrolisada com o tratamento ácido (Tabela 3.2). Logo, a quantidade de açúcares redutores produzidos foram maiores em todas as condições testadas, além disso, as concentrações dos açúcares redutores variaram muito pouco entre os pré-tratamentos (Tabela 3.3). Com relação ao teor de glicanas nas amostras, também se observou uma pequena variação entre os pré-tratamentos (61,15-68,25%), sendo que, estatisticamente, não houve diferença significativa entre as três concentrações analisadas, apenas entre os tempos de retenção (Tabela 3.2). Com o aumento do tempo de tratamento, para as três concentrações de ácido analisadas, houve também um aumento na formação dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural, principalmente na concentração de 2% de ácido sulfúrico. Além disso, a menor concentração de inibidores foi encontrada no tempo de 30 minutos e na concentração de 0,5% de ácido (Tabela 3.4). Assim, levando-se em consideração o

custo benefício, para o bagaço de cana, o pré-tratamento mais indicado seria o que utiliza 0,5% de ácido sulfúrico com um tempo de retenção de 30 minutos, visto que a concentração de glicanas e açúcares redutores aumentaram muito pouco na concentração de 0,5% no tempo de 90 minutos e que quanto maior o tempo de retenção maior é o custo final.

Dado ao exposto, o bagaço de cana mostrou-se bastante promissor para a produção de bioetanol, visto que necessita de condições bem mais brandas e, conseqüentemente, mais “baratas” para ser pré-tratada com ácido sulfúrico diluído (Tabela 3.2). Além disso, deve-se levar em consideração o fato de que o bagaço de cana é um resíduo agroindustrial e que as fábricas sucroalcooleiras tendem a se tornarem cada vez mais integradas. Logo estas fábricas tendem a formar grandes biorrefinarias, ou seja, fábricas que utilizam matérias primas renováveis e os seus resíduos para a produção de uma variedade de valiosas substâncias e energia, com a mínima geração de resíduos.

O pré-tratamento ácido diluído pode efetivamente solubilizar a hemicelulose em açúcar monoméricos (arabinose, galactose, glicose, manose e xilose) melhorando a conversão de celulose em etanol. Comparados com outros métodos de pré-tratamentos, ele é preferencialmente usado para converter a xilana da hemicelulose em xilose, o qual também pode ser fermentado, por determinados microrganismos, a etanol (McMILLAN, 1996).

No presente trabalho a maior remoção de xilana foi de 82% para o bagaço de cana, 73,3% para a forrageira e 65,7% para o bambu. LEE et al. (1997) reportaram o efeito do pré-tratamento ácido diluído sobre a palha de trigo e obtiveram uma remoção de 80% de xilana a 140°C por 1h.. Em altas temperaturas como 170°C há uma grande solubilização de xilana, entretanto, grande parte da glicose é convertida em hidroximetilfurfural e a xilose pode ser degradada a furfural, os quais são inibidores da fermentação (Grohmann et al., 1984, citado por LEE et al., 1997).

GUO et al. (2008) otimizaram o pré-tratamento ácido diluído na forrageira *Miscanthus floridulus*, bagaço de cana e palha de arroz, analisando diferentes condições como concentração de ácido sulfúrico e tempo de retenção. Eles concluíram que as condições ótimas para maximizar o rendimento de xilose de forrageira no hidrolisado são semelhantes para o bagaço e a palha de arroz. Além disso, a viabilidade da

forrageira para a fermentação do hidrolisado é melhor quando comparado ao bagaço, já que produziu menor concentração do inibidor ácido acético.

SUN & CHENG (2005) analisaram várias condições do pré-tratamento ácido diluído sobre a palha de trigo e forrageira *Cynodon dactylon*. Eles observaram que cerca de 50-66% de xilana dessas biomassas foi hidrolisada em xilose com concentrações de ácido sulfúrico maiores que 1,2% e com um tempo de retenção maior que 60 minutos. O tempo de pré-tratamento de 30 minutos não foi bom na solubilização da hemicelulose. O rendimento de glicose no hidrolisado da forrageira aumentou com o aumento da concentração de ácido e do tempo do pré-tratamento. Aproximadamente 27-33% de glicanas da forrageira foi convertido em glicose quando a concentração do ácido e o tempo do pré-tratamento foram de 1,2% e 60 minutos, respectivamente. Entretanto, o rendimento de glicose no hidrolisado da palha de trigo variou somente 10% entre as várias condições analisadas.

3.3.3. Análises morfológicas

Para ilustrar o grau de desorganização sofrido pelas biomassas pré-tratadas foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura das amostras que passaram pela hidrólise ácida 0,5% por 30 minutos e 2% por 90 minutos (tratamento mais brando e mais severo, respectivamente), sendo que as amostras não tratadas serviram como grupo controle para a análise. As micrografias das amostras de bambu, forrageira e bagaço de cana estão apresentadas nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente.

A Figura 3.1A e B apresentam as micrografias das amostras de bambu não tratadas com ácido sulfúrico, onde se observa a superfície dos elementos de vaso íntegros. Os feixes longitudinais são as fibras de carboidratos preservadas. Na Figura 3.1C pode-se visualizar as células de parênquima esclerificada deterioradas de uma amostra de bambu tratada com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos. A grande maioria das células tiveram suas paredes celulares rompidas pela hidrólise ácida. A Figura 3.1D e 3.1F mostram elementos de vaso de amostras de bambu tratados com 0,5% de ácido por 30 minutos e 2% de ácido por 90 minutos, respectivamente. Pode-se visualizar nestas micrografias o grau de severidade do tratamento sobre os elementos do vaso, visto que no tratamento mais brando ainda se tem alguns feixes de fibras em torno

do xilema, já no tratamento mais severo todos os feixes de fibras foram retirados, ficando apenas a camada de lignina em torno do xilema.

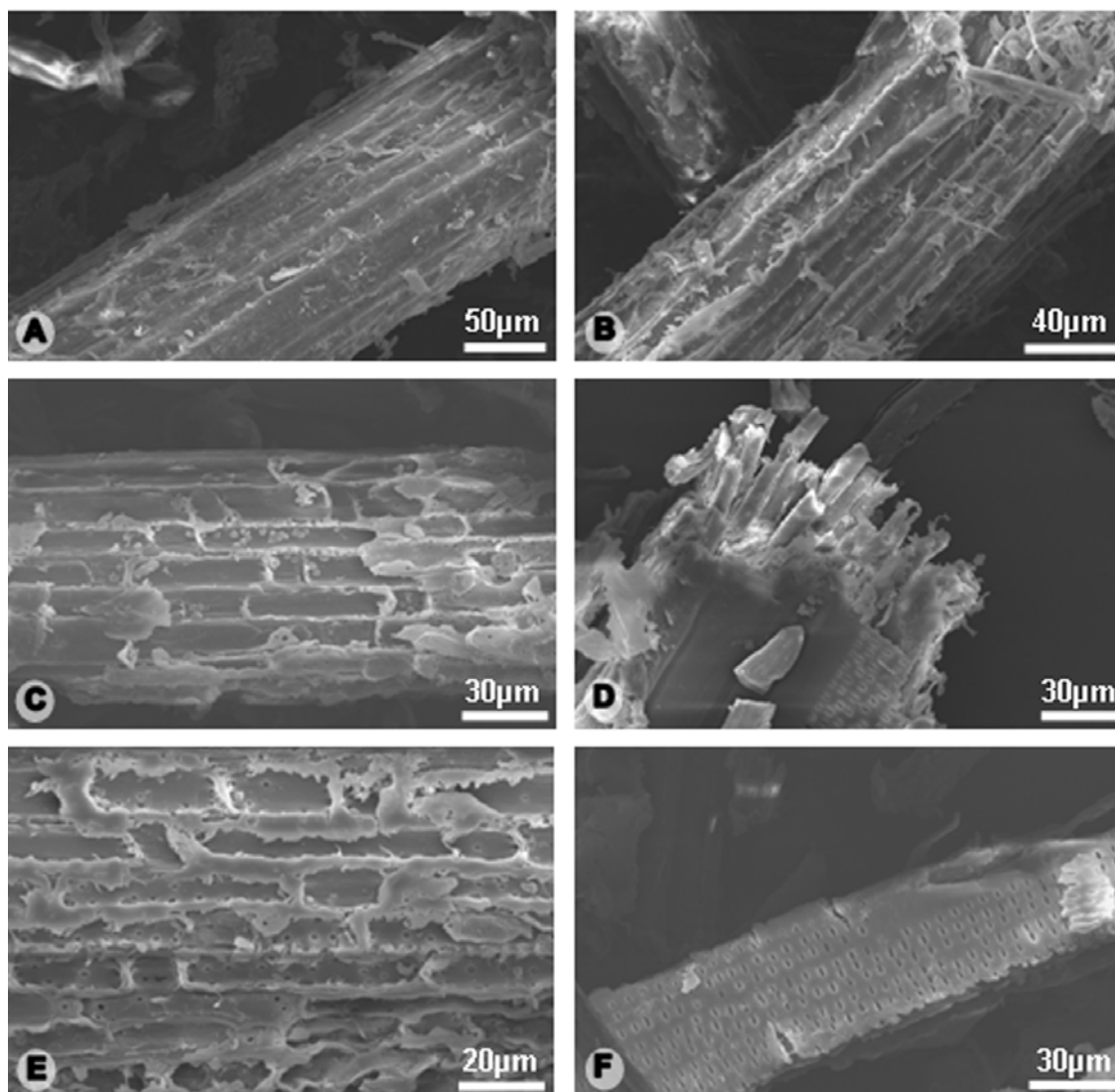


Figura 3.1 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de bambu: (A) e (B) elementos de xilema de amostras de bambu não tratados; (C) células de parênquima do bambu tratado com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (D) elementos de xilema do bambu tratado com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (E) células de parênquima do bambu tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos; e (F) elemento de xilema do bambu tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos.

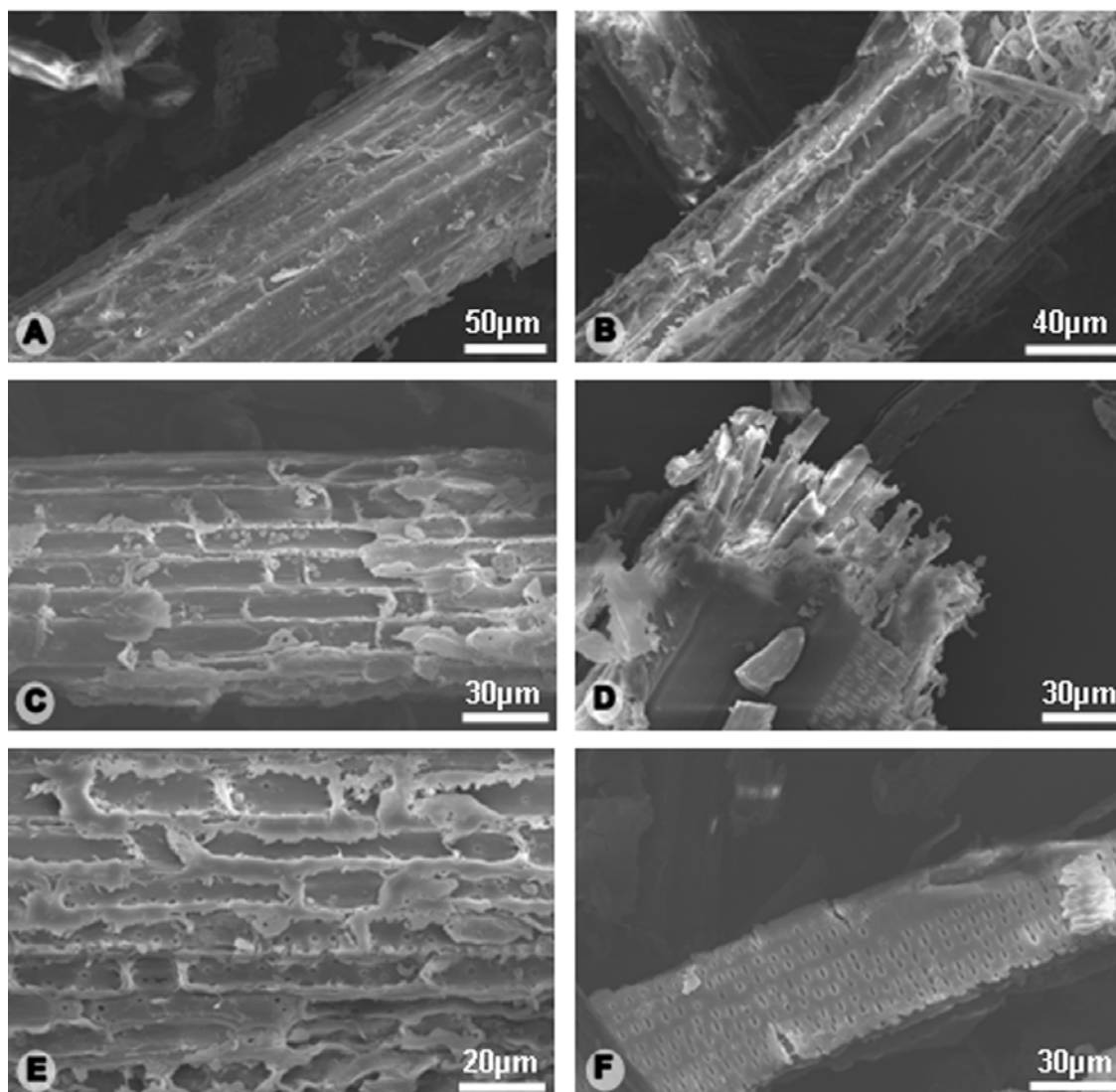


Figura 3.1 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de bambu: (A) e (B) elementos de xilema de amostras de bambu não tratados; (C) células de parênquima do bambu tratado com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (D) elementos de xilema do bambu tratado com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (E) células de parênquima do bambu tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos; e (F) elemento de xilema do bambu tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos.

A Figura 3.2A e B apresenta as micrografias de amostras de forrageira não tratadas, onde se visualiza a superfície de elementos de vaso íntegros. Já na Figura 3.2C e E pode-se verificar o efeito da hidrólise ácida sobre estes elementos de vaso, visto que

os mesmos estão bastante deteriorados. As micrografias da Figura 3.2D e F mostram células de parênquima rompidas.

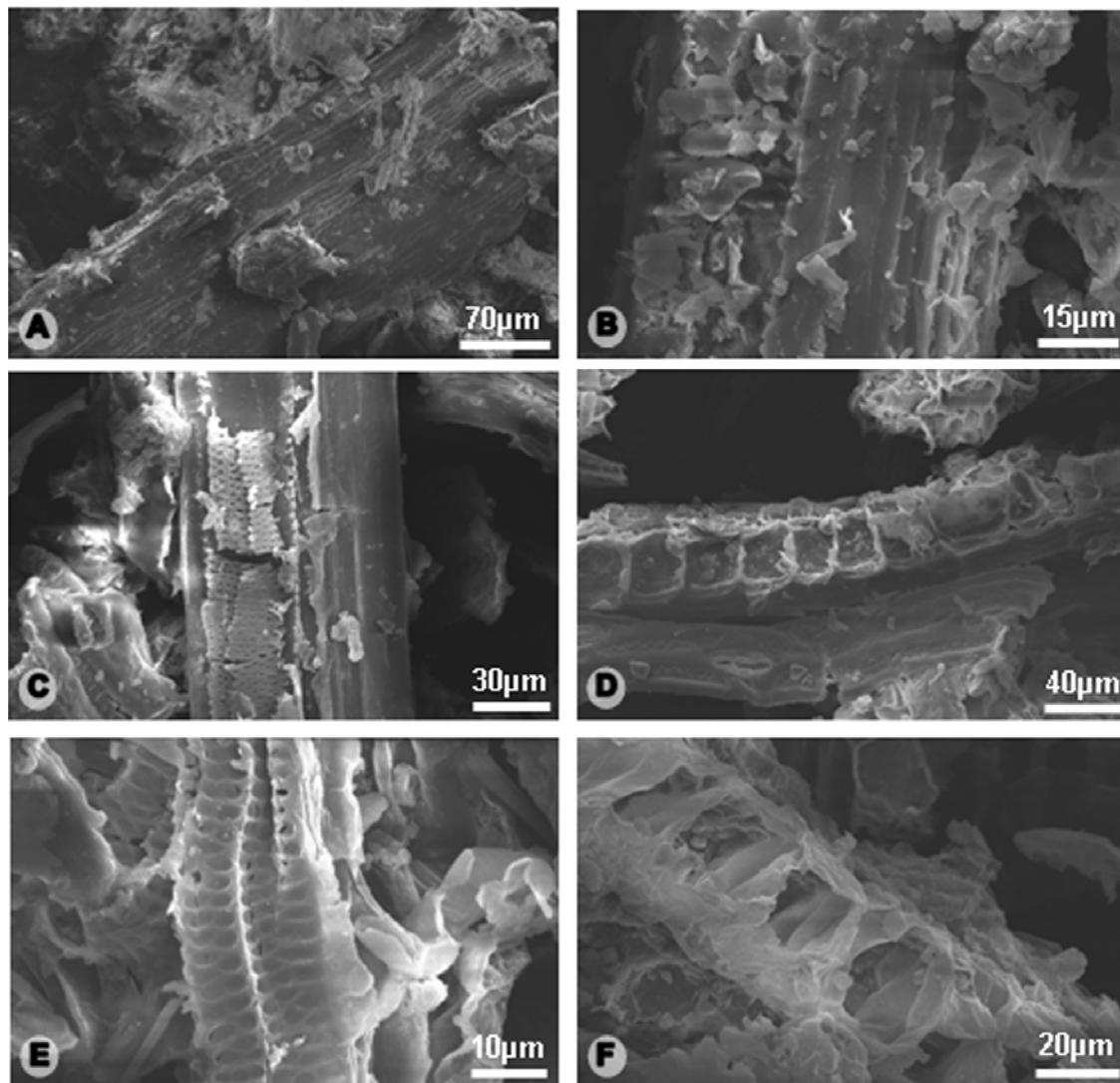


Figura 3.2 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de forrageira: (A) e (B) elementos de xilema de amostras de forrageira não tratadas; (C) elementos de vaso da forrageira tratada com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (D) células de parênquima da forrageira tratada com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (E) elemento de xilema da forrageira tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos; e (F) células de parênquima da forrageira tratada com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos.

A Figura 3.3A e B mostram os elementos de xilema de amostras de bagaço de cana que não passaram pelo tratamento ácido. Verifica-se a integridade destes elementos nestas amostras. As micrografias da Figura 3.3C a F mostram elementos de xilema deteriorados pelos tratamentos ácidos.

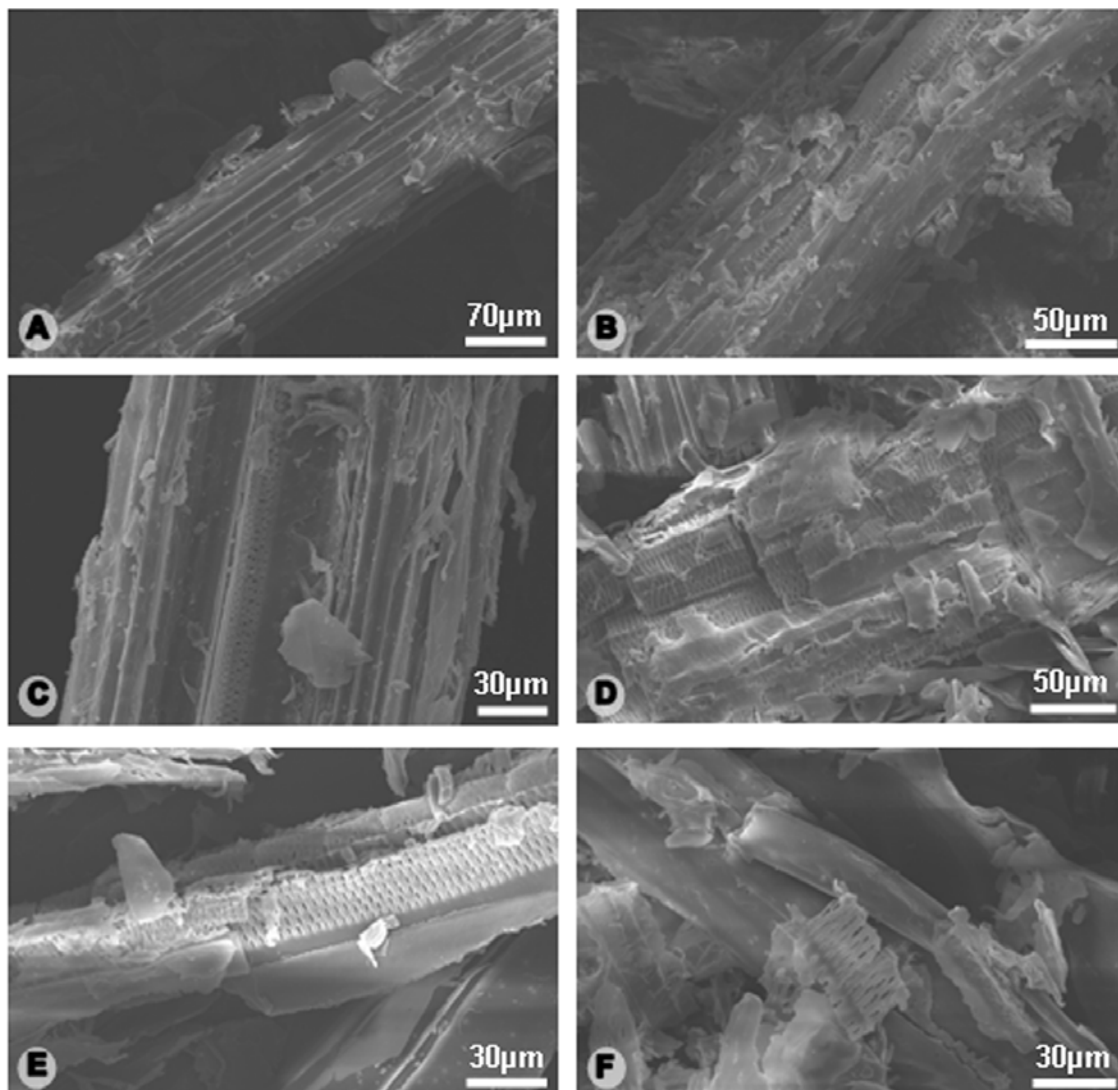


Figura 3.3 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de cana: (A) e (B) elementos de xilema de amostras de bagaço de cana não tratados; (C) e (D) elementos de xilema do bagaço tratado com 0,5% de ácido sulfúrico por 30 minutos; (E) e (F) elemento de xilema do bagaço tratado com 2% de ácido sulfúrico por 90 minutos.

3.4. CONCLUSÕES

- A partir da composição química das matérias-primas observa-se que o bambu obteve em torno de 45% de celulose, 20% de hemicelulose e 22,5% de lignina. O bagaço de cana apresentou um teor de aproximadamente 43% de celulose, 24,7% de hemicelulose e 20,2% de lignina. A forrageira apresentou um menor teor de lignina e hemicelulose, obtendo valores em torno de 18,8% e 14,5%, respectivamente;
- Não houve grandes diferenças, com relação à concentração de glicana, nos pré-tratamentos realizados para as diferentes biomassas;
- A hidrólise ácida foi mais eficiente para o bagaço e para a forrageira, visto que 82% e 73,3% de hemicelulose foram liberados destas biomassas, respectivamente. Já o bambu perdeu apenas 65,7% da sua hemicelulose inicial;
- Para o bambu a condição mais indicada para o pré-tratamento ácido diluído seria de 1% de ácido sulfúrico com um tempo de retenção de 60 minutos.
- A concentração ideal de ácido sulfúrico para pré-tratar a forrageira foi de 0,5%; e dentro desta concentração, o tempo de 90 minutos foi o mais indicado;
- Levando-se em consideração o custo benefício, para o bagaço de cana, o pré-tratamento mais indicado seria o que utiliza 0,5% de ácido sulfúrico com um tempo de retenção de 30 minutos;
- O bagaço de cana mostrou-se bastante promissor para a produção de bioetanol, visto que necessita de condições bem mais brandas e, consequentemente, mais “baratas” para ser pré-tratada com ácido sulfúrico diluído.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Maíra Nicolau, **Caracterização de celulases e hemicelulases dos fungos *Acremonium zeae* e *Acremonium* sp.** Dissertação: Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- ARIFOGLU, N.; ÖGEL, Z.B. Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture *Torula thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology** 27 ,560–569, 2000.
- ASSAD, E.D., PINTO, H.S., JUNIOR, J.Z., ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agro climático do café no Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, v.39, n. 11, 2004.
- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, Essex, v. 5, n. 4, p. 309-318, 2002.
- BARRICHELLO, L.E.G.; FOELKEL, C.E.B. Deslignificação alcalina rápida para a produção de celulose química de *Bambusa vulgaris* var. vitatta. **IPEF** n.11, p.83-90, 1975.
- BISARIA, R., MADAN, M., VASUDEVAN, P. Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 58, 1997.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. FAO Symposium – “The role of agricultural biotechnologies for production of bioenergy in developing countries”. Disponível em: www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm. Acessado em 7 de abril de 2008.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURKE RM, CAIRNEY JWG. Purification and characterization of a β -1-4-endoxylanase from the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. **New Phytologist**. 135:345-352, 1997.
- CARDONA, C. A., SÁNCHEZ, O. J., Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**. V. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CHEUNG, S.W., ANDERSON, B.C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. **Bioresour. Technol.** 59, 81–96, 1997.
- COELHO, S.T. Biofuels - Advantages and Trade Barriers - Background Paper to the Expert Meeting for Sectoral Trade Review of Developing Country Participation in New and Dynamic Sectors Session on Biofuels - Genebra, Fevereiro, 2005.
- COLLINS T., GERDAY C., FELLER G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. 29: 3-23, 2005.
- COUTO, L. C., COUTO, L., Watzlawick, L. F., CÂMARA, D. Vias de valorização energética da biomassa. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 1, p. 71-92, 2004.
- DONALDSON, L. A., WONG, K. K. Y. & MACKIE, K. L. Ultra-structure of steam-exploded wood. **Wood Sci. Technol.**, v. 22, p. 103-14, 1988.
- DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.
- DUTTA T, SAHOO R, SENGUPTA R, RAY SS, BHATTACHARJEE A, GHOSH S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 35:275–282, 2008.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Effect of grow substrate, method of fermentation and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35 (11): 1531-1538, 2008.
- FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, v. 3, p. 465-484, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FOODY, B. E. & FOODY, K. J. Development of an integrated system for producing ethanol from biomass. In: **Energy from Biomass and Wastes**, ed. D. L. Klass. Institute of Gas Technology, Chicago, p. 1225-43, 1991.
- GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- GAO J, WENG H, ZHU D, YUAN M, GUAN F, Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology** 99:7623–7629, 2008.
- GOLDEMBERG, J. **“Brazilian Energy Initiative”** World Summit On Sustainable Development, Joanesburgo, África do Sul. Setembro, 2002.
- GOLDEMBERG J. Ethanol learning curve- the Brazilian experience. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 26/3, p. 301-304, 2003.
- GOLDEMBERG, J. The Case for Energy Renewables. In: **International Conference for Renewable Energies**. Bonn. Thematic Background Paper, Alemanha, 2004.
- GOLDEMBERG, J. Option Paper on Renewable Energy, Energy Efficiency and Climate Change Canadian Renewable Energy Alliance (CanREA). In: **COP 11/MOP 1**. Montreal, Dezembro 2006.
- GOLDSCHMID,O. **Ultraviolet spectra**. In: **Sarkanen,K.V. e Ludwig,C.H. Ed. Lignins**. New York, Wiley-Interscience, 1971. p.241-266, 1971.
- GOMIDE, J.L. e DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, São Paulo, v.47, n.8, p.36-38, 1986.
- GOYAL, A., GHOSH, B. & EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Biores. Technol.**, v. 36, p. 37-50, 1991.
- GRAY, K.A., ZHAO, L., EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141–146, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GROUS, W. R., CONVERSE, A. O. & GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 8, p. 274-80, 1986.
- GUARDABASSI, P. M. **Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento**. 123 p. Dissertação (Mestrado – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia) – EP / FEA / IEE / IF da Universidade de São Paulo, 2006.
- GUIA EXAME – Agronegócio. **Os 10 novos polos do agronegócio**, p. 11, 2005.
- GUO, G.; CHEN, W.; CHEN, W.; MEN, L.; HWANG, S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology** xxx, 2008.
- HAHN-HÄGERDAL, B., PAMMENT, N. Microbial pentose metabolism. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 113–116, 1207–1209, 2004.
- HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, G., LIDÉN, ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006.
- HALL, C. W. Energy Sources and Conversions Relating Foods. In: **Food and Energy Resources**, Edited by PIMENTEL, D. & HALL, C. W, Academy Press, INC., p. 25-42, London, 1984.
- HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.**, n. 293, p. 781-788, 1993.
- IEA, 2002. **World Energy Outlook**, 2002. Paris, France, 2002.
- INTERNATIONAL CONFERENCE FOR RENEWABLE ENERGIES Political Declaration. Bonn, 4 de junho de 2004. Disponível em: **www.renewables2004.de/pdf/Political_declaration_final.pdf**. Acesso em: Dezembro de 2006.
- JACKMAN, E.A. Industrial alcohol. In: **Bu’lock JD, Christiansen B (eds) Basic biotechnology**. Academic, London, p. 309–336, 1987.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JEFFRIES T.W. Biochemistry of Microbial Degradation-Biodegradation of lignin and hemicelluloses. Kluwer Academic Publishers 233-277p, 1994.
- JØRGENSEN H; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32 851-861, 2003.
- JØRGENSEN H; MØRKEBERG, A.; KROGH, K.B.R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36 42–48, 2005.
- KARBOUNE S, GERAERT PA, KERMASHA S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of Agriculture and Food chemistry**. 56:903–909, 2008.
- KAREKESI, S., COELHO, S. T., LATA, K. Traditional Biomass Energy: Improving its Use and Moving to Modern Energy Use. In: **International Conference for Renewable Energies**, 2004, Bonn. Thematic Background Paper, Alemanha, 2004.
- KYOTO PROTOCOL (1997). Disponível em: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>. Acesso em: Dezembro de 2006.
- LATIF, F., RAJOKA, M. I., MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 343348,1995.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1–24, 1997.
- LIMING X, XUELIANG S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology** 91:259–262, 2004.
- LIN, Y., TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, p. 627–642, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LORA, E. S. Tecnologia e Aplicação Racional de Energia Elétrica e de Fontes Renováveis na Agricultura. In: **XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, p. 97-128, Campina Grande, 1997.
- MILAGRES, A. M. F., BORGES, L., AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261-269, 1994.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M.: Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MATTHEW, H., ASHLEY, O., BRIAN, K., ALISA, E., BENJAMIN, J. S. Wine making 101. Disponível em: <http://www.arches.uga.edu/~matthaas/strains.htm>, 2005.
- MEDVE, J., SDHLBERG, J. & TJEMELD, F. Adsorption and synergisms of cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Biotechnol. Bioengng**, 44, 1064-73, 1994.
- MENEZES, A.R.; SILVA, I.S.; INÁCIO, K.R; PIUBELLI, F.A.; DURRANT, L.R. Utilização do bagaço de cana para a produção de enzimas lignocelulolíticas. **UNICAMP**, 2005.
- MENEZES, T. J. B., HENNIES, P. T. Sistema celulolítico de *Aspergillus niger* em substrato sólido de bagaço de cana de açúcar tratado. **Coletânea do ITAL**, v. 24, n. 1, p. 75-89, 1994.
- McDONALD, T., YOWELL, G., MCCORMACK, M. Staff report. US ethanol industry production capacity outlook. California energy commission. Disponível em: http://www.energy.ca.gov/reports/2001-08-29_600-01-017.PDF, 2001.
- McILVAINE, TC. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry** 49:183-186, 1921.
- McMILLAN, J.D. **Hemicellulose conversion to ethanol**. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 287-313, 1996.
- McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**, ed. M. E. Himmel, J. O. Baker & R. P. Overend.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Chemical Society Symposium Series 566, Washington, DC, p. 292-324, 1994.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31, 426–428, 1956.
- MUSSA, M. A Global Growth Rebound: how strong for how long? **Institute for International Economics**, September 9, 2003.
- NASCIMENTO, R.F.; CERRONI, J.L.; CARDOSO, D.R.; NETO, B.S.L.; FRANCO, D.W. comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V.18 n. 3, Campinas, 1998.
- OLSSON L, CHRISTENSEN TMIE, HANSEN KP, PALMQVIST EA. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology** 33:612–619, 2003.
- PASTORE, G.M., PARK, Y.K., MIN, D.B. Production of a fruity aroma by *Neurospora* from beiju. **Mycol Res**, 98:25–35, 1994.
- PEREIRA, M.L.R. **Composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandú e da *Brachiaria híbrida* Cv. Mulato em diferentes doses de adubação nitrogenada, no sudoeste goiano.** Monografia: Curso de Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias e Faculdades Integradas de Mineiros, 2007.
- PIRES, A.J.V., REIS, R.A., CARVALHO, G.G.P., SIQUEIRA, G.R., BERNARDES, T.F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 35, n.3, p. 2128-2134, 2006.
- PLATAFORMA DE BRASÍLIA SOBRE ENERGIAS RENOVÁVEIS (2002). Disponível em: http://www.renewables2004.de/pdf/platform_declaration.pdf.
- ROMERO MD, AGUADO J, GONZÁLEZ L, LADERO M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology** 25:244–250, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SADDLER, J. N., RAMOS, L. P. & BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: **Bioconversion of Forest and Agricultural Residues**, Chapter 3, ed. J. N. Saddler. CAB International, Oxford, UK, p. 73-92, 1993.
- SHAH, A.R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry** 40, 1763–1771, 2005.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.30, p.271-291, 2003.
- SARKO, A. A cellulose – How much do we know about its structure? In: **Wood and cellulose: Industrial utilization**. Biotechnology, Structure and Properties. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- SHLESER, R. Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii State Department of Business, Economic Development & Tourism. Disponível em: <http://WWW.hawaii.gov>. Acessado em 1994.
- SINGH S, PILLAY B, DILSOOK V, PRIOR BA. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. **Journal of Applied Microbiology** 88:975-982, 2000.
- SOUZA, S. N. M., SORDI, A., OLIVA, C. A. Potencial de energia primária de resíduos vegetais no Paraná. In: **Encontro de Energia no Meio Rural**, 4. Campinas. Anais... São Paulo. Outubro de 2002.
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. **Bioresource technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, Y., CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology** 96,1599–1606, 2005.
- SUHAS P.J.M., CARROTT M.M.L., CARROTT R. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology** 98:2301–2312, 2007.
- STOCKBERGER, P. An overview of near-commercial and commercial solvent-based pulping processes. **Tappi J.**, 76, 71-4, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SZENDEFY J, SZAKACS G, CHRISTOPHER L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology** 39:1354–1360, 2006.
- TAMANINI, C., HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.
- THRING, R.W., CHORENT, E., OVEREND, R. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature. **Biomass**, v. 23, p. 289–305, 1990.
- UNDP, UNDESA, WEC. **World Energy Assessment**. ISBN 9211261260. Nova Iorque, 2000.
- UNITED NATIONS KYOTO PROTOCOL, 1997. Disponível em: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>. Acesso em: Dezembro de 2006.
- WALLIS, A. F. A., WEARNE, R.H.; WRIGHT, P. J. Chemical analysis of polysaccharides in plantation eucalypt woods and pulps. **Appita J.**, 49 (4) 258-262, 1996.
- WINNER NETWORK, 2002. Village Level Bioenergy System Based on Sweet Sorghum. Disponível em: <http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224/loose.dtd/>. Outubro de 2006.
- WU, J., JU, L.K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. **Biotechnol. Prog.** n. 14, p. 649–652, 1998.
- XIMENES, E.A.; FELIX, C.R.; ULHOA, C.J. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of One β -Glucosidase. **Current Microbiology**, v. 32, 119-123, 1996.
- ZAPPALA, M.; FALLICO B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison . **Food Control** 16. 273–277, 2005.