

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**PROCESSOS E TECNOLOGIAS**

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR**  
**MACROFUNGOS REGIONAIS PARA POSTERIOR PRODUÇÃO DE**  
**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Caroline Hartmann**

Caxias do Sul, 2017

**Caroline Hartmann**

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR  
MACROFUNGOS REGIONAIS PARA POSTERIOR PRODUÇÃO DE  
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Camassola e co-orientado pelo Dr. Félix Gonçalves de Siqueira.

Caxias do Sul, 2017

**“Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por macrofungos regionais para posterior produção de etanol de segunda geração.”**

**Caroline Hartmann**

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 25 de agosto de 2017

Banca Examinadora:

Dra. Marli Camassola  
Orientadora  
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Coorientador  
Embrapa

Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
Universidade Federal de São Carlos

Dr. Henrique Macedo Baudel  
America Biomass Technologies

Dr. Mauricio Moura da Silveira  
Universidade de Caxias do Sul

H333p Hartmann, Caroline

Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por macrofungos regionais para posterior produção de etanol de segunda geração / Caroline Hartmann. – 2017.

95 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2017.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Felix Gonçalves de Siqueira.

1. Etanol de segunda geração. 2. Pré-tratamento biológico. 3. Basidiomicetos. 4. Biomassas lignocelulósicas. I. Camassola, Marli, orient. II. Siqueira, Felix Gonçalves de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no oceano. Mas sem ela, o oceano seria menor.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

*Dedico esse trabalho a minha família, pelo apoio,  
carinho e amor incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos a todos aqueles que de forma direta ou indireta, tiveram participação neste trabalho:

- a Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade e pela saúde e força para alcançar esse objetivo;
- aos meus orientadores Prof. Dr<sup>a</sup>. Marli Camassola e Dr. Félix Gonçalves de Siqueira, pelo conhecimento compartilhado e pela dedicação;
- à técnica do Laboratório de enzimas e Biomassas, Roselei C. Fontana, por toda a ajuda prestada, pelos ensinamentos, paciência e por saber exatamente o lugarzinho de tudo que precisei utilizar no laboratório;
- aos professores da banca de acompanhamento, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e Dr. Mauricio Moura da Silveira, pelos ensinamentos e auxílio;
- aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias;
- aos colegas e amigos do Laboratório de Enzimas e Biomassas, por terem me recebido tão bem e tornarem o local de trabalho mais divertido. Agradeço em especial à Me. Andreia Toscan, a Dr. Fernanda Bettin e aos componentes da Salinha VIP Me. Daiane Menegol, Me. Sheila Montipó e Me. Willian Schneider, pela amizade, companheirismo e apoio.
- à colega de mestrado e amiga Analia Borges Folle, pelos momentos compartilhados, conselhos e companheirismo;
- à minha família, meus pais Vitor Alfeu Hartmann e Rosinete Hartmann e meu irmão João Vitor Hartmann pelo incentivo e amor, por ter uma família maravilhosa com a qual eu sei que sempre posso contar;
- ao Paulo, por sempre acreditar em mim, às vezes até mais do que eu mesma, por me acompanhar e me incentivar sempre;
- ao apoio estrutura e financeiro da UCS, FAPERGS, CNPq e EMPRAPA;

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, minha sincera gratidão.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>v</b>
<b>ABREVEATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
3.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	19
3.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G .....	22
<b>3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar no contexto do Setor Sucoenergético.</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Resíduos agroflorestais: etanol de serragens.....</b>	<b>24</b>
3.3 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	25
3.4 PRÉ-TRATAMENTOS.....	28
<b>3.4.1 Pré-tratamento Biológico .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2 Combinação de pré-tratamento biológico com outros métodos.....</b>	<b>34</b>
3.6 MACROFUNGOS E ARSENAL LIGNOLÍTICO.....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 LINHAGENS.....	39
4.2 BIOMASSAS.....	39
4.3 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS .....	40
4.4 PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA BIOMASSA .....	40

4.5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA .....	41
4.6	FERMENTAÇÃO .....	42
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	42
4.7.1	Determinação indireta do crescimento celular .....	42
4.7.2	Determinação das atividades enzimáticas .....	43
4.7.3	Caracterização das biomassas.....	45
4.7.4	Análise dos açúcares redutores e glicose.....	46
4.8	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	46
4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	47
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	48
5.1.1	Avaliação do crescimento e produção de enzimas em bagaço de cana-de- açúcar.....	48
5.1.2	Análise dos componentes químicos do bagaço de cana-de-açúcar.	53
5.1.3	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado....	57
5.1.4	Fermentação alcoólica dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar .....	60
5.2	SERRAGEM DE EUCALIPTO .....	62
5.2.1	Avaliação do crescimento e produção de enzimas em serragem de eucalipto.....	61
5.2.2	Análise dos componentes químicos da serragem de eucalipto .....	64
5.2.3	Hidrólise enzimática da serragem de eucalipto pré-tratada .....	68
5.2.4	Fermentação alcoólica dos hidrolisados de serragem de eucalipto.	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de fluxo do processo de conversão de biomassa celulósica em etanol (KUMAR et al., 2016, adaptado).....	21
<b>Figura 2.</b> Estrutura da parede celular da planta e diferentes biocomposições (LEE, HAMID e ZAIN, 2014, com modificações).....	25
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas de cadeias de celulose (LEE, HAMID e ZAIN, 2014, com modificações). .....	26
<b>Figura 4.</b> Estrutura parcial da hemicelulose e hexoses e pentoses que compõe a estrutura polimérica da hemicelulose (FERREIRA, ROCHA e SILVA, 2009, com modificações).....	27
<b>Figura 5.</b> Estruturas químicas da lignina.....	28
<b>Figura 6.</b> Comparação de critérios importantes para 20 diferentes tecnologias de pré-tratamento (DALE e ONG, 2012; com modificações).....	31
<b>Figura 7.</b> Desconstrução da biomassa lignocelulósica por enzimas fúngicas (GUPTA, et al., 2016, com modificações).....	37
<b>Figura 8.</b> Sistema de cultivo sólido em <i>bags</i> de polietileno.....	41
<b>Figura 9.</b> Variação do crescimento fúngico de diferentes basidiomicetos, em massa de micélio por massa de biomassa seca, em função do tempo de cultivo em meio composto por bagaço de cana-de-açúcar.....	48
<b>Figura 10.</b> Variação da atividade de lacases [A], manganês peroxidases [B] e peroxidases totais [C] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.....	50
<b>Figura 11.</b> Variação da atividade de $\beta$ -glicosidades [A], endoglicanases [B] FPA [C] e xilanases [D] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.....	51
<b>Figura 12.</b> Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar antes e após dias de pré-tratamento biológico por diferentes basideomicetos.....	56
<b>Figura 13.</b> Digestibilidade da celulose de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por diferentes espécies de basidiomicetos por 49 dias, após processo de 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de <i>P. echinulatum</i> ).....	57
<b>Figura 14.</b> Açúcares redutores e glicose liberados por massa de biomassa seca durante a hidrólise enzimática (complexo enzimático de <i>P. echinulatum</i> ) de amostras de bagaço de	

cana-de-açúcar, após diferentes tempos de pré-tratamento biológico por [A] e [B] *Schizophyllum comune* VE07, [C] e [D] *Pleurotus pulmonarius* PS2001, [E] e [F] *Pleurotus albidus* 88F-13 e [G] e [H] *Trametes villosa* 82I6... ..58

**Figura 15.** Glicose liberada após 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar após diferentes tempos de pré-tratamento biológicos por *Pleurotus albidus* 88F-13 [A]; *Pleurotus pulmonarius* PS2001 [B] e *Trametes villosa* 82I6 [C].....59

**Figura 16.** Concentração de glicose, xilose e etanol (mg / mL) obtida a partir da fermentação de amostras pré-tratadas por *Trametes villosa* 82I6 para 0 [A], 7 [B], 14 [C], 21 [D], 28 [E ], 35 [F], 42 [G] e 49 [H] dias.....61

**Figura 17.** Variação do crescimento fúngico de diferentes basidiomicetos, em gramas de micélio por grama de biomassa seca, em função do tempo de cultivo.....63

**Figura 18.** Variação da atividade de lacases [A], manganês peroxidases [B] e peroxidases totais [C] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.....64

**Figura 19.** Variação da atividade de  $\beta$ -glicosidases[A], endoglicanases [B], FPA [C] e xilanases [D] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.....65

**Figura 20.** Microscopia eletrônica de varredura da serragem de eucalipto antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes basidiomicetos.....68

**Figura 21** – Digestibilidade da celulose de serragem de eucalipto pré-tratada por diferentes espécies de basidiomicetos por 49 dias, após processo de 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*).....69

**Figura 22.** Concentração de açúcares redutores (AR) e glicose liberados durante a hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de serragem de eucalipto, após diferentes tempos de pré-tratamento biológico por [A] e [B] *Pleurotus pulmonarius* PS2001 e [C] e [D] *Trametes villosa* 82I6.....70

**Figura 23.** Glicose liberada após 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de serragem de eucalipto após diferentes tempos de pré-tratamento biológicos por [A] *Pleurotus pulmonarius* PS2001 e [B] *Trametes villosa* 82I6..71

**Figura 24.** Concentração de glicose, xilose e etanol (mg/mL) obtida a partir da fermentação

de amostras pré-tratadas por <i>Trametes villosa</i> 82I6 para 0 [A], 7 [B], 14 [C], 21 [D], 28 [E ], 35 [F], 42 [G] e 49 [H] dias.....	72
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - As análises da composição do bagaço de cana-de-açúcar antes e após 49 dias de pré-tratamento biológicos por diferentes espécies de basidiomicetos.....	53
<b>Tabela 2.</b> Redução em bandas específicas nos espectros FTIR do bagaço de cana-de-açúcar causado pelo pré-tratamento biológico.....	54
<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos rendimentos máximos de etanol obtidos pela fermentação - utilizando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 - da glicose liberada na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por <i>T. villosa</i> 82I6 por diferentes períodos de tempo.....	62
<b>Tabela 4.</b> Análises da composição da serragem de eucalipto antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes espécies de basidiomicetos.....	66
<b>Tabela 5.</b> Redução em bandas específicas nos espectros FTIR da serragem de eucalipto causado pelo pré-tratamento biológico.....	67
<b>Tabela 6.</b> Avaliação dos rendimentos máximos de etanol obtidos pela fermentação - utilizando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 - da glicose liberada na hidrólise de serragem de eucalipto pré-tratada por <i>Trametes villosa</i> 82I6 por diferentes períodos de tempo.....	74
<b>Tabela 7.</b> Principais efeitos de diferentes estratégias de PTB encontrados na literatura em comparação com os dados obtidos no presente trabalho.....	76

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Diferentes estratégias de pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica e suas vantagens (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2015; SHIRKAVAND et al., 2016, com modificações).....	32
<b>Quadro 2.</b> Linhagens empregadas em pré-tratamentos biológicos e respectivos códigos de coleta e de acesso da micoteca da UCS.....	39
<b>Quadro 3.</b> Metodologias utilizadas para a caracterização das biomassas.....	46

## ABREVEATURAS

AAO: glioxal oxidase  
AR: açúcares redutores  
BGLs: betaglicosidases  
CBH: celobiohidrolases  
CDH: celobiose desidrogenase  
CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento  
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico  
EGs: endoglicanases  
FDH: NAD-dependente formiato desidrogenase  
FPA: atividade sobre papel filtro – atividade celulásica total  
FTIR: espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier  
GLO: glioxal oxidase  
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*  
IB: Instituto de Biotecnologia  
Lac: Lacase  
LCMAT: Laboratório de Caracterização de Materiais  
LiP: Lignina peroxidase  
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura  
MnP: manganês-peroxidase  
NREL: *National Renewable Energy Laboratory*  
ODC: oxalato decarboxilase  
PTB: pré-tratamento biológico  
PVD: *Physical Vapour Deposition*  
UCS: Universidade de Caxias do Sul  
YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose*  
 $\rho$ NPG:  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

## RESUMO

Com a crescente busca por fontes energéticas renováveis alternativas aos combustíveis fósseis, o uso de biomassa lignocelulósica, como bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto, surge como uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração. Porém, são necessários pré-tratamentos para facilitar a ação das enzimas sobre a biomassa. Entre os métodos de pré-tratamentos, o biológico tem sido estudado, por não demandar o uso de químicos e altos custos energéticos, apresentar condições brandas de processo e não levar à formação de compostos inibidores às etapas posteriores. No presente trabalho, bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto foram pré-tratados por diferentes espécies de basidiomicetos. As amostras pré-tratadas foram hidrolisadas com complexo enzimático de *Peninillium echinulatum* e posteriormente realizou-se a fermentação dos açúcares liberados. Com relação à produção de enzimas lignolíticas, as espécies que se destacaram em bagaço de cana-de-açúcar foram *Marasmiellus palmivorus* VE111, *Pleurotus pulmonarius* PS2001, *Pleurotus albidus* 88F-13, *Pycnoporus sanguineus* PR32 e *Trametes villosa* 82I6. Em serragem de eucalipto, os teores destas enzimas foram significativamente inferiores aos obtidos com as mesmas espécies em bagaço de cana-de-açúcar. Em análise de espectros de FTIR, *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 apresentaram proporções favoráveis entre o consumo de celulose, hemicelulose e lignina em ambas as biomassas testadas. Em ensaios de hidrólise enzimática, pré-tratamento biológico por *T. villosa* 82I6 aumentou a digestibilidade da celulose presente na serragem de 3,7% para 42% e do bagaço de cana-de-açúcar de 12,9% para 22%. *T. villosa* 82I6 destacou-se, visto que, em ambas as biomassas, foi o basidiomiceto que promoveu o maior liberação de glicose na etapa de hidrólise em amostras pré-tratadas por menores tempos. Em fermentação alcoólica dos hidrolisados de ambas as biomassas pré-tratadas por *T. villosa* 82I6, o rendimento em etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar foi aumentado para  $20,2 \pm 0,5$  mg/g após 49 dias de tratamento, enquanto que o controle apresentava rendimento de  $10,1 \pm 0,8$  mg/g. O rendimento em etanol a partir de serragem de eucalipto foi aumentado para  $25,5 \pm 0,7$ ,  $18,2 \pm 0,03$  e  $25,5 \pm 3,8$  mg/g, após respectivamente 7, 28 e 42 dias de tratamento, enquanto que o controle apresentava rendimento de  $6,5 \pm 0,2$  mg/g. Foi demonstrado o potencial do *T. villosa* 82I6 como agente biológico em pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas e o impacto do pré-tratamento sobre as etapas subsequentes

**Palavras chave:** pré-tratamento biológico, biomassa lignocelulósica, etanol 2G.

## ABSTRACT

With the growing demand for renewable energy sources as alternatives to fossil fuels, the use of lignocellulosic biomass, such as sugarcane bagasse and eucalyptus sawdust, is an alternative for the production of second generation ethanol. However, pretreatments are needed to facilitate the action of enzymes on biomass. Among the pretreatment methods, the biological has been studied, since it does not require the use of chemicals and high energy costs, to present soft conditions of process and not formation of inhibitory compounds to the later stages. In the present study, sugarcane bagasse and eucalyptus sawdust were pretreated by different basidiomycete species. The pretreated samples were hydrolyzed with enzymatic complex of *Peninillium echinulatum* and later the fermentation of the liberated sugars was carried out. In relation to the production of lignolytic enzymes, the species that stood out in sugarcane bagasse were *Marasmiellus palmivorus* VE111, *Pleurotus pulmonarius* PS2001, *Pleurotus albidus* 88F-13, *Pycnoporus sanguineus* PR32 and *Trametes villosa* 82I6. In eucalyptus sawdust, these enzymes were significantly lower than those obtained by the same species in sugarcane bagasse. In the analysis of FTIR spectra, *T. villosa* 82I6 and *P. pulmonarius* PS2001 presented favorable proportions between cellulose, hemicellulose and lignin consumption in both biomasses tested. In enzymatic hydrolysis assays, biological pretreatment with *T. villosa* 82I6 increased the digestibility of the pulp present in the sawdust to 42% and of the sugarcane bagasse to 22%. *T. villosa* 82I6 was highlighted, since in both biomass, it was the basidiomycete that promoted the highest glucose release in the hydrolysis step, in samples pretreated for shorter times. In alcoholic fermentation of the hydrolysates of both biomasses pretreated with *T. villosa* 82I6, ethanol yield from sugarcane bagasse was increased to  $20.2 \pm 0.5$  mg/g after 49 days of treatment, while the control presented yield of  $10.1 \pm 0.8$  mg/g. The ethanol yield from eucalyptus sawdust was increased to  $25.5 \pm 0.7$ ,  $18.2 \pm 0.03$  and  $25.5 \pm 3.8$  mg/g, respectively after 7, 28 and 42 days of treatment, while the control presented yield of  $6.5 \pm 0.2$  mg/g. The potential of *T. villosa* 82I6 as a biological agent in pretreatments of lignocellulosic biomass and the impact of pretreatment on subsequent steps has been demonstrated.

**Keywords:** biological pretreatment, lignocellulosic biomass, second generation ethanol.

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com os impactos ambientais negativos causados pelas atividades antrópicas somadas à utilização de combustíveis fósseis, bem como as periódicas crises no setor petrolífero, tem ocasionado o aumento na demanda por fontes renováveis de energia. O etanol é um combustível renovável que contribui de forma muito importante para a diversificação da matriz energética brasileira.

Ao tratar-se de etanol de primeira geração, produzido a partir de sacarose ou amido, há diversas tecnologias completamente desenvolvidas e aplicadas industrialmente. Porém, quando se trata de etanol de segunda geração – obtido a partir de materiais lignocelulósicos – há a necessidade de novas tecnologias.

Os materiais lignocelulósicos são uma opção atraente para a produção deste biocombustível, por serem matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo. A oferta de biomassa tem aumentado devido ao emprego de novas tecnologias na agroindústria, o que tem garantido expansão desta atividade e maior produtividade, resultando em acumulação de materiais lignocelulósicos. Utilizar estes materiais, considerados subprodutos de outras atividades, possibilita aumentar a produção de etanol sem que haja a necessidade de aumentar a área plantada, o que resulta em ganhos em eficiência no processo produtivo.

Na região Sudeste do Brasil, destaca-se a produção de bagaço de cana-de-açúcar, e na Sul, a produção de serragens, entre estas, as serragens de eucalipto. A estreita associação dos principais componentes da biomassa lignocelulósica – celulose, hemicelulose e lignina – confere a estes materiais alta recalcitrância. As serragens de eucalipto, em especial, apresentam maior recalcitrância por possuírem maior teor de lignina em sua composição.

A conversão de biomassa lignocelulósica em etanol ainda esbarra em algumas dificuldades tecnológicas, sendo uma destas o passo de pré-tratamento. As etapas de hidrólise e fermentação precisam ser antecedidas por pré-tratamentos, que visam aumentar a acessibilidade aos açúcares, visto que o caráter recalcitrante dificulta a digestibilidade deste material. Diversos tipos de pré-tratamentos são empregados para esta finalidade como os físicos, os químicos, os físico-químicos e os biológicos, sendo que este último merece atenção. Apesar de ser uma tecnologia pouco desenvolvida, o pré-tratamento biológico tem grande potencial e apresenta vantagens frente aos outros tipos de pré-tratamento, como menor demanda energética, a desnecessidade de uso de químicos e condições mais brandas de condução do processo.

São conhecidos diversos fungos produtores de enzimas capazes de despolimerizar o

complexo existente nos lignocelulósicos, sendo que fungos basidiomicetos lignocelulolíticos são capazes de degradar compostos orgânicos persistentes como a lignina. Dentro deste contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento biológico de bagaço de cana-de-açúcar e de serragens de eucalipto por diferentes macrofungos sobre as etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação em etanol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar pré-tratamentos biológicos de bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto em cultivos em estado sólido de macrofungos e, posteriormente, realizar hidrólise enzimática, a fim de obter açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos enzimáticos dos macrofungos quando cultivados em estado sólido nas biomassas vegetais (bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto).
- Determinar as concentrações de celulose, hemicelulose e lignina das biomassas (bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto) biologicamente tratadas.
- Avaliar a digestibilidade enzimática das biomassas (bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto) biologicamente tratadas utilizando complexo enzimático de *Penicillium echinulatum*;
- Avaliar os rendimentos em etanol durante a fermentação dos hidrolisados por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (cepa comercial).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

As mudanças climáticas e a preocupação com o futuro dos preços e reservas do petróleo têm motivado a busca por combustíveis renováveis (LUO et al., 2009). Após décadas de domínio da indústria petrolífera, uma mudança gradual está ocorrendo e as indústrias passaram a produzir os mesmos produtos derivados de petróleo por outras vias. Muita atenção tem sido dada aos recursos energéticos alternativos, como por exemplo, as biomassas lignocelulósicas. As culturas agro-energéticas e os resíduos vegetais são biomateriais promissores e de baixo custo para a produção de biocombustíveis e geração de energia. No entanto, a transição de uma economia baseada no petróleo para uma que explore o potencial da biomassa não existe sem novos desafios tecnológicos, ecológicos e de sustentabilidade (MONTEIRO, VEIGA e COUTINHO, 2010; MEGAWATI et al., 2011; PAWELZIK et al., 2013; BEZERRA e RAGAUSKAS, 2016).

O etanol é previsto como o biocombustível com maior potencial para substituir os combustíveis fósseis (DIAS et al., 2013). Além disso, contribui de forma muito importante para a redução dos impactos ambientais negativos gerados pela utilização de combustíveis não-renováveis (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007). O etanol desempenha papel importante na economia brasileira, pois pode ser utilizado como combustível nos veículos *flex-fuel* (hidratado), misturado com a gasolina, com vista a baratear o combustível, aumentar sua octanagem e reduzir a emissão de poluentes (anidro), além da utilização na fabricação de tintas, vernizes, solventes, entre outros (CONAB, 2017).

O etanol de primeira geração da cana-de-açúcar tem sido produzido em grande escala há muitas décadas no Brasil (SOCCOL et al., 2010), seguindo o programa nacional Pró-álcool criado pelo governo como resposta à crise do petróleo (KOSTIN et al., 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (2017), na safra de 2016/2017 a produção brasileira de etanol total foi de 27,81 bilhões de litros. Projeta-se que, na próxima década, a demanda de etanol no mercado brasileiro continuará em franca expansão (TOLMASQUIM, 2012).

O etanol de segunda geração - derivado de materiais lignocelulósicos - apresenta vantagens como a ausência de competição com a produção e abundância de alimentos e o baixo preço da matéria-prima (POGANIETZ, 2012; ČUČEK et al., 2011). Assim, o aumento da produção de etanol com matéria-prima lignocelulósica é de fundamental importância para estabelecer um futuro energético sustentável (NIGAM E SINGH, 2011). Pesquisas voltadas à

este tema têm sido desenvolvidas no mundo todo, visando ampliar a produtividade no setor bioenergético (SIMS et al., 2010). Se a tecnologia de produção de etanol celulósico se consolidar, a combinação da produção de etanol de primeira e segunda geração permitirá obter maior quantidade de combustível sem aumentar o volume de matéria-prima cultivada nem a área plantada (PACHECO, 2011).

O etanol de segunda geração pode ser produzido a partir de diversas fontes. No entanto, apesar de a biomassa lignocelulósica ser uma das matérias-primas mais promissoras devido à grande disponibilidade e ao baixo custo, esta tecnologia ainda não está completamente desenvolvida. Além disto, como o processamento da biomassa é mais complexo, implica nos custos totais do etanol lignocelulósico, o que pode prejudicar a solidez econômica do processo. Este fato ressalta a necessidade de desenvolvimento de tecnologias e da seleção adequada das matérias-primas e da configuração de processo, para que se possa obter um produto de qualidade e atingir maior produtividade e menores custos (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007; POGANIETZ, 2012).

De acordo com Balat et al. (2008), o processamento da biomassa a etanol de segunda geração é composto por quatro unidades principais de operações: o pré-tratamento, a hidrólise, a fermentação e a separação do produto - para atender às especificações de combustível.

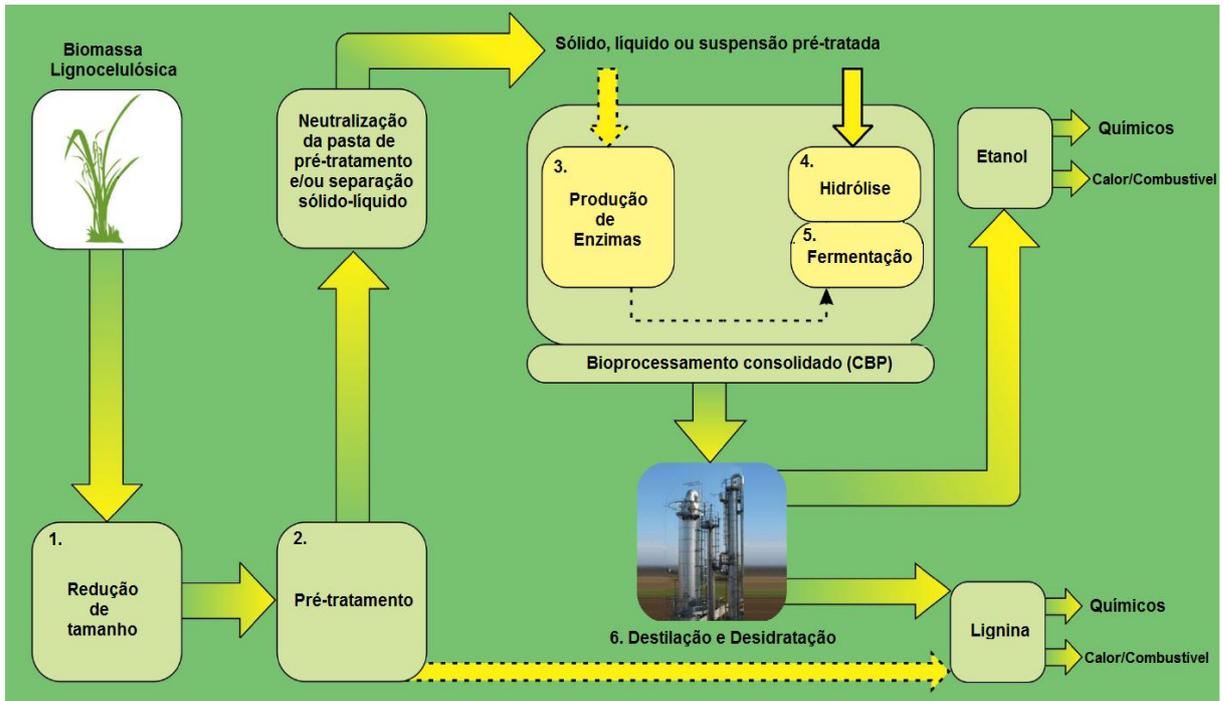
Kumar et al. (2016) descrevem diagrama de fluxo do processo de conversão de biomassa celulósica em etanol, mostrado na Figura 1, que compreende vários passos:

- 1) redução de tamanho de partícula da biomassa;
- 2) pré-tratamento;
- 3) produção de enzimas;
- 4) hidrólise enzimática da fase pré-tratada a açúcares fermentáveis;
- 5) fermentação a etanol e
- 6) recuperação do etanol.

As etapas 3, 4 e 5 têm várias configurações de processo incluindo hidrólise e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), sacarificação e co-fermentação de açúcares de hexoses e de pentoses simultâneas (SSCF) e bioprocessamento consolidado (CBP), que combina as etapas de produção de enzimas, sacarificação enzimática e fermentação em um único passo (KUMAR et al., 2016).

O custo da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, com as tecnologias atuais, é relativamente alto. Além disso, o baixo rendimento continua a ser um dos principais desafios. Além dos desafios e limitações relativos ao transporte e manuseio da biomassa

(MAURYA, SINGLA e NEGI, 2015), o pré-tratamento e a produção das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise são os fatores que mais contribuem para o custo de processamento de etanol de segunda geração (LYND et al., 2008) e, assim, têm atraído muita atenção nos últimos anos (KUMAR et al., 2016).



**Figura 1.** Diagrama de fluxo do processo de conversão de biomassa celulósica em etanol (KUMAR et al., 2016, adaptado).

Pré-tratamentos adequados podem aumentar as concentrações de açúcares fermentáveis após sacarificação enzimática, melhorando assim a eficiência de todo o processo. Nos últimos anos, várias tecnologias de pré-tratamento para a biomassa lignocelulósica foram descritas, a fim de melhorar a produção de etanol. Mas vale ressaltar que nenhuma tecnologia estudada oferece 100% de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis. Existe sempre uma perda, que afeta o rendimento final e aumenta o custo do produto acabado. Embora a combinação de dois ou mais métodos de pré-tratamento tenham mostrado resultados promissores, ainda existe a necessidade de uma extensa investigação nesta área para que um novo processo de tratamento eficiente seja desenvolvido ou que um processo existente seja atualizado para se alcançar resultados satisfatórios (MAURYA, SINGLA e NEGI, 2015).

### 3.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

O material lignocelulósico constitui o maior recurso renovável do mundo, além de ser matéria-prima de baixo custo e abundante (BALAT et al., 2008; LIMAYEM & RICKE, 2012; TAHA et al., 2016). Estima-se que a biomassa lignocelulósica compreenda cerca de 50% da biomassa disponível no mundo, o que ressalta seu potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008). Todos os materiais lignocelulósicos são, em princípio, adequados para a produção de etanol (CASTOLDI et al., 2014).

Existem vários grupos de matérias-primas que são diferenciadas por sua origem, composição e estrutura, podendo ser classificados de acordo com o tipo de recurso (KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004; BALAT et al., 2008; LIMAYEM & RICKE, 2012). Em geral, materiais lignocelulósicos podem ser divididos em vários grupos, que incluem: cultivos energéticos, plantas aquáticas, resíduos florestais, sólidos urbanos orgânicos e industriais e resíduos da agroindústria (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; TAHA et al., 2016). A triagem das matérias-primas promissoras entre uma grande variedade de lignocelulósicos é de suma importância (TAHA et al., 2016), visto que a indústria de etanol baseada em biomassa requer um fornecimento contínuo e confiável de matérias-primas para manter uma produção de baixo custo e manter um uso mínimo de água, fertilizantes e terra cultivável (LEWANDOWSKI et al., 2003).

A expansão da atividade agroindustrial, bem como o aumento da produtividade devido à aplicação de novas tecnologias, resultam em acumulação de uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos (SÁNCHEZ, 2009). A maioria dos resíduos agro-florestais mundiais é obtida a partir quatro culturas - milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar - sendo que o restante dos resíduos agro-florestais constituem apenas uma pequena parte da biomassa (TAHA et al., 2016). O interesse na utilização dessas matérias-primas proporcionou o desenvolvimento de bioprocessos baseados no emprego dessas fontes como substratos não só na área de biocombustíveis, mas também na produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (LAUFENBERG; KUNZ & NYSTROEM, 2003).

### 3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar no contexto do setor sucroenergético

O Brasil tem uma vantagem natural na produção cana-de-açúcar e conseqüentemente de etanol, devido à vasta área de terra não utilizada ou pouco utilizada que pode ser convertida em produção agrícola e ao clima tropical bem adequado para a produção de cana-de-açúcar (HOFSTRAND, 2015). É o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e segundo o levantamento realizado pela CONAB (2017), na safra de 2016/17 a área plantada foi de 1.021,3 mil hectares, apresentando uma produtividade de 72.623 kg/ha de cana de açúcar destinada à atividade sucroalcooleira.

O conteúdo energético da cana-de-açúcar é dividido em três partes iguais. Um terço da energia está na sacarose, um terço, na palha (folhas e topo da planta) deixada no campo durante a colheita e o terço restante é o bagaço, que é o material fibroso remanescente da extração do caldo da cana-de-açúcar (HOFSTRAND, 2015). Juntos, a palha e o bagaço, compreendem dois terços da massa seca total da planta e 56% do carboidrato total na cana-de-açúcar (DIAS et al., 2012).

O bagaço representa aproximadamente 0,3 tonelada por cada tonelada de cana cultivada (HOFSETZ e SILVA, 2012). É um material altamente heterogêneo, que apresenta em sua composição cerca de 20-30% de lignina e 40-45% de celulose e 30-35% hemiceluloses com quantidades limitadas de extrativos e cinzas (PANDEY et al., 2000; CARDONA, QUINTEIRO E PAZ, 2010). Sua composição o torna uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis de segunda geração (HOFSTRAND, 2015).

O bagaço de cana-de-açúcar é atualmente usado como a principal fonte de energia necessária nos moinhos de açúcar e destilarias de etanol e também para a geração de eletricidade a ser vendida. No entanto, uma parte importante do bagaço produzido está subutilizada (DE MORAES ROCHA et al., 2011) visto que uma parte dos resíduos gerados durante o cultivo e processamento de cana-de-açúcar são queimados ou deixados no campo (DIAS et al., 2011). A introdução da produção de etanol de segunda geração precisa levar em conta a demanda dos mercados doméstico e internacional e a concorrência do uso de biomassa lignocelulósica em plantas de cogeração de eletricidade (CARDONA, QUINTEIRO e PAZ, 2010). No momento em que a tecnologia de segunda geração estiver em escala comercial, as usinas seguirão a lógica do mercado, voltando sua produção para eletricidade ou etanol, de modo semelhante ao que ocorre com a destinação do caldo, que a depender das condições produz mais etanol ou mais açúcar (PACHECO, 2011).

Está bem documentado que, com as melhorias tecnológicas feitas nas caldeiras, é

possível para satisfazer as necessidades energéticas das plantas com apenas metade do bagaço produzido. O excedente de bagaço pode ser usado em mais de quarenta aplicações diferentes, como a produção de etanol, papel, placas, alimentos para animais e furfural. A utilização integral dos componentes do bagaço é desejável tanto por razões econômicas quanto ambientais (DE MORAES ROCHA et al., 2011).

A utilização deste subproduto como matéria-prima, além de agregar valor a este material, aumenta o rendimento econômico do processo. Conseqüentemente, é obtido um duplo efeito, econômico e ecológico (GÁMEZ et al., 2006).

### **3.2.2 Resíduos agroflorestais: etanol de serragens**

Os resíduos florestais representam uma fonte potencialmente grande de biomassa lignocelulósica e podem ser utilizados para produzir bioenergia sob a forma de eletricidade, calor e combustíveis líquidos de transporte. Embora a bioenergia florestal já seja uma opção viável para a produção de calor e energia em larga escala, a utilização de resíduos florestais para a produção de biocombustíveis líquidos, como o etanol, é dificultada por desafios econômicos e técnicos. As madeiras maciças são geralmente consideradas como a matéria-prima lignocelulósica mais recalcitrante para a conversão bioquímica em etanol, principalmente devido à sua estrutura e elevado teor de lignina. Os resíduos da silvicultura incluem os subprodutos das fábricas de celulose e serraria (serragens e cascas) e os resíduos da colheita da exploração madeireira (topos e galhos) (FRANKÓ, GALBE e WALLBERG, 2016).

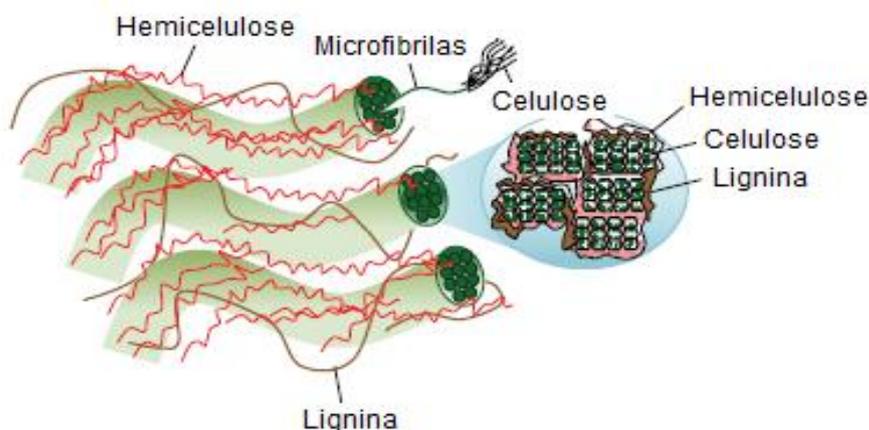
O eucalipto é uma das principais espécies cultivadas na América do Sul para celulose e madeira. Embora as plantações de eucalipto para celulose sejam colhidas em idades abaixo de 10 anos, as serrarias usam árvores mais velhas para obter madeira de alto volume e resistência. A atividade da indústria florestal gera grandes quantidades de resíduos, sendo que cerca de 50% da madeira processada industrialmente termina como resíduo, gerando 1,5 milhão de toneladas de resíduos de madeira seca por ano, que não são adequadamente explorados (RANGEL et al., 2016).

A serragem é um dos produtos mais importantes da transformação primária de eucalipto e madeira de *Pinus*, é um resíduo produzido em grande quantidade no Brasil e menos explorado que os resíduos agrícolas como substrato para a produção de açúcares fermentáveis. A aplicação de tratamentos de conversão química para o fracionamento de seus componentes principais poderia levar não apenas a uma melhor utilização destas matérias-primas, mas

também à oportunidade de manufaturar produtos de alto valor agregado para complementar processo produtivo. A aplicação de novas tecnologias faria melhor uso deste tipo de subproduto. Por conversão química, termoquímica e biológica, vários produtos químicos e combustíveis podem ser obtidos a partir deste tipo de biomassa (CASTOLDI et al., 2014; RANGEL et al., 2016).

### 3.3 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A estrutura base de toda biomassa lignocelulósica consiste em três componentes principais: celulose, hemiceluloses e lignina, além de pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (DEMIRBAŞ, 2005). Estes constituintes são unidos entre si, formando uma rede complexa resistente aos ataques microbianos (MOSIER et al., 2005). É importante entender a química primária da parede celular vegetal (FRANKOVÁ e FRY, 2013). A estrutura hierárquica complexa da biomassa lignocelulósica é o principal obstáculo para o fracionamento de componentes, visto que existe uma forte interação entre a celulose, hemicelulose e lignina devido a muitos fatores físico-químicos, estruturais e composicionais (LEE, HAMID e ZAIN, 2014). A Figura 2 mostra a estrutura da parede celular da planta e diferentes biocomposições.

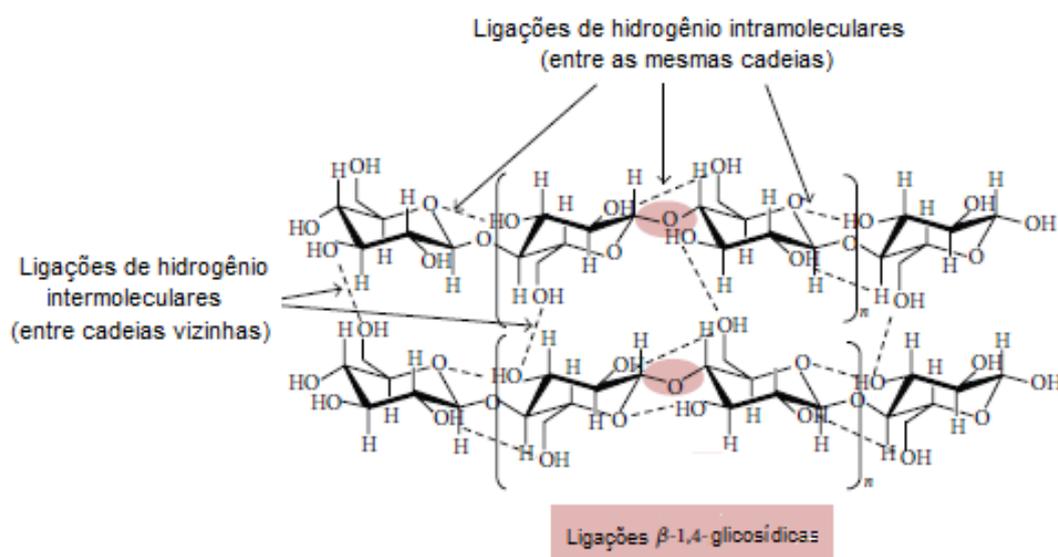


**Figura 2.** Estrutura da parede celular da planta e diferentes biocomposições (LEE, HAMID e ZAIN, 2014, com modificações).

As microfibrilas de celulose, parcialmente cristalinas, formam o esqueleto da parede celular desprovido de água interna; as moléculas de hemicelulose ligam-se fortemente à celulose, podendo também ficar localmente aprisionadas dentro das microfibrilas. As

hemiceluloses, juntamente com pectinas, constituem uma matriz hidratada ocupando o espaço na fibra (FRANKOVÁ e FRY, 2013). Geralmente, as fibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose, o que forma uma rede aberta, cujos espaços vazios são gradualmente preenchidos por lignina (RAMOS, 2003; CHUNDAWAT et al., 2011).

A celulose é o componente mais abundante na biomassa vegetal (entre 30-60% da composição) e consiste em um polímero linear de resíduos de glicose. A composição da celulose e a orientação das ligações de hidrogênio (Figura 3) fazem deste composto um polímero rígido, de estrutura altamente cristalina, insolúvel em água, resistente à despolimerização e difícil de hidrolisar, devido à ordenação e ao empacotamento das cadeias poliméricas (MOSIER et al., 2005; BALAT, 2011).

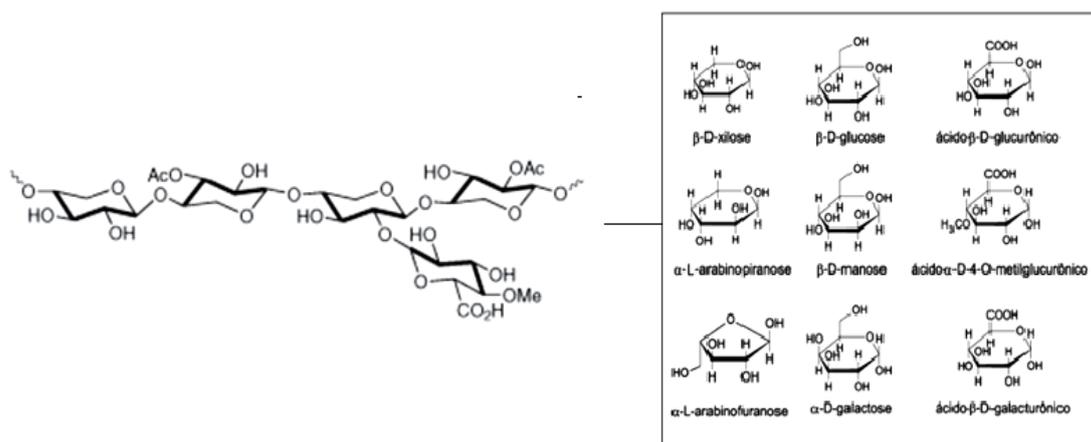


**Figura 3.** Estruturas químicas de cadeias de celulose (LEE, HAMID e ZAIN, 2014, com modificações).

As microfibrilas (uma unidade de celulose ou fibrila elementar) de celulose têm regiões cristalinas e amorfas, e a cristalinidade da celulose tem sido considerada um dos fatores importantes na determinação das taxas de hidrólise de substratos celulósicos. A maior parte da celulose (cerca de 2/3) está na forma cristalina (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000). Essas microfibrilas se auto-organizam formando microfibras, que podem então ser reticuladas por matrizes de hemicelulose para formar macrofibras, o que cria resistência à degradação química e enzimática (BEZERRA e RAGAUSKAS, 2016).

A hemicelulose é uma macromolécula formada por pentoses e hexoses (Figura 4), altamente ramificada, de menor massa molecular que a celulose, que corresponde a cerca de 20-40% da biomassa seca. Pode apresentar diferentes anidro-açúcares como glicose, xilose, arabinose, galactose, frutose, manose, dependendo da espécie vegetal (FERRAZ, 2004;

MOSIER et al., 2005). É mais facilmente hidrolisada em comparação com a celulose por causa da sua natureza amorfa ramificada (BALAT, 2011). Porém, devido à diversidade de seus açúcares, requer uma ampla gama de enzimas para ser completamente hidrolisada em monômeros livres (LIMAYEM & RICKE, 2012).



**Figura 4.** Estrutura parcial da hemicelulose e hexoses e pentoses que compõe a estrutura da hemicelulose (FERREIRA, ROCHA e SILVA, 2009, com modificações).

A hemicelulose é uma barreira física que envolve as fibras de celulose e protege-a da hidrólise enzimática (MAURYA, SINGLA e NEGI, 2015). Alguns estudos demonstraram que a remoção de hemicelulose aumenta a dimensão média dos poros do substrato e, conseqüentemente, aumenta a acessibilidade e a probabilidade de hidrólise da celulose (JEOH et al. 2005; CHANDRA et al. 2007; ISHIZAWA et al.2007)

A lignina é composta por três unidades principais de fenilpropano - álcoois coniferílicos, sinapílicos e p-cumarílicos (Figura 5) - além de vários compostos fenólicos menores, que formam uma matriz muito complexa e corresponde a cerca de 15 a 25% da composição da biomassa lignocelulósica (ACHYUTHAN et al., 2010; BALAT, 2011). É um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo; suas unidades de fenilpropano são unidas entre si por ligações não hidrolisáveis. A complexidade da lignina, grau de polimerização e diversidade são tão grandes que pode não haver duas macromoléculas de lignina idênticas com a mesma sequência primária de unidades fenilpropano (ACHYUTHAN et al., 2010).

A lignina é ligada também à hemicelulose e à celulose, formando uma barreira física impenetrável na parede celular vegetal, estando presente nesta região da célula para dar sustentação estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataque microbiano e estresse



hemicelulose, diminuição do teor de lignina e possíveis reduções na cristalinidade da celulose. Desde que não haja a formação de compostos inibidores das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, estes efeitos aumentam o rendimento de açúcares, consequentemente aumentando o rendimento global do processo, (BEZERRA e RAGAUSKAS, 2016).

Durante as últimas décadas, muitos processos de pré-tratamento vêm sendo desenvolvidos e estes apresentam vantagens e desvantagens. A eficácia do pré-tratamento depende da estrutura física e composição química da biomassa e das condições de tratamento. (SINDHU et al., 2015). Cada pré-tratamento tem um efeito específico sobre a fração de celulose, hemicelulose e lignina e sendo assim, o método deve ser cuidadosamente selecionado de acordo com as etapas posteriores do processo, com o tipo de biomassa e com a compatibilidade com a planta industrial. Estes pré-tratamentos podem ser de natureza física, química, físico-química ou biológica (ALVIRA et al., 2010). Um pré-tratamento ideal deve ser aplicável em diversas matérias-primas, deve requerer mínimas quantidades de energia e químicos e gerar sólidos altamente reativos, com macro e micro-acessibilidade aumentadas para que a conversão seja de alto rendimento, com baixa concentração de enzima (KUMAR et al., 2016). Vários métodos de pré-tratamento são estudados para fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar celulose, hemicelulose e componentes de lignina (MAURYA, SINGLA e NEGI, 2015). Algumas das tecnologias de pré-tratamento previamente desenvolvidas e que satisfazem alguns destes critérios podem ser observadas na Figura 6.

O pré-tratamento mecânico visa aumentar a área de superfície reduzindo o tamanho da biomassa. Já os métodos físico-químicos exigem controle das condições operacionais, visto que as reações ocorrem a altas temperaturas e pressão (TAHERZSADEH e KARIMI, 2007). Os métodos químicos removem e/ou deslocam hemiceluloses e lignina, assim afrouxando a estrutura da rede de lignina e holocelulose. São utilizados também métodos de pré-tratamento biológico para a deslignificação da biomassa lignocelulósica (CHANDEL et al., 2007).

A explosão a vapor é o método mais utilizado para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica atualmente (CHANDRA et al., 2007; SINGH et al., 2015). Neste método, a biomassa é tratada com vapor saturado de alta pressão por alguns segundos (30s) a vários minutos (20 min) e então a pressão é reduzida repentinamente. A explosão de vapor é tipicamente uma combinação de forças mecânicas e efeitos químicos devido à hidrólise (auto-hidrólise) de grupos acetil de hemicelulose. Este processo causa degradação da hemicelulose e transformação da lignina devido à alta temperatura, aumentando assim o potencial da hidrólise de celulose (PAN et al., 2005).

Este método é reconhecido com um dos pré-tratamentos mais eficientes, porém

apresenta diversas desvantagens, como a degradação parcial das hemiceluloses, a formação de componentes tóxicos que podem afetar o processo de hidrólise enzimática e fermentação e o alto gasto energético (OLIVA et al., 2003; HAMELINCK et al., 2005). A explosão a vapor, bem como pré-tratamentos por hidrólise ácida, podem produzir furfural e hidroximetilfurfural como subprodutos, que têm efeito inibitório nos processos de hidrólise enzimática e fermentação, fazendo com que haja a necessidade de um processo de desintoxicação subsequente ao pré-tratamento, aumentando assim o custo global do processo (SCHMIDT e THOMSEN, 1998; MAURYA, SINGLA e NEGI, 2015).

Uma vez que os métodos físicos, químicos e físico-químicos requerem maior demanda energética, altos custos de reagentes e tratamento dos resíduos do processo - que muitas vezes são altamente poluentes, além de formarem compostos inibidores das posteriores - o pré-tratamento biológico surge como uma tecnologia alternativa (GUPTA & VERMA, 2015). No cenário atual existem algumas limitações no uso dessa estratégia para o processo de escala piloto. Há uma necessidade de atividades de pesquisa, desenvolvimento e aperfeiçoamento do processo para o desenvolvimento de um processo economicamente viável (ALVIRA *et al.*, 2010; SINDHU, BINOD e PANDEY, 2015).

CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO	PRÉ-TRATAMENTO																								
	Ácido concentrado	Ácido diluído	Ácido hidrófluorídrico	Ácido peracético	Explosão a vapor (ácida)	Água quente líquida (LHW)	Percolação e reciclagem de amônia	Amônia diluída	Oxidação limitada e alcalina	Peróxido alcalino	Explosão a vapor de amônia	Hidróxido de cálcio	Alcalino concentrado (AFEX)	Líquidos iônicos	Metais/alcalinos queriantes	Fluido supercrítico	Orgânico	Biológico	Moagem/Redução de partícula	Radiação gama					Microondas
Rendimento em açúcares	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	>90%	80-90%	70-80%	Rendimento total (glucana+xilana)
Concentração de açúcares	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	>20%	10-20%	<10%	Concentração de hidrólise (m/v)
Tempo de pré-tratamento	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Minutos	Horas	Dias	Tempo de pré-tratamento
Necessidade de hemicelulases	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Não	Talvez	Sim	São necessárias hemicelulases?
Processamento distribuído	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Alto	Médio	Baixo	Potencial para distribuição de processos
Potencial para coprodutos	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Alto	Médio	Baixo	Potencial para coprodutos
Compatível com fermentação?	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Sim	Talvez	Não	Compatibilidade com a fermentação
Escalabilidade esperada	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Alto	Médio	Baixo	Facilidade de escalonamento
Energia	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	<5%	5-10%	>10%	Energia (PCI da biomassa em %)
Custos com pré-tratamento	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Baixo	Médio	Alto	Custos de reator / equipamentos
Uso de água	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	<1	1-5	>5	Litro de água por litro de etanol
Custos químicos	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Alto	Médio	Baixo	Custos químicos do pré-tratamento
Controle do processo	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Simples	Moderado	Difícil	Facilidade de controle esperada
Lignina é preservada?	Yellow	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Sim	Em parte	Não	Lignina é preservada em quantidade e qualidade?
Temperatura e pressão	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	1 atm ou T ambiente	<20 atm ou <200°C	>20 atm ou >200°C	Temperatura e pressão durante o processo
Tóxico / perigoso	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Não	Talvez	Sim	Uso de química tóxicos ou perigosos?
Geração de resíduos	Red	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Não	Alguns	Sim	Pré-tratamento gera resíduos
Flexibilidade de matéria-prima	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Ampla	Moderado	Limitado	Alcance / eficiência em diferentes matérias-primas

Figura 6. Comparação de critérios importantes para 20 diferentes tecnologias de pré-tratamento (DALE e ONG, 2012; com modificações).

### 3.4.1 Pré-tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico consiste na despolimerização da biomassa lignocelulósica por enzimas produzidas por microrganismos, especialmente fungos, tornando os açúcares acessíveis para as etapas de hidrólise e fermentação etanólica. Ao contrário dos métodos de pré-tratamento químico e físico-químico, no pré-tratamento biológico, não há a necessidade do uso de químicos ou altos gastos energéticos (SINGH *et al.*, 2008).

Várias estratégias de pré-tratamento biológico de biomassas lignocelulósicas têm sido investigadas tanto em laboratório, como em escala piloto. No Quadro 1 estão elencados alguns estudos realizados na última década, com as principais vantagens observadas após o pré-tratamento biológico.

**Quadro 1.** Diferentes estratégias de pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica e suas vantagens (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2015; SHIRKAVAND *et al.*, 2016, com modificações).

Agente biológico	Biomassa	Efeitos mais relevantes	Referência
<i>Punctularia</i> sp. TUFC20056	Colmos de bambu	50% de remoção de lignina	Suhara <i>et al.</i> (2012)
<i>Irpex lacteus</i>	Talos de milho	Rendimento de hidrólise de 82%	Du <i>et al.</i> (2011)
Consórcio fúngico	Palha	Aumento de sete vezes na hidrólise	Taha <i>et al.</i> (2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i>	Serragem de <i>Eucalyptus grandis</i>	Aumento de vinte vezes na hidrólise	Castoldi <i>et al.</i> (2014)
Consórcio fúngico	Palha de milho	43,8% remoção de lignina / aumento de sete vezes na hidrólise	Song <i>et al.</i> (2013)
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Palha de trigo	Perda mínima de celulose	Cianchetta <i>et al.</i> (2014)
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Palha de milho	Aumento de 2-3 vezes no rendimento de açúcares redutores	Wan and Li (2011)
Consórcio fúngico	Biomassa vegetal	Eliminação completa do uso de substâncias químicas perigosas	Dhiman <i>et al.</i> (2015)
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Palha de milho	Rendimento de 58% em bioetanol e rendimento em açúcares de 57 a 67%	Wan e Lee (2010)

Continua

**Quadro 1.** Diferentes estratégias de pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica e suas vantagens (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2015; SHIRKAVAND et al., 2016, com modificações).

Continuação

<b>Agente biológico</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Efeitos mais relevantes</b>	<b>Referência</b>
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Cedro japonês	Rendimento em bioetanol (em relação ao rendimento máximo teórico baseado na holocelulose) superior a 35%	Amirta et al. (2006)
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Seringueira	Rendimento em açúcares 28% superior ao obtido em hidrólise de biomassa sem pré-tratamento	Nazarpour et al. (2013)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Madeira de faia	Rendimento em açúcares de 9,5%	Sawada et al. (1995)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Palha de trigo	Rendimento em açúcares de 55%	Hatakka (1983)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palha de arroz	Rendimento em açúcares de 33% (baseado no teor de holocelulose – açúcares totais).	Taniguchi et al. (2005)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Casca de arroz	Rendimento em açúcares de 39%	Yu et al. (2009)
<i>Trametes versicolor</i>	Seringueira	Rendimento em açúcares 16% superior ao obtido em hidrólise de biomassa sem pré-tratamento	Nazarpour et al. (2013)
<i>Coriolus versicolor</i>	Resíduos de bambu	Rendimento em açúcares de 37%	Zhang, Xu e Wang (2007)
<i>Stereum hirsutum</i>	Pinho vermelho japonês	Rendimento em açúcares 21%	Lee et al. (2007)

Apesar da necessidade de monitoramento contínuo dos parâmetros a fim de atender às necessidades do agente biológico empregado no processo, este tipo de tratamento apresenta

como principais vantagens a baixa demanda de energia, a desnecessidade do uso de químicos e as condições brandas de temperatura, pH e pressão ao longo do processo (SUN & CHENG, 2002).

O pré-tratamento biológico tem várias vantagens em relação às estratégias convencionais de pré-tratamento, porém vários desafios no processo precisam ser abordados antes de serem implementados na escala comercial. Para resolver estes inconvenientes, são necessárias atividades de investigação e desenvolvimento a fim de reduzir o custo dos sistemas de pré-tratamento e de sacarificação enzimática, configuração de reatores para minimizar a geração de calor durante o pré-tratamento biológico e identificação de agentes biológicos eficientes utilizando técnicas moleculares avançadas (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2015).

### **3.4.2 Combinação de pré-tratamento biológico com outros métodos**

A baixa demanda energética dos pré-tratamentos biológicos tem despertado interesse no estudo da aplicabilidade deste método na produção de biocombustíveis a partir de lignocelulósicos. Porém, a principal desvantagem deste método é em relação ao longo tempo de processo. A combinação com outros métodos poderia reduzir o tempo requerido e ainda, gerar eficiência de custos. Assim, o pré-tratamento biológico combinado com outros métodos físicos e químicos já tem sido contemplado (SHIRKAVAND et al., 2016).

Na literatura são encontrados diversos estudos de combinação de pré-tratamentos biológicos com pré-tratamentos:

- ácido (KUHAR, NAIR e KWHAD, 2008; MA et al., 2010; GUI et al., 2013; SUHARDI et al., 2013; ISHOLA, ISROI e TAHERZADEH, 2014);
- alcalino (HATAKK, 1983; KADIMALIEV et al., 2003; FISSORE et al., 2010; YU et al., 2010a; YU et al., 2010b; SALVACHÚA et al., 2011; ZHONG et al., 2011; YANG et al., 2013), por explosão a vapor (SAWADA et al., 1995; ZHANG et al., 2008; TANIGUCHI et al., 2010; ASADA et al., 2011; LI e CHEN, 2014);
- explosão a vapor de amônia – AFEX (BALAN et al., 2008);
- com solventes orgânicos (ITOH et al., 2003; FISSORE et al., 2010; MONRROY et al., 2010; BABA et al., 2011);
- água quente líquida – LHW (WAN e LI, 2011).

De um modo geral, a combinação de pré-tratamento biológico com pré-tratamentos físicos e/ou químicos tem se mostrado uma alternativa eficiente, levando a aumento nos

rendimentos em açúcares e em produtos, a diminuição na carga de químicos e é ainda uma forma de contornar os longos períodos de pré-tratamento biológico, diminuindo o tempo de processo. Devido à baixa demanda de energia requerida em pré-tratamentos biológicos, a combinação com outros métodos pode proporcionar condições de operações mais brandas quando comparado com as condições necessárias em pré-tratamento unicamente químicos. Além disso, a formação de subprodutos tóxicos às etapas subsequentes do processo pode ser diminuída ou inexistente, devido às condições mais brandas de trabalho (SHIRKAVAND et al., 2016).

### 3.6 MACROFUNGOS E ARSENAL LIGNOLÍTICO

Os fungos degradadores de materiais lignocelulósicos são responsáveis por um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza. Graças à ação desses organismos, todo o complexo polimérico existente nos lignocelulósicos pode ser despolimerizado, pois permitem que outros microrganismos possam atacar as estruturas dos vegetais que não estavam previamente acessíveis (FERRAZ, 2004).

Os organismos predominantemente responsáveis pela degradação de complexos lignocelulósicos são fungos, classificados pelo tipo de degradação, nomeadamente fungos de podridão branca, parda e macia. Os fungos de podridão branca degradam a lignina presente na madeira, deixando a celulose mais clara. Os fungos de podridão-castanha degradam os polissacarídeos de madeira (celulose e hemicelulose), modificando parcialmente a lignina. Alguns destes fungos quebram a lignina e a celulose produzindo poderosas enzimas oxidativas e hidrolíticas extracelulares. Os fungos de podridão macia secretam celulases, atacando somente a celulose, as vezes levando a um padrão de descoloração e fissuração semelhante ao dos fungos de podridão parda (MANAVALAN, MANAVALAN e HEESE, 2015).

A degradação fúngica ocorre de forma intracelular ou de forma extracelular, quando as moléculas a serem degradadas são insolúveis ou muito grandes, como no caso da lignina, da celulose e da hemicelulose. Os fungos têm dois tipos de sistemas enzimáticos extracelular: o sistema hidrolítico, que produz hidrolases responsáveis pela degradação dos polissacarídeos, e o oxidativo, sistema que degrada lignina e abre anéis fenila (SÁNCHEZ, 2009).

Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos são capazes de decompor uma série de compostos orgânicos persistentes, tais como a lignina e diversas classes de poluentes com pouca ou nenhuma homologia estrutural com a lignina. A degradação da lignina e de outros

compostos recalcitrantes por basidiomicetos é um processo de cometabolismo, mediado pela ação coordenada de um sistema enzimático e de vários metabólitos de baixa massa molecular (TUOMELA et al., 2000).

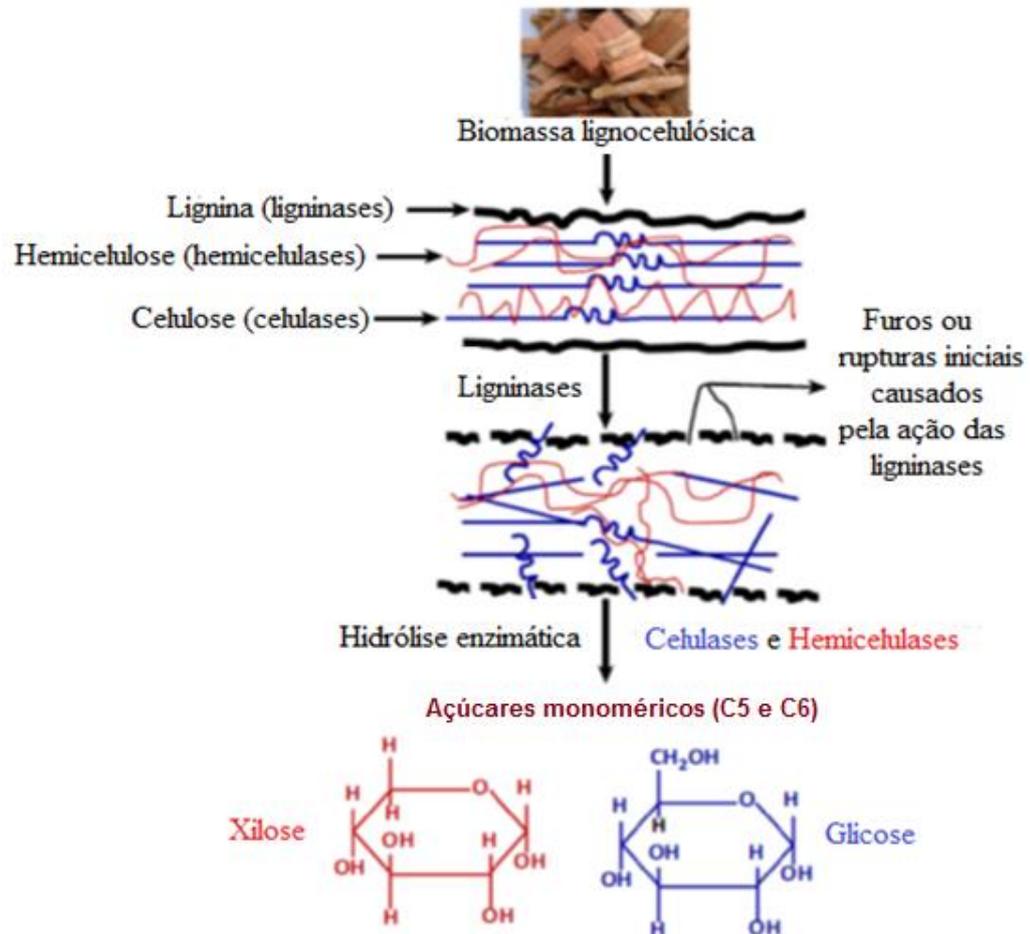
Um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação de lignocelulósicos. O sistema lignolítico é composto, principalmente, pelas enzimas fenol-oxidases manganês-peroxidases (MnP), as lignina-peroxidases (LiP) e as lacases (Lac). Todas são comumente produzidas por fungos de decomposição branca, mas existem espécies de fungos que são eficientes degradadores de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas (GILL & ARORA, 2003; FERRAZ, 2004). Além disso, além de celulases e hemicelulases, algumas enzimas acessórias, tais como glioxal oxidase (GLO), aril-álcool oxidase (AAO), oxalato decarboxilase (ODC), NAD-dependente formiato desidrogenase (FDH), monoxigenase, glutatona redutase, oxidase de álcool isoamílico, peroxirredoxinas, benzoquinona redutase, piranose oxidase, glutatona S-transferase, glucose oxidase e manganês superóxido dismutase, foram isolados de fungos de podridão-branca (MANAVALAN, MANAVALAN e HEESE, 2015).

Na Figura 7, são mostradas as enzimas extracelulares modificadoras da biomassa lignocelulósica. As ligninases rompem a estrutura de lignina, iniciando o processo de degradação. Após, a celulases e as hemicelulases atuam, respectivamente sobre a celulose e hemicelulose, levando à liberação de açúcares monoméricos e oligômeros.

As Lac e MnP catalisam a formação de radicais intermediários da lignina de alto peso molecular, sendo capazes, porém, de oxidar apenas componentes fenólicos de lignina. Já as LiP são muito eficazes na oxidação tanto de compostos fenólicos quanto de compostos não-fenólicos (KIRK & FARRELL, 1987; MIN *et al.*, 2001). De um modo geral, as enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas, em ordem crescente, segundo seus potenciais de oxidação: LiP, MnP e Lac (KIRK & CULLEN, 1998). As LiP apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para extrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas. Já as MnP apresentam potencial de oxidação suficiente somente para capturar elétrons de estruturas fenólicas. As Lac atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron (FERRAZ, 2004).

Estas enzimas podem ser utilizadas em diversos processos biotecnológicos e aplicações ambientais, devido à capacidade de romper anéis aromáticos e, assim, transformar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em compostos acessíveis, suscetíveis à posterior degradação e mineralização. Podem servir não apenas para pré-tratamentos de biomassa lignocelulósicos, mas também como uma alternativa eficiente para a biorremediação de poluentes resistentes, tais como a atrazina, organofosforados e águas residuais (POINTING,

2001; COHEN; PERSKY & HADAR, 2002).



**Figura 7.** Desconstrução da biomassa lignocelulósica por enzimas fúngicas (GUPTA, et al., 2016, com modificações).

As enzimas de vários fungos de podridão-branca que atuam sobre a celulose são divididas em três grupos principais, endo-glucanases (EGs), celobiohidrolases (CBH) e betaglicosidases (BGLs). As EGs catalisam a clivagem aleatória de ligações internas na cadeia de celulose. As CBHs são proteínas monoméricas com pouca ou nenhuma glicosilação e estas enzimas clivam cadeias de celulose nas suas extremidades terminais para liberar celobiose ou celulo-oligossacáridos. As BGLs são proteínas monoméricas, diméricas ou mesmo triméricas que atuam sobre a celobiose ou gluco-oligossacáridos, liberando moléculas de glicose. Ainda, as celobiose desidrogenase (CDH) é uma enzima extracelular que oxida eficientemente celobiose, bem como celodextrinas solúveis, mannodextrinas e lactose. Várias enzimas são responsáveis pela degradação das hemiceluloses, como endoxilanas (EC 3.2.1.8), beta-xilosidase (EC 3.2.1.37), alfa-glicuronidase (EC 3.2.1.131), alfa-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72) e esterase de ácido

ferúlico (EC 3.1.1.73) atuam em diferentes heteropolímeros disponíveis na natureza (MANAVALAN, MANAVALAN e HEESE, 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS

Foram utilizadas no presente trabalho diferentes espécies de *Pleurotus*, *Pycnoporus* e *Trametes*, visto que em diversos estudos encontrados na literatura estas espécies são empregadas em pré-tratamentos biológicos. Já as linhagens *Schizophyllum commune* VE07 e *Marasmiellus palmivorus* VE111 foram utilizadas devido à produção de enzimas que atuam sobre a biomassa, observada em trabalhos prévios realizados pelo grupo de pesquisa. As linhagens empregadas como agentes biológicos na etapa de pré-tratamento das biomassas - pertencentes à coleção do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul - estão elencadas no Quadro 2, onde são apresentados os códigos de coleta e de acesso da micoteca da Universidade de Caxias do Sul. Coleta e isolamento foram realizados por Mezzomo (2013) e Rosa, Wasum & Dillon, (2016).

**Quadro 2.** Linhagens empregadas em pré-tratamentos biológicos e respectivos códigos de coleta e de acesso da micoteca da UCS.

Espécie	Código de Coleta	Código de acesso da Micoteca
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	PS-2001	HUCS/MIUCS 1215
<i>Pleurotus albidus</i>	88F.13	HUCS/MIUCS 1586
<i>Trametes villosa</i>	82I.6	HUCS/MIUCS 2081
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	PR_32	HUCS/MIUCS 1829
<i>Schizophyllum commune</i>	VE_07	HUCS/MIUCS 1922
<i>Marasmiellus palmivorus</i>	VE_111	HUCS/MIUCS 2025
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	OU_04	HUCS/MIUCS 2055

Para os experimentos de fermentação foi utilizada a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, gentilmente cedida pelo professor Dr. Humberto Gomes. Esta é uma linhagem que predomina durante fermentações em usinas de produção de etanol no estado de São Paulo.

### 4.2 BIOMASSAS

O bagaço de cana-de-açúcar, seco e previamente moído, foi gentilmente cedido pelo professor George Jackson de Moraes Rocha, do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas, SP. A composição química do bagaço de cana era de

1,7±0,6% de extraíveis, 33,9±1,2% de celulose, 15,2±1,4% de hemicelulose, 7,9±0,6% de lignina solúvel, 21,1±0,5% de lignina insolúvel e 5,9±1,8% de cinzas.

A serragem de eucalipto foi cedida pela Flosul Indústria e Comércio de Madeiras, localizada no município de Capivari do Sul, no Rio Grande do Sul, sendo esta biomassa subproduto das atividades da referida indústria. A composição química da serragem de eucalipto era de 3,1±0,06% de extraíveis, 43,2±1,4% de celulose, 6,8±1,1% de hemicelulose, 3,6±0,1% de lignina solúvel, 22,1±0,7% de lignina insolúvel e 0,9±0,09% de cinzas.

### 4.3 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi mantida em meio YEPD contendo, em g/L, os componentes: extrato de levedura (5), peptona (10), glicose (10) e ágar (20). Os basidiomicetos foram mantidos em meio constituído, em m/v, de 2% de serragem moída (*Pinus sp.*), 2% de farelo de trigo moído, 2% de ágar-ágar e 0,2% de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), completando-se o volume com água destilada (ROSA, 2013). Estes foram autoclavados por 10 e 30 minutos, respectivamente, a 1 atm. Após o crescimento, os microrganismos foram armazenados a 4°C.

### 4.4 PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA BIOMASSA

O cultivo dos basidiomicetos em estado sólido, aqui denominado de pré-tratamento biológico (PTB), foi realizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar moído ou serragem de eucalipto, previamente secos, como composto majoritário do meio de cultivo. À biomassa foram acrescidos farelo de trigo 2,5% (m/m) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$  1% m/v) e a umidade foi ajustada em torno de 66% com água. O meio de cultivo utilizado no presente trabalho foi baseado em meio descrito por Tan & Wahab (1997), modificando-se o teor de farelo de trigo de 5% para 2,5% e as biomassas utilizadas.

A biomassa vegetal (meio de cultivo) foi acondicionada em embalagens de polietileno com dimensões de 13×18 cm com um cilindro (1,5 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento) vedado com gaze e algodão acoplado na parte superior, a fim de garantir a aeração. Cada embalagem de polietileno continha 20 g do meio de cultivo, que foram esterilizados em autoclave por uma hora, em 1 atm. O sistema é mostrado na Figura 8.

Como inóculo, foram utilizados discos de massa micelial com 1,5 cm de diâmetro. Para a obtenção destes discos, cada linhagem de basidiomiceto foi propagada em placas de Petri,

contendo meio serragem (descrito no item 4.2), por 15 dias, a 28°C, até a colonização total da superfície do meio. Após, de forma estéril, realizou-se o corte dos discos, utilizando um tubo de vidro. Cada embalagem - contendo meio esterilizado - recebeu um disco de massa micelial como inóculo. Cada basidiomiceto foi considerado como um pré-tratamento, realizado em triplicata para cada tempo de amostragem, que foram de 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias. Estas amostras periódicas foram coletadas para medidas de crescimento celular, caracterização do meio, pH e a produção de enzimas.



**Figura 8.** Sistema de cultivo sólido em embalagens de polietileno.

#### 4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA

A hidrólise enzimática foi realizada por meio da utilização do complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* - composto majoritariamente por endoglicanasas, celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidasases - produzido no Laboratório de Enzimas e Biomassa (IB-UCS). O processo foi conduzido em frascos Duran® de 50 mL, contendo 5% (m/v) de biomassa pré-tratada biologicamente pelos basidiomicetos. Foi utilizado este percentual de biomassa a fim de avaliar a reatividade das fibras, antes e após o pré-tratamento. A carga enzimática foi de 20 FPU/g de biomassa seca, suspensos em tampão citrato 50 mmol/L com pH ajustado em 4,8, que foi adicionado até atingir o volume final de 50 mL.

Os frascos foram mantidos a 50°C, sob agitação recíproca de 150 rpm, por 24 horas. A hidrólise enzimática ocorreu de acordo o tempo de amostragem do cultivo dos basidiomicetos. Como controles, foi realizada a hidrólise enzimática dos meios compostos majoritariamente por bagaço de cana-de-açúcar ou por serragem de eucalipto sem pré-tratamentos, sob as mesmas condições. As amostras do hidrolisado para determinação dos açúcares redutores e da

glicose foram coletadas nos intervalos de tempo: 0, 6, 12 e 24 horas. O volume de 1 mL foi retirado em cada tempo de amostragem, centrifugado e congelado para posteriores análises. As hidrólises enzimáticas das biomassas foram realizadas em triplicata.

#### 4.6 FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação alcoólica dos açúcares provenientes das amostras hidrolisadas foram realizados em tubos de reação de 2 mL. Utilizou-se apenas a fase líquida proveniente da hidrólise e à esse xarope foram adicionados 50 µL de solução de extrato bruto de levedura (Prodex<sup>®</sup>) e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para obtenção de concentração final de 4 e 1 g/L, respectivamente. A inoculação foi realizada com 1×10<sup>8</sup> células viáveis por mL, empregando-se a linhagem CAT-1 de *S. cerevisiae*. As amostras foram mantidas em banho a 28°C. Foram realizadas coletas periódicas para a determinação da cinética de consumo de substrato e de produção de etanol. Em cada coleta, as amostras, em triplicata, foram congeladas (-80°C) para interromper o metabolismo microbiano.

#### 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.7.1 Determinação indireta do crescimento celular dos basidiomicetos

O crescimento celular dos basidiomicetos (massa micelial) foi determinado indiretamente, através do teor de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise enzimática da quitina presente na parede celular (NOVELLO *et al.*, 2014). O procedimento foi realizado em 0,5g de amostra, isenta de umidade, da biomassa triturada. A esta foram adicionados 3 mL de tampão citrato (pH 4,8; 0,05 mol/L) e estas suspensões foram tratadas em ultrassom por 60 minutos. A cada amostra, foram adicionados 2 mL de enzima 30% (Viscozyme L<sup>®</sup>), acondicionada por 24 horas a 45°C. Após este período, as amostras foram aquecidas a 96°C por 10 minutos para desativação da enzima. As amostras foram resfriadas e centrifugadas (2862×g).

Para a determinação do teor de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia descrita por Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada, foi adicionado 1 mL da solução de acetilacetona (0,75 mL de acetilacetona e em 24,25 mL de solução de carbonato de sódio 1,25 mol/L). As amostras foram fervidas por 20 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e 1 mL 4-dimetilaminobenzaldeído (3,2 g em 20 mL de etanol e 20 mL de HCl). Os tubos foram

incubados a 65°C por 10 minutos e a absorvância determinada a 530 nm. A conversão de absorvância para g de biomassa foi obtida a partir de curvas padrão, construídas a partir de massas de micélio liofilizado dos diferentes basidiomicetos utilizados (cultivados em meio líquido, isento de sólidos em suspensão), entre de 10 a 250 mg.

#### 4.7.2 Determinação das atividades enzimáticas

##### 4.7.2.1 Extração das enzimas provenientes do pré-tratamento

O conteúdo das embalagens de polietileno foi homogeneizado manualmente. As amostras foram suspensas em água destilada a 4°C em uma razão de 1:2, cujas suspensões foram mantidas sob agitação manual durante 30 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas (30 minutos, 2862×g, 4°C) e o sobrenadante armazenado sob refrigeração (4°C) para posteriores análises.

##### 4.7.2.2 Lacases

A atividade de lacases foi determinada de acordo com Wolfenden & Wilson (1982), através da quantificação do produto da oxidação do 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) utilizado como substrato. A análise foi realizada em placa de 96 poços, contendo 0,4 mL de mistura reacional que composta por 0,180 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 5,0; 0,180 mL de amostra adequadamente diluída e 0,04 mL de ABTS 0,005 mol/L. A oxidação do ABTS foi monitorada em espectrofotômetro ( $\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durante 90 segundos, a 25°C.

##### 4.7.2.3 Peroxidases totais

A atividade das peroxidases totais foi determinada conforme metodologia de Heinzkill *et al.* (1998), utilizando ABTS como substrato. A mistura era composta por 0,180 mL de amostra, 0,140 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mol/L pH 5,0, 0,040 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002 mol/L, 0,040 mL de ABTS 0,005 mol/L totalizando 0,4 mL de mistura reacional. A oxidação do ABTS foi monitorada em espectrofotômetro ( $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durante 90 segundos a 25°C em uma placa de 96 poços.

#### 4.7.2.4 Manganês peroxidases

Para a determinação da atividade de manganês peroxidases foi utilizado como substrato vermelho de fenol conforme o método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional era composta por 1 mL de tampão succinato de sódio 0,02 mol/L pH 4,5, 0,5 mL de amostra, 0,5 mL de reagente (0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 mol/L, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO<sub>4</sub> 0,002 mol/L, 0,05 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002 mol/L). Após acondicionamento por 5 minutos a 30°C em banho-maria, as reações foram interrompidas pela adição de 0,04 mL de NaOH (2 mol/L). A formação do produto de oxidação foi quantificada em espectrofotômetro ( $\epsilon_{610\text{nm}} = 4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) através de 0,3 mL colocados em uma placa de 96 poços. Sendo considerado um branco para cada amostra com tempo zero da reação. Para o preparo do branco, foi acrescentado 0,04 mL de NaOH (2 mol/L) na mistura reacional antes de expor a mistura ao banho-maria a 30°C.

#### 4.7.2.5 Atividade de xilanases

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10µL de amostra, 50µL de uma solução de xilana 1% previamente aquecida a 50°C. A placa foi mantida em banho a 50°C por 5 min. A reação foi interrompida ao adicionar 300µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e, logo após, a placa foi colocada em banho a 100°C por 5 minutos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 545 nm. A concentração de xilanases presentes nas amostras foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01 mol/L com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 µL/mL, por meio de regressão linear. Uma unidade de amostra foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 µmol/L de xilose por minuto.

#### 4.7.2.6 Atividade sobre papel filtro (FPA)

A análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA) foi determinada conforme Ghose (1987), com modificações propostas por Camassola & Dillon (2012). Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL de uma solução do reagente DNS (Miller, 1959). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de FPA presentes nas amostras foram determinadas através de curva padrão construída com soluções de glicose em concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL, por meio de regressão linear.

Uma unidade de FPA foi definida como a quantidade capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

#### 4.7.2.7 Atividade de endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases foi realizada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987), com modificações. Para a análise, 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 40  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 foram adicionados em uma placa de 96 poços, com volume total de 2 mL. A placa foi mantida em banho a 50°C, por 10 min. A seguir, adicionou-se a cada poço 50  $\mu\text{L}$  de solução de carboximetilcelulose 2%, previamente aquecida a 50°C. As placas foram mantidas em banho a 50°C por 30 minutos. A leitura em espectrofotômetro e a determinação da atividade de endoglicanases procederam tal como para FPA. Uma unidade de atividade de endoglicanases foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol/L}$  de açúcar redutor por minuto.

#### 4.7.2.8 Atividade de $\beta$ -glicosidases

A determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidases foi realizada utilizando a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Utilizou-se o substrato  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p\text{NPG}$ ). A mistura reacional foi composta por 5  $\mu\text{L}$  de água destilada, 5  $\mu\text{L}$  de amostra e 90  $\mu\text{L}$  de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p\text{NPG}$  0,00 mol/L) e incubada a 50°C por 30 min; a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em concentração de 10%. A absorvância foi medida em espectrofotômetro, a 405 nm e a atividade foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de  $p$ -nitrofenol ( $p\text{NP}$ ) com concentrações de 0,04 a 2 mmol/L, por meio de regressão linear. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1  $\mu\text{mol/L}$  de  $p\text{NPG}$  por minuto.

### 4.7.3 Caracterização das biomassas

A caracterização das biomassas foi realizada de acordo com as metodologias descritas pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), conforme mostrado no Quadro 3.

A determinação dos açúcares foi realizada em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em

coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min.

**Quadro 3.** Metodologias utilizadas para a caracterização das biomassas.

Análise	Norma	Referência
Preparação das amostras	NREL/TP-510-42620	Sluiter et al. (2008)
Teor de umidade e cinzas	NREL/TP-510-42622	Sluiter et al. (2005a)
Extrativos	NREL/TP-510-42619	Sluiter et al. (2005b)
Teor de lignina e carboidratos	NREL/TP-510-42618	Sluiter et al. (2011)

#### 4.7.4 Análise dos açúcares redutores e glicose

Os açúcares redutores presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática foram dosados pelo método de Miller (1959). A glicose foi determinada por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup>, utilizando 2 µL de amostra e 200 µL de reagente. Foi construída uma curva padrão com soluções de 0 a 4 mg/mL de glicose para a quantificação dos açúcares liberados.

#### 4.7.5 Análise dos produtos da fermentação

As amostras coletadas durante o processo de fermentação foram descongeladas e centrifugadas. O sobrenadante foi filtrado em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) com poros de 0,2 µm e as concentrações de açúcares e etanol foram quantificadas por HPLC, empregando coluna de Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 60°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L (fase móvel), fluxo de 0,6 mL/min. As análises em HPLC foram realizadas com a injeção de 10 µL de amostra.

### 4.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) foi realizada de acordo com as normas ASTM E1252-98 (Reapproved 2013) ou ASTM E573-01 (Reapproved 2013). Os espectros de amostra foram obtidos em duplicados utilizando uma média de 128 varreduras na gama entre 850 cm<sup>-1</sup> e 2000 cm<sup>-1</sup> com uma resolução espectral de 2 cm<sup>-1</sup>. As alturas de pico e as áreas dos espectros de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) foram determinadas pelo software de Origem versão 6.0. A influência do pré-tratamento

biológico foi analisada em função da diminuição percentual da intensidade dos picos de lignina (1427 e 1515  $\text{cm}^{-1}$ ) e carboidratos (1395, 1098 e 898  $\text{cm}^{-1}$ ) (PÉREZ, 1993; GONÇALVES, ESPOSITO e BENAR; 1998, CASTOLDI et al., 2014).

#### 4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar e de serragem de eucalipto, não-tratadas e pré-tratadas, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCMAT) da Universidade de Caxias do Sul. Utilizou-se metodologia baseada no processo chamado *magnetron-sputtering* a plasma, mais conhecido como deposição física a vapor de ouro (PVD – *Physical Vapour Deposition*), utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo Shimadzu Supercan SSX-550.

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e comparados pelo pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança  $p \leq 0,05$ , usando o programa GraphPadPrism® (GraphPad Software, San Diego, USA).

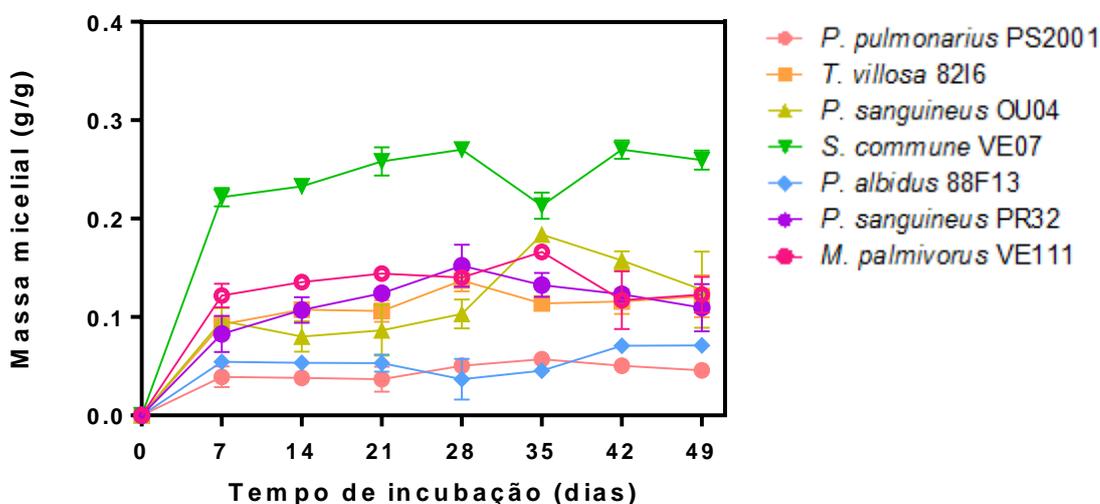
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados pré-tratamentos biológicos por diferentes espécies de basidiomicetos e, posteriormente, hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e fermentação. Estas etapas foram realizadas em bagaço de cana-de-açúcar e em serragem de eucalipto. Os resultados estão divididos em dois capítulos e são discutidos a seguir.

### 5.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

#### 5.1.1 Avaliação do crescimento e produção de enzimas em bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 9 são mostrados os perfis de crescimento das diferentes linhagens em função do tempo de cultivo em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Constatou-se que todas as linhagens de basidiomicetos testadas foram capazes de colonizar o substrato.



**Figura 9** – Variação do crescimento fúngico de diferentes basidiomicetos, em massa de micélio por massa de biomassa seca, em função do tempo de cultivo em meio composto por bagaço de cana-de-açúcar.

Observa-se que a linhagem que apresentou maior formação de micélio foi *S. commune* VE07, alcançando cerca de  $0,25 \pm 0,004$  g de micélio por g de biomassa seca (g/g), seguida por *P. sanguineus* OU04, *M. palmivorus* VE111, *P. sanguineus* PR32 e *T. villosa* 8216, que atingiram, respectivamente,  $0,18 \pm 0,005$ ,  $0,16 \pm 0,001$ ,  $0,13 \pm 0,012$  e  $0,11 \pm 0,005$  g/g. As linhagens que apresentaram menor crescimento foram *P. albidus* 88F-13 ( $0,07 \pm 0,006$  g/g) e *P. pulmonarius* PS2001 ( $0,05 \pm 0,003$  g/g).

As diferenças observadas durante o crescimento podem ser devidas a diversos fatores, como o pH do meio, a presença de macronutrientes e micronutrientes necessários para a espécie, o tipo de substrato e linhagem utilizados, entre outros (SALES-CAMPOS et al., 2010).

O pré-tratamento biológico tem sido associado às modificações causadas na biomassa pela ação de enzimas produzidas durante a colonização. Essas enzimas atuam em locais específicos do substrato, podendo degradar lignina, hemicelulose e polifenóis, além de atingir a fibra de celulose (AGBOR et al., 2011).

O complexo enzimático responsável pela degradação da lignina é composto por lacases e peroxidases (SINDHU, BINOD & PANDEY, 2016). Nas peroxidases, são incluídas a lignina peroxidase (E.C.1.11.1.7), que degrada unidades não-fenólicas e a manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.7), que atua sobre unidades fenólicas e não-fenólicas de lignina (BINOD et al., 2011). As lacases são fenoloxidasas que atuam juntamente com as peroxidases, oxidando componentes fenólicos e os reduzindo, levando à completa degradação a oxigênio à água (BAIOCCO et al., 2003; BETTIN et al., 2011).

Na Figura 10 são mostrados os dados de produção de lacases (Figura 10A), de manganês peroxidases (Figura 10B) e de peroxidases totais (Figura 10C) em função do tempo de cultivo.

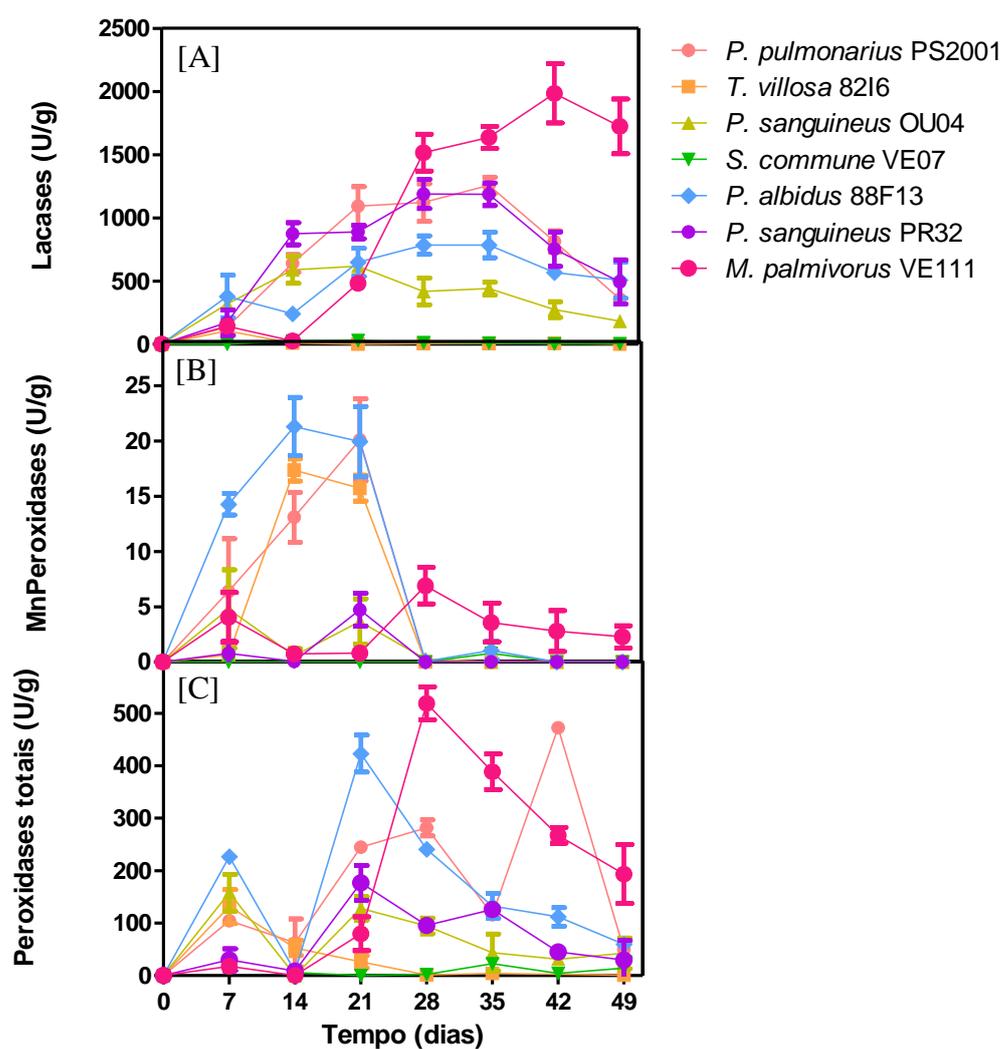
Com relação à produção de lacases, observou-se que o basidiomiceto *M. palmivorus* VE111 se destacou, apresentando atividades crescentes até atingir, em 42 dias de processo, o pico de  $1985 \pm 235$  U/g. As linhagens *P. pulmonarius* PS2001 e *P. sanguineus* PR32, seguidos por *P. albidus* 88F-13 alcançaram atividades de, respectivamente,  $1256 \pm 65$ ,  $1185 \pm 89$  e  $785 \pm 72$  U/g, em 35 dias de cultivo.

Quanto à produção de manganês peroxidases, pode-se observar que as linhagens que produziram maiores atividades desta enzima foram *P. albidus* 88F-13 ( $21,3 \pm 2,6$  U/g), apresentando atividades crescentes em até 21 dias de cultivo e *P. pulmonarius* PS2001 ( $21 \pm 3,7$  U/g) e *T. villosa* 82I6 ( $17 \pm 1$  U/g), que apresentaram atividades crescentes em até 14 dias de cultivo.

As linhagens que se destacaram na produção de peroxidases totais foram *M. palmivorus* VE111, que apresentou pico enzimático de  $518 \pm 31$  U/g em 28 dias de processo, seguido por *P. pulmonarius* PS2001 ( $472 \pm 48$  U/g em 42 dias) e *P. albidus* 88F-13 ( $423 \pm 35$  U/g em 21 dias).

A hidrólise da hemicelulose – polissacarídeo que forma uma rede estrutural reticulada, que contribui para manter a integridade da parede celular vegetal - é catalisada pelas xilanases

(BINOD *et al.*, 2011). As endoglucanases atuam aleatoriamente em vários locais internos nas regiões amorfa da fibra de celulose, diminuindo o grau de polimerização, abrindo locais para posterior ação das celobiohidrolases (LYND *et al.*, 1991). Endoglucanases e celobiohidrolases atuam em sinergia na hidrólise da celulose (RABINOVICH *et al.*, 2002) e as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam celobiose e oligossacarídeos de celulose a glicose. A presença destas enzimas durante o pré-tratamento pode ser favorável ao processo, desde que o microrganismo não utilize os açúcares resultantes da ação deste conjunto de enzimas em seu metabolismo.

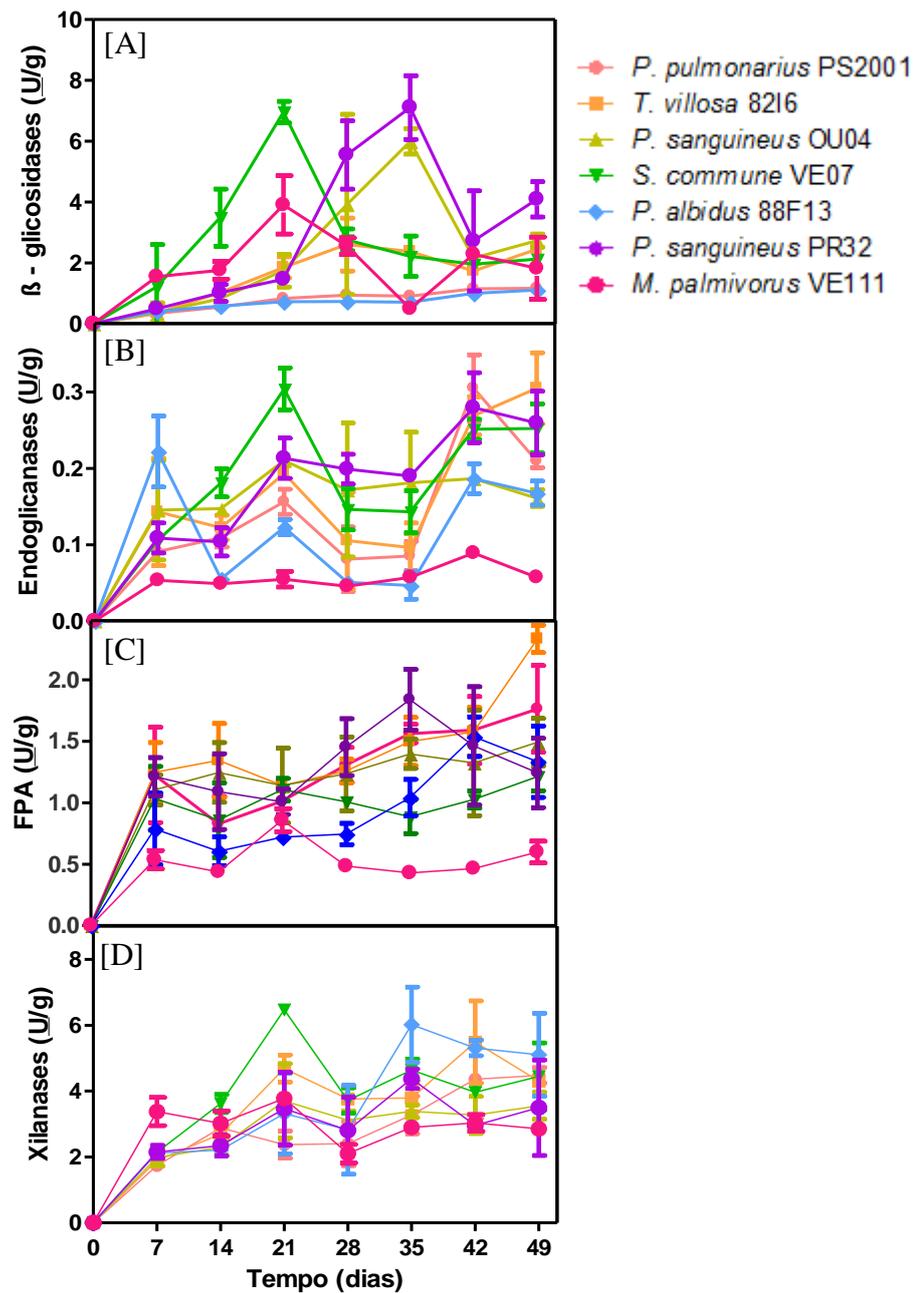


**Figura 10** – Variação da atividade de lacases [A], manganês peroxidases [B] e peroxidases totais [C] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.

Sendo assim, há a necessidade de avaliar as espécies de basidiomicetos, de modo a identificar aquelas que sejam capazes de promover a deslignificação da biomassa, mas que possuam pouca ou nenhuma atividade metabólica para a utilização de celulose e hemicelulose (SAHA *et al.*, 2016). Assim, foi avaliada a produção de diferentes enzimas que atuam sobre

esses componentes da biomassa.

Na Figura 11, são mostrados os gráficos de produção de  $\beta$ -glicosidases (Figura 11A), endoglicanases (Figura 11B) atividade sobre papel filtro (FPA) (Figura 11C) e xilanases (Figura 11D) pelas espécies de basidiomicetos durante o cultivo.



**Figura 11** – Variação da atividade de  $\beta$ -glicosidases [A], endoglicanases [B] FPA [C] e xilanases [D] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.

*P. pulmonarius* PS2001, *P. albidus* 88F-13 e *T.villosa* 82I6 apresentaram baixas atividades de  $\beta$ -glicosidases ao longo de todo o cultivo. As linhagens PR32 e OU04 de *P.*

*sanguineus* apresentaram atividade máxima de, respectivamente  $7,1 \pm 1,0$  e  $6,0 \pm 0,4$  U/g, em 35 dias. *S. commune* VE07 e *M. palmivorus* VE111 tiveram pico enzimático de, respectivamente  $3,9 \pm 0,4$  e  $3,9 \pm 0,9$  U/g, em 21 dias.

As atividades de endoglicanases foram baixas para todas as espécies avaliadas, sendo que *M. palmivorus* VE111 foi a espécie que apresentou menores atividades desta enzima, chegando a apenas  $0,09 \pm 0,005$  U/g. *P. albidus* 88F-13 apresentou pico enzimático de  $0,2 \pm 0,05$  U/g em 7 dias de cultivo. Em 21 dias, *S. commune* VE07 apresentou atividade máxima de  $0,3 \pm 0,03$  U/g. Para as outras espécies, as atividades foram crescentes ao longo do cultivo, atingindo valores próximos a 0,3 U/g ao final de 49 dias.

A espécie que apresentou maiores atividades de FPA, ao final de 49 dias de cultivo, foi *T. villosa* 82I6 ( $2,3 \pm 0,1$  U/g) seguida por *P. sanguineus* OU04, que apresentou pico de atividade de  $1,4 \pm 0,1$  U/g em 35 dias de cultivo. Mas, de um modo geral, as espécies testadas apresentaram baixos valores de atividade desta enzima.

Quanto à produção de xilanases, as espécies que mais produziram foram *S. commune* VE07, que apresentou atividade máxima de  $6,5 \pm 0,2$  U/g em 21 dias de cultivo, seguida por *P. albidus* 88F-13, que apresentou atividades crescentes até a máxima, em 35 dias, de  $6,0 \pm 1,1$  U/g. *T. villosa* 82I6 apresentou pico enzimático de  $5,5 \pm 1,2$  U/g em 42 dias de processo. Após as máximas atividades, estas espécies permaneceram com atividades na ordem de 4,5 U/g até o fim do cultivo.

Ficou evidente que as espécies estudadas apresentam secreção de diferentes complexos enzimáticos, o que resulta em diferenças na degradação dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

Ainda, ao relacionar o crescimento celular com a produção de enzimas das linhagens *P. pulmonarius* PS2001, *P. albidus* 88F-13 e *T. villosa* 82I6, observou-se que estes apresentaram menor formação de micélio e produziram altas quantidades de lacases e peroxidases, o que provavelmente indica que as espécies em questão estiveram sob condição de estresse celular, como por exemplo, limitação de nutrientes específicos. De acordo com Leisola *et al.* (2012), a secreção de enzimas capazes de degradar a lignina por fungos de degradação branca tem algumas particularidades. Entre elas o fato de que a lignina é degradada somente após o esgotamento de nutrientes, o que desencadeia o metabolismo secundário do microrganismo.

### 5.1.2 Análise dos componentes químicos do bagaço de cana-de-açúcar

As análises da composição do bagaço de cana-de-açúcar antes e após 49 dias de pré-tratamento biológicos por diferentes espécies de basidiomicetos são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - As análises da composição do bagaço de cana-de-açúcar antes e após 49 dias de pré-tratamento biológicos por diferentes espécies de basidiomicetos.

Pré-tratamento biológico (PTB)	Perda de massa (%)	Lignina total (%)	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Holocelulose (%)
Controle	-	28,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	21,1 ± 0,5 <sup>abc</sup>	49,1 ± 2,6 <sup>ab</sup>
<i>P. pulmonarius</i> PS2001	31,7 ± 3,7 <sup>ab</sup>	26,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	17,5 ± 0,06 <sup>bc</sup>	53,2 ± 4,7 <sup>ab</sup>
<i>T. villosa</i> 82I6	23,9 ± 4 <sup>bc</sup>	21,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,9 ± 1,6 <sup>bc</sup>	51,6 ± 1,6 <sup>ab</sup>
<i>S. commune</i> VE07	21,3 ± 0,8 <sup>c</sup>	29,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	22,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	49,7 ± 6,9 <sup>ab</sup>
<i>P. sanguineus</i> OU04	24,8 ± 5,9 <sup>bc</sup>	28,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,5 <sup>abc</sup>	49,1 ± 0,7 <sup>ab</sup>
<i>P. albidus</i> 88F-13	40,9 ± 0,7 <sup>bc</sup>	26,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	17,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	52,0 ± 3,7 <sup>ab</sup>
<i>P. sanguineus</i> PR32	22,3 ± 3,7 <sup>bc</sup>	27,7 ± 1,7 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	18,9 ± 2,5 <sup>abc</sup>	57,5 ± 3,0 <sup>a</sup>
<i>M. palmivorus</i> VE111	19,9 ± 2,3 <sup>c</sup>	29,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	22,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	47,1 ± 1,6 <sup>b</sup>

A partir da perda de massa da biomassa lignocelulósica, após o desenvolvimento das culturas, tem-se uma estimativa do grau de degradação do substrato (SALVACHÚA *et al.*, 2011). A espécie que promoveu perda de massa significativamente superior às outras espécies foi *P. albidus* 88f-13 (40,9% ± 0,7). As linhagens *P. pulmonarius* PS2001, *T. villosa* 82I6 e *P. sanguineus* OU04 e PR32, promoveram perda de massa estatisticamente igual. *M. palmivorus* VE111 apresentou perda de massa significativamente inferior (19,9% ± 2,3) à observada em pré-tratamentos com as outras espécies. As perdas de massa são obviamente associadas ao crescimento de cada fungo e são o resultado da transformação da biomassa vegetal em biomassa fúngica e geração de CO<sub>2</sub> (CASTOLDI *et al.*, 2014).

Com relação à amostra controle, não houve diferenças significativas nos percentuais de lignina e holocelulose após 49 dias de pré-tratamento biológico pelas espécies testadas. Observou-se para todos os pré-tratamentos biológicos, exceto no realizado com a espécie *S. commune* VE07, aumento no percentual de lignina solúvel em ácido após o pré-tratamento biológico, quando comparado com o controle. Ainda, houve diminuição do teor de lignina insolúvel, exceto para pré-tratamentos realizados com *S. commune* VE07 e *M. palmivorus* VE111. Lee *et al.* (2007) observaram esta relação entre os teores de lignina solúvel e insolúvel em pré-tratamentos biológicos de *Pinus* realizados com as espécies *Ceriporia lacerata*, *Stereum hirsutum* e *Polyporus brumalis*. O teor de lignina insolúvel provavelmente foi diminuído devido à ação das enzimas produzidas pelos fungos, que promoveram a decomposição da lignina a compostos fenólicos de baixos pesos moleculares, o que também

promoveu aumento no teor de lignina solúvel em ácido.

Foi realizada espectroscopia FTIR com foco nas faixas correspondentes a lignina, celulose e hemiceluloses. Foram avaliadas cinco bandas: 1515  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações do esqueleto aromático da lignina), 1427  $\text{cm}^{-1}$  (núcleos condensados de siringil e guaiacil), 1375  $\text{cm}^{-1}$  (celulose e hemiceluloses), 1098  $\text{cm}^{-1}$  (celulose cristalina) e 898  $\text{cm}^{-1}$  (celulose amorfa). A análise destes espectros em termos de modificações percentuais de cada amostra tratada em relação à amostra controle (sem pré-tratamento) é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Redução em bandas específicas nos espectros FTIR do bagaço de cana-de-açúcar causado pelo pré-tratamento biológico.

Pré-tratamento biológico (PTB)	Redução percentual em bandas específicas de análise de FTIR				
	898 $\text{cm}^{-1}$ (celulose amorfa)	1098 $\text{cm}^{-1}$ (celulose cristalina)	1375 $\text{cm}^{-1}$ (celulose e hemiceluloses)	1427 $\text{cm}^{-1}$ (núcleos condensados de siringil e guaiacil)	1515 $\text{cm}^{-1}$ (vibrações do esqueleto aromático da lignina)
<i>P. pulmonarius</i> PS2001	2,1 ± 2,3 <sup>bc</sup>	4,0 ± 3,6 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	4,6 ± 2,8 <sup>ab</sup>	29,8 ± 0,9 <sup>ab</sup>
<i>T. villosa</i> 8216	4,3 ± 2,9 <sup>bc</sup>	4,3 ± 1,2 <sup>c</sup>	3,0 ± 4,3 <sup>b</sup>	11,1 ± 4,9 <sup>ab</sup>	34,4 ± 7,9 <sup>a</sup>
<i>S. commune</i> VE07	0 ± 0 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
<i>P. sanguineus</i> OU04	0 ± 0 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	4,3 ± 5,7 <sup>b</sup>	11,6 ± 3,4 <sup>ab</sup>	29,8 ± 1,9 <sup>ab</sup>
<i>P. albidus</i> 88F-13	13,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	11,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	5,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	8,2 ± 7,8 <sup>ab</sup>	29,6 ± 0,6 <sup>ab</sup>
<i>P. sanguineus</i> PR32	32,2 ± 5,7 <sup>a</sup>	39,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	20,7 ± 2,7 <sup>a</sup>	21,1 ± 3,2 <sup>a</sup>	27,3 ± 2,1 <sup>ab</sup>
<i>M. palmivorus</i> VE111	3,2 ± 1,0 <sup>bc</sup>	1,5 ± 0,8 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	5,9 ± 3,8 <sup>ab</sup>	11,9 ± 10,2 <sup>c</sup>

Foram observadas diminuições em todas as bandas analisadas após o pré-tratamento, porém, as modificações nas diferentes bandas não foram uniformemente distribuídas, apresentando diferenças para todos os pré-tratamentos biológicos. Apenas a linhagem *S. commune* VE07 apresentou valores nulos de redução para todas as bandas analisadas. Provavelmente, esta linhagem consumiu pequenas quantidades dos componentes da biomassa, de modo que não foi possível detectar em espectros de FTIR, ou ainda, causou modificações em bandas diferentes das analisadas.

A banda 1515  $\text{cm}^{-1}$ , referente às vibrações do esqueleto aromático da lignina, foi a que apresentou diminuição mais pronunciada, sugerindo para todos os pré-tratamentos, exceto

para *S. commune* VE07, a ocorrência de degradação da lignina. *T. villosa* 82I6, *P. pulmonarius* PS2001, *P. albidus* 88F-13 e *P. sanguineus* PR32 e OU04 apresentaram as maiores reduções nesta banda e foram estatisticamente iguais (redução em torno de 30%). Reduções na banda  $1427\text{ cm}^{-1}$  (núcleos condensados de siringil e guaiacil) corroboram a sugestão de que houve redução da lignina presente na biomassa. *P. sanguineus* PR32 apresentou redução nesta banda superior às outras espécies testadas.

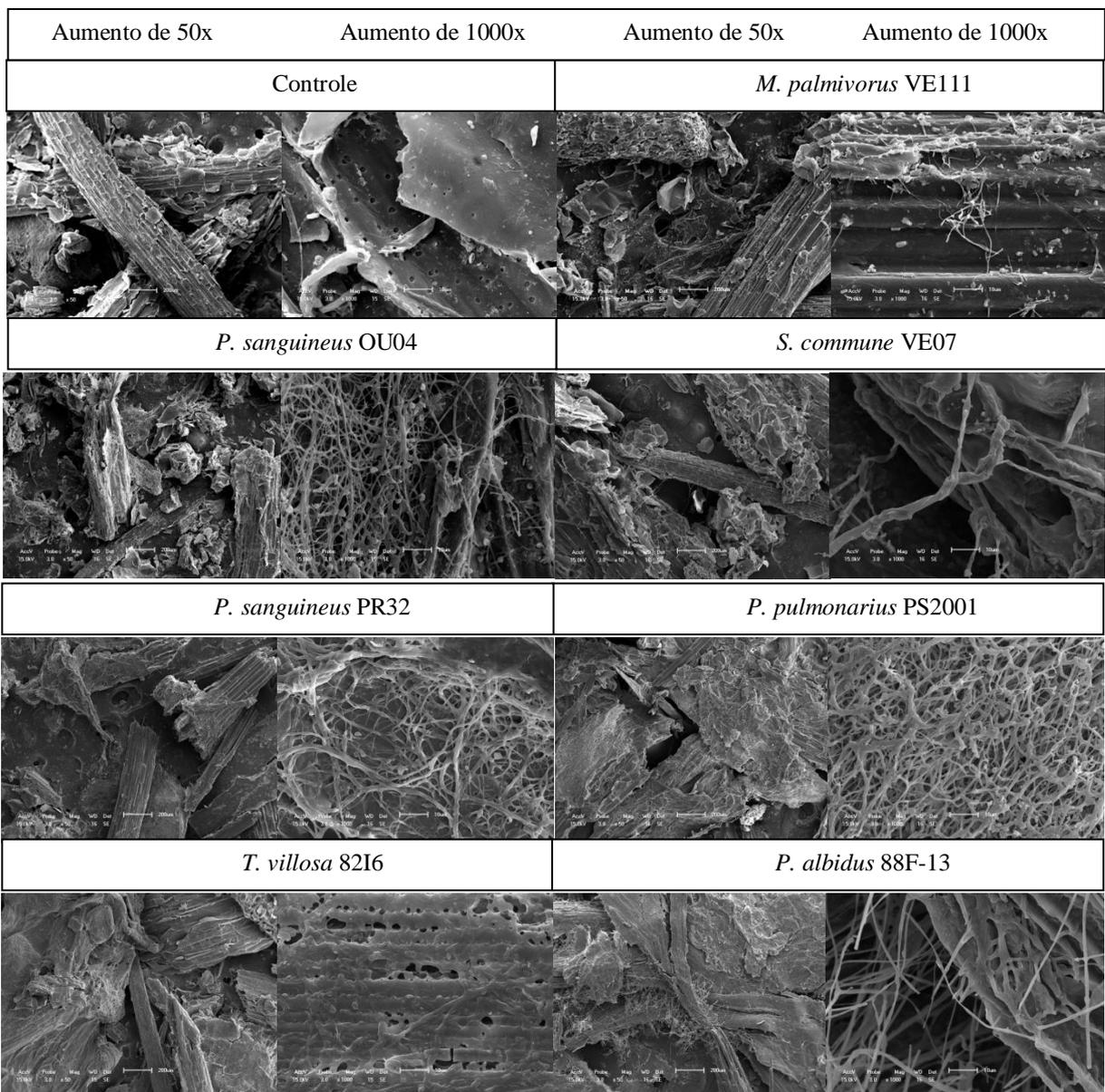
As diminuições nas bandas  $898\text{ cm}^{-1}$  (celulose amorfa) e  $1098\text{ cm}^{-1}$  (celulose cristalina) são claras indicações de degradação da celulose. A redução nessas bandas foi especialmente pronunciada em pré-tratamento realizado com *P. sanguineus* PR32, que apresentou valores estatisticamente superiores a todas as espécies testadas, seguido por *P. albidus* 88F-13. Na banda  $1375\text{ cm}^{-1}$  (celulose e hemicelulose), novamente *P. sanguineus* PR32 promoveu redução estatisticamente superior. Destaca-se que, a degradação da celulose é considerada uma desvantagem para o processo, visto que os açúcares a serem obtidos na etapa de hidrólise serão obtidos desta fração da biomassa e o consumo da mesma, resultará em diminuição na produtividade. Porém, alguns autores têm destacado que a diminuição na fração de celulose cristalina pode melhorar o processo de hidrólise.

A degradação da lignina por basidiomicetos está associada a níveis variáveis de consumo de açúcar, obtidos a partir da hidrólise de holocelulose, para as necessidades de crescimento. Por essa razão é importante atingir um estado de equilíbrio entre ambas as vias. Ao selecionar um basidiomiceto para o pré-tratamento biológico, ambos os parâmetros devem ser considerados, uma vez que representam um efeito importante na economia do processo. Os melhores resultados serão aqueles em que a redução de lignina é a mais elevada com o menor consumo de açúcar, em menor tempo (GARCÍA-TORREIRO *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que as espécies *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 apresentaram proporções favoráveis entre o consumo de celulose, hemicelulose e lignina. Ou seja, apresentaram altas reduções nas bandas referentes à lignina e baixas reduções nas bandas referentes à holocelulose. De acordo com Lee *et al.* (2007), isto demonstra que o sistema de enzimas hidrolíticas secretadas por estes microrganismos não foi eficiente para degradar a holocelulose presente na biomassa. Conforme discutido anteriormente na Figura 3, estas espécies apresentaram baixas atividades de  $\beta$ -glicosidases, endoglicanases, FPA e xilanases.

A microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada para verificar as mudanças estruturais causadas após 49 dias de pré-tratamentos biológicos (Figura 12). A amostra controle (não tratada) exibiu estruturas mais ordenadas e alguns poros de ordem de  $1\mu\text{m}$ . Após o pré-tratamento, as estruturas foram modificadas, sendo observada a

cobertura da biomassa por micélio fúngico, desprendimento de fibras e aparecimento de poros maiores e fissuras, em alguns casos. Em pré-tratamentos com as espécies *P. sanguineus* PR32 e OU04, *P. pulmonarius* PS2001 e *P. albidus* 88F-13, obsevou-se que o bagaço de cana-de-açúcar foi totalmente envolto pelo micélio fúngico. Em pré-tratamento realizado com *T. villosa* 82I6 a modificação na biomassa foi mais evidente, sendo observados, além da presença de micélio, uma desorganização na estrutura da biomassa, fissuras e o aumento do tamanho de poros na superfície para cerca de 6  $\mu\text{m}$ .

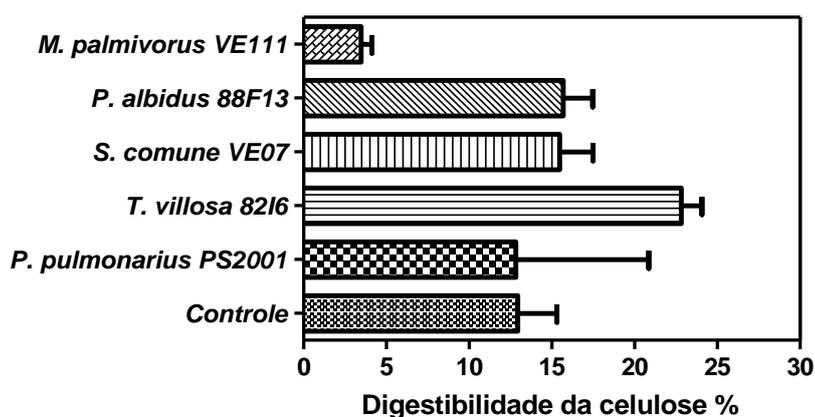


**Figura 12.** Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes basideomicetos.

Castoldi *et al.* (2014), observaram a formação de poros nas superfícies de serragens de eucalipto pré-tratados com *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes* sp. e *Ganoderma lucidum*. Estas mudanças estruturais nas amostras pré-tratadas podem favorecer a exposição da celulose (Scholl *et al.*, 2015). O aparecimento de poros resulta em maior área superficial disponível e é geralmente considerado como um indicativo de aumentos na acessibilidade à celulose disponível para ataque enzimático (OOSHIMA, SAKATA e HARANO, 1986).

### 5.1.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelos macromicetos foi utilizado para os ensaios de hidrólise enzimática, a fim de avaliar a liberação de açúcares. Em hidrólises de biomassa pré-tratada pelas linhagens OU04 e PR32 de *P. sanguineus*, as obtenções de glicose foram nulas. Para os pré-tratamentos realizados com as outras espécies, após 24 horas de hidrólise, é mostrada a digestibilidade da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por 49 dias (Figura 13).



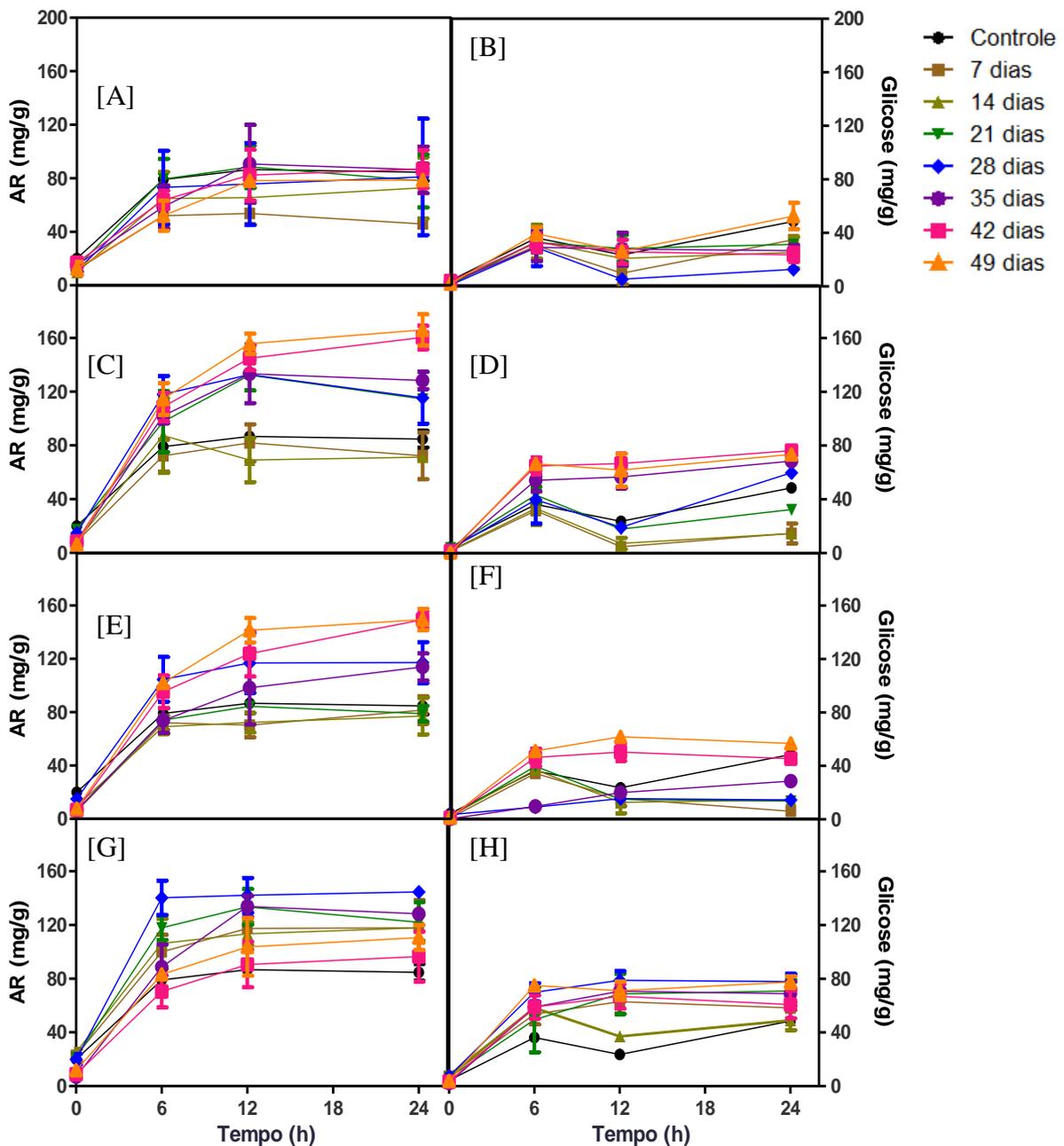
**Figura 13.** Digestibilidade da celulose de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por diferentes espécies de basidiomicetos por 49 dias, após processo de 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*).

A digestibilidade representa o rendimento de conversão da matéria-prima em açúcares fermentescíveis (SALVACHÚA *et al.*, 2011). A digestibilidade da celulose é o percentual de glicose liberada durante a hidrólise em relação ao máximo teórico presente na biomassa (GARCÍA-TORREIRO *et al.*, 2016).

Observa-se que *M. palmivorus* VE111 provocou diminuição na digestibilidade ( $3,5 \pm 0,7\%$ ) em relação ao controle ( $12,9 \pm 2,4\%$ ). *P. pulmonarius* PS2001 apresentou digestibilidade semelhante ao controle ( $12,8 \pm 2,4\%$ ), enquanto as linhagens *P. albidus* 88F-13, *S. commune* VE07 e *T. villosa* 82I6 aumentaram este parâmetro para, respectivamente

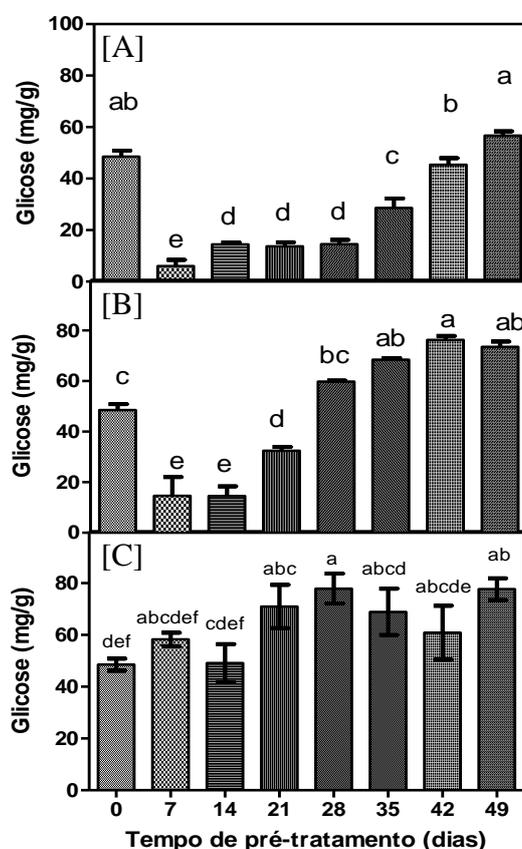
15,7±1,8%, 15,5±2,0% e 22,8±1,2%. Vale ressaltar que a linhagem que promoveu maior aumento na digestibilidade, *T. villosa* 82I6, foi aquela que provocou maior redução no percentual de lignina total presente na biomassa.

Na Figura 14, são mostrados os gráficos de liberação de açúcares redutores e de glicose ao longo do tempo de hidrólise enzimática de amostras pré-tratadas por diferentes períodos de tempo – 7 a 49 dias de cultivo. Os gráficos referem-se aos pré-tratamentos realizados com as espécies que apresentaram digestibilidade igual ou superior ao controle.



**Figura 14.** Açúcares redutores e glicose liberados por massa de biomassa seca durante a hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar, após diferentes tempos de pré-tratamento biológico por [A] e [B] *Schizophyllum commune* VE07, [C] e [D] *Pleurotus pulmonarius* PS2001, [E] e [F] *Pleurotus albidus* 88F-13 e [G] e [H] *Trametes villosa* 82I6.

Na Figura 15 é mostrada análise estatística da liberação de glicose em 24 horas de hidrólise enzimática a partir de amostras pré-tratadas biologicamente por diferentes tempos.



**Figura 15.** Glicose liberada após 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar após diferentes tempos de pré-tratamento biológicos por *Pleurotus albidus* 88F-13 [A]; *Pleurotus pulmonarius* PS2001 [B] e *Trametes villosa* 82I6 [C].

Nas hidrólises enzimáticas realizadas com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *P. albidus* 88F-13, observou-se que nas amostras pré-tratadas por 42 e 49 dias, a liberação de glicose foi estatisticamente igual ao controle ( $48,5 \pm 2,38$  mg/g), respectivamente  $45,4 \pm 2,6$  e  $56,7 \pm 1,7$  mg/g. Porém, observou-se tendência de aumento na obtenção de glicose com o aumento do tempo de pré-tratamento, o que pode indicar a necessidade de testes com amostras pré-tratadas por maiores períodos de tempo (Figura 15A). A partir de amostra pré-tratada por *P. pulmonarius* PS2001 foram obtidas quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle em amostras com tempos de pré-tratamento de 35, 42 e 49 dias (respectivamente,  $68,4 \pm 0,7$ ,  $76,3 \pm 1,6$  e  $76,5 \pm 2,1$  mg/g) (Figura 15B). Já em pré-tratamento com *T. villosa* 82I6, observou-se que amostras com tempos de 21, 28 e 49 dias, liberaram quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle (respectivamente,  $70,9 \pm 8,3$ ,  $77,8 \pm 5,8$  e  $77,6 \pm 4,2$  mg/g) (Figura 15C).

Ressalta-se que diminuir o tempo de processo é um dos fatores que interfere diretamente na produtividade e no custo final de um produto. Diminuir o tempo do pré-tratamento é o principal desafio para esta área. Desta forma, entre as linhagens que se mostraram eficientes no pré-tratamento biológico, destaca-se *T. villosa* 82I6, visto que a partir do 21º dia de cultivo, a hidrólise enzimática do substrato bagaço de cana-de-açúcar promoveu maior liberação de glicose em relação ao controle.

#### **5.1.4 Fermentação alcoólica dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar**

A avaliação da produção de etanol é necessária para quantificar o desempenho final do processo (SALVACHÚA et al., 2014). Em nível industrial, apenas a glicose está sendo fermentada com altos rendimentos de produção de etanol, enquanto a fermentação com xilose, que também é essencial para o sucesso econômico do etanol lignocelulósico, continua sendo investigada para elevar os baixos rendimentos obtidos até agora (GÍRIO et al., 2010, LEE, 1997).

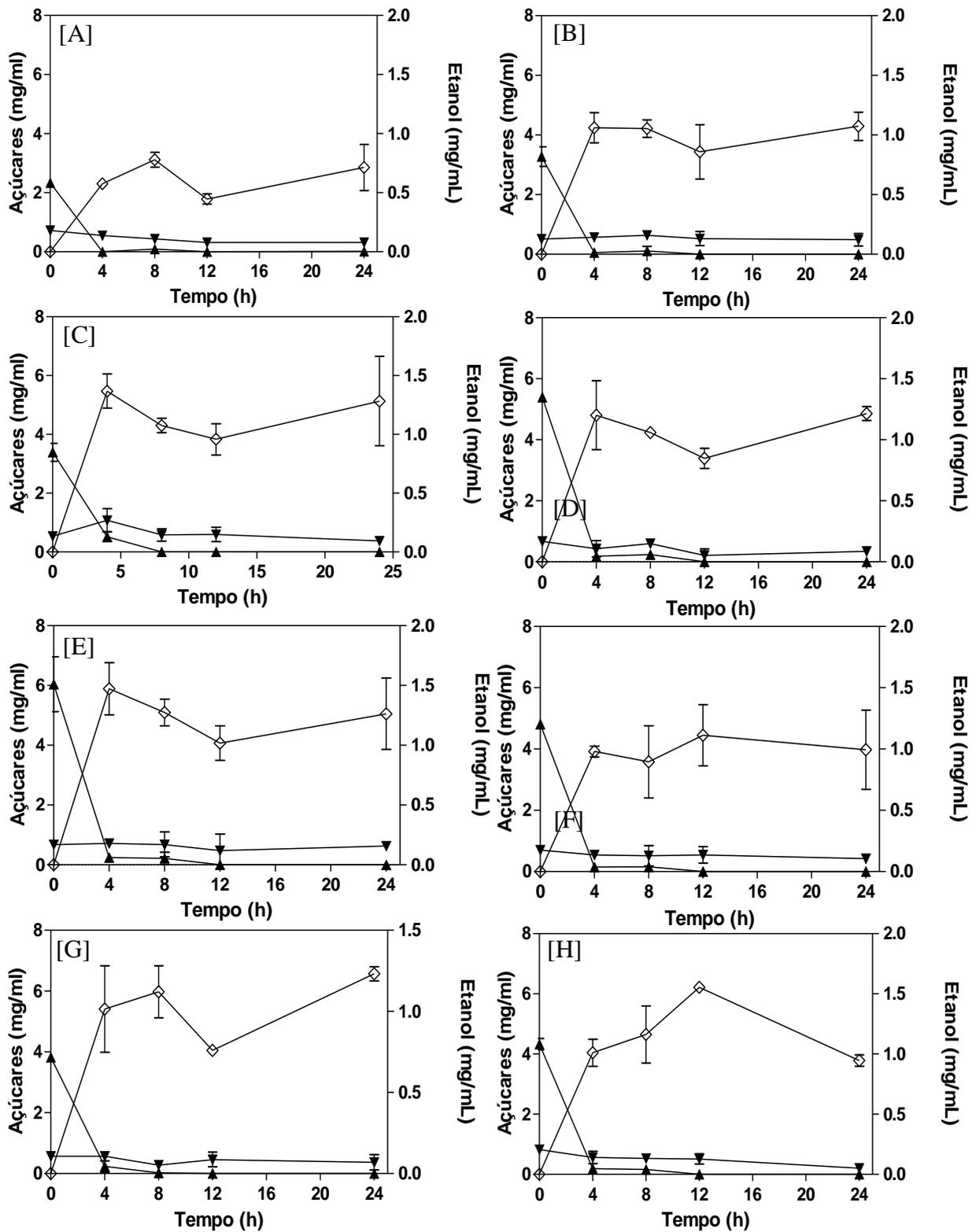
Visto que as amostras pré-tratadas por *T. villosa* 82I6 apresentaram melhores resultados na etapa de hidrólise, foi realizada a fermentação dos hidrolisados de amostras pré-tratadas por esta linhagem.

A Figura 16 apresenta as concentrações de açúcares – glicose e xilose – e as concentrações de etanol ao longo de 24 horas de fermentação alcoólica dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *T. villosa* 82I6, por diferentes tempos, e da amostra controle (hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento).

Avaliando-se as amostras pré-tratadas, observou-se que a quantidade inicial de açúcares, bem como a concentração de etanol alcançada, em todas as amostras pré-tratadas foram superiores ao controle (Figura 16A).

Verificou-se que em todas as condições, o consumo total da glicose ocorreu durante as primeiras 4 horas de fermentação. Os decréscimos nas concentrações de glicose coincidem com os aumentos na concentração de etanol.

Quanto aos teores de xilose, estes mantiveram-se constantes ao longo do processo de fermentação em todas as amostras, visto que a levedura utilizada não é capaz de metabolizar este açúcar. Quanto às quantidades de xilose disponíveis, observou-se valores em torno de 1 mg/mL em todas as condições.



**Figura 16.** Concentração de glicose, xilose e etanol (mg / mL) obtida a partir da fermentação de amostras pré-tratadas por *T. villosa* 82I6 para 0 [A], 7 [B], 14 [C], 21 [D], 28 [E], 35 [F], 42 [G] e 49 [H] dias. Legenda: (▼) glicose, (▲) xilose e (◇) etanol.

Na Tabela 3 é mostrado o máximo rendimento de biomassa em etanol.

**Tabela 3.** Avaliação dos rendimentos máximos de etanol obtidos pela fermentação -utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 - da glicose liberada na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por *T. villosa* 82I6 por diferentes períodos de tempo.

Amostra	Tempo (h)	Rendimento em etanol (mg/g)*
Controle	8	10,1±0,8 <sup>b</sup>
Pré-tratada por 7 dias	4	13,8±1,6 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 14 dias	4	17,8±1,9 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 21 dias	4	15,6±3,7 <sup>a</sup>
Pré-tratada por 28 dias	4	19,1±2,8 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 35 dias	12	14,4±3,2 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 42 dias	24	16,0±0,6 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 49 dias	12	20,2±0,5 <sup>a</sup>

\*mg de etanol/g de bagaço de cana-de-açúcar – rendimento calculado com a máxima produção de etanol.

A partir de hidrolisado da amostra controle, obteve-se o máximo rendimento de 10,1±0,8 mg/g. Isto é, para cada grama de biomassa utilizado, 10,1±0,8 mg de etanol são obtidos. As amostras pré-tratadas por 7, 14, 21, 35 e 42 dias apresentaram rendimento em etanol estatisticamente iguais ao controle. As amostras pré-tratadas por 28 e 49 dias, apresentaram rendimento em etanol estatisticamente superiores ao controle. Corroborando os dados mostrados na Figura 15C, na qual observa-se que a obtenção de glicose no processo de hidrólise de amostras pré-tratadas por 28 e 49 dias foram estatisticamente superiores ao controle. A partir desse resultado, percebe-se a influencia positiva da realização do pré-tratamento biológico sobre as etapas seguintes do processo.

## 5.2 SERRAGEM DE EUCALIPTO

A partir dos resultados obtidos em pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, constatou-se que as espécies mais promissoras para a utilização como agentes biológicos em pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica foram *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6. Deste modo, foram conduzidos pré-tratamentos em serragem de eucalipto com estas espécies.

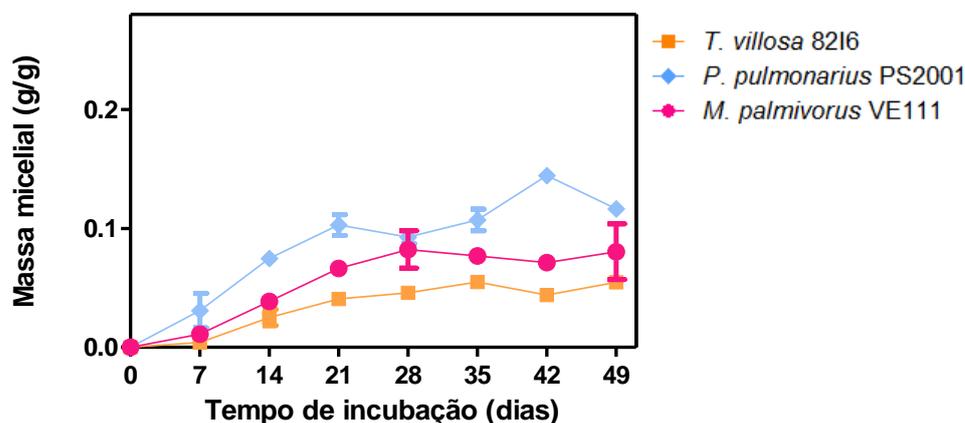
Ainda, a espécie *M. palmivorus* VE111, apesar de não ter apresentado resultados satisfatórios de deslignificação e obtenção de açúcares na etapa de hidrólise, produziu altas quantidades das enzimas lacases, manganês peroxidases e peroxidases totais. Acreditando que

estas enzimas possam ter atividade catalítica sobre outro substrato, que não o bagaço de cana-de-açúcar, este microrganismo também foi testado. Os resultados são descritos nos capítulos a seguir.

### 5.2.1 Avaliação do crescimento e produção de enzimas em serragem de eucalipto

Na Figura 17 são mostrados os perfis de crescimento das diferentes espécies em função do tempo de cultivo em meio à base de serragem de eucalipto.

Observa-se que todas as espécies de basidiomicetos testadas foram capazes de colonizar o meio composto majoritariamente por serragem de eucalipto. O microrganismo que apresentou maior crescimento celular foi *P. pulmonarius* PS2001 ( $0,145 \pm 0,005$  g/g), seguido por *M. palmivorus* VE111 ( $0,08 \pm 0,02$  g/g) e *T. villosa* 82I6 ( $0,05 \pm 0,005$  g/g).



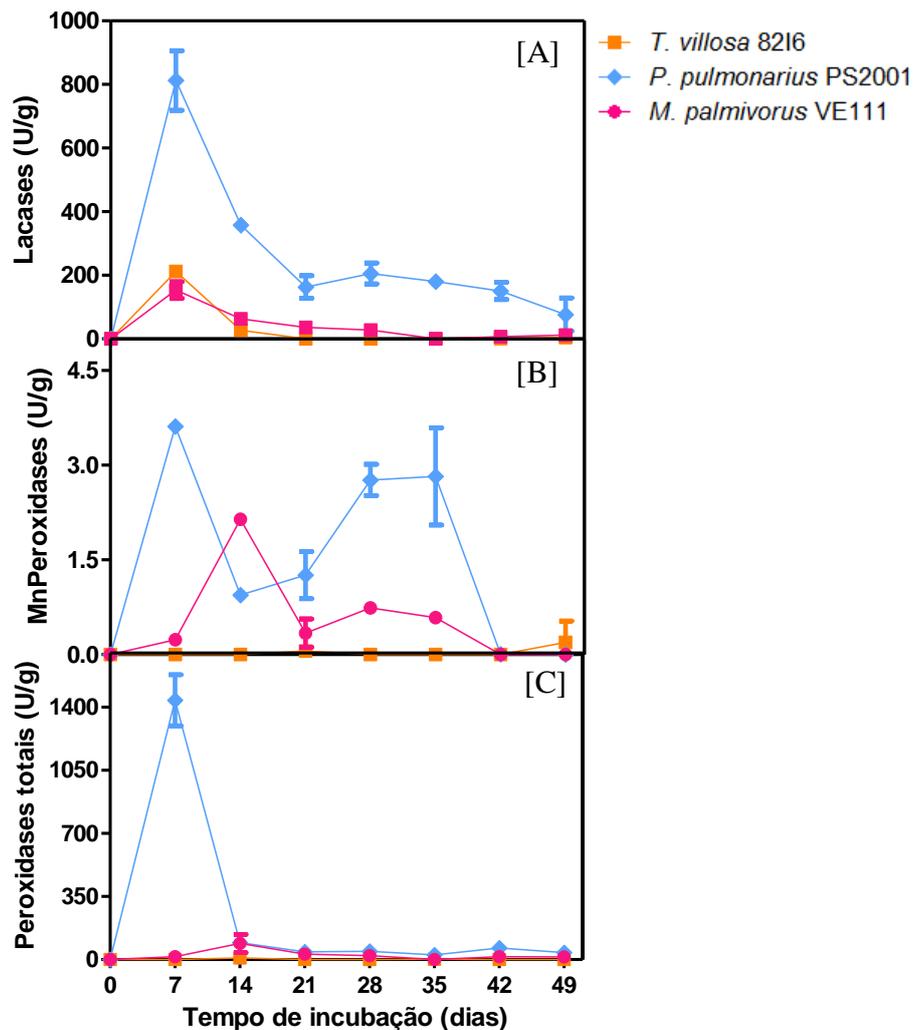
**Figura 17.** Variação do crescimento fúngico de diferentes basidiomicetos, em gramas de micélio por grama de biomassa seca, em função do tempo de cultivo.

Na Figura 18 são mostrados os gráficos da produção de lacases (Figura 18A), manganês peroxidases (Figura 18B) e peroxidases totais (Figura 18C) em função do tempo de cultivo.

Com relação à produção de lacases, observou-se que o basidiomiceto *M. palmivorus* VE111 apresentou pico enzimático de  $153,6 \pm 26,2$  U/g em 7 dias de cultivo, atividade inferior à máxima alcançada em meio composto majoritariamente por bagaço de cana-de-açúcar. A linhagem *T. villosa* 82I6 apresentou máxima atividade de  $211,7 \pm 12,0$  U/g em 7 dias e, após, valores praticamente nulos de atividade até o final do cultivo. *P. pulmonarius* PS2001 alcançou atividade máxima de  $812,5 \pm 93,5$  U/g, também em 7 dias, e, após este período, apresentou atividades em torno de 200 U/g até o fim do cultivo.

*P. pulmonarius* PS2001 também se destacou na produção de manganês peroxidases em meio à base de serragem de eucalipto, apresentando pico de atividade de  $3,6 \pm 0,2$  U/g.

Porém, atividade enzimática bastante inferior à obtida em meio de bagaço de cana-de-açúcar ( $21 \pm 3,7$  U/g). Este basidiomiceto também foi o único a apresentar título relevante de peroxidases totais,  $1438,7 \pm 142$  U/g em 7 dias de processo, valor superior ao obtido em meio constituído por bagaço de cana-de-açúcar ( $472 \pm 48$  U/g em 42 dias).

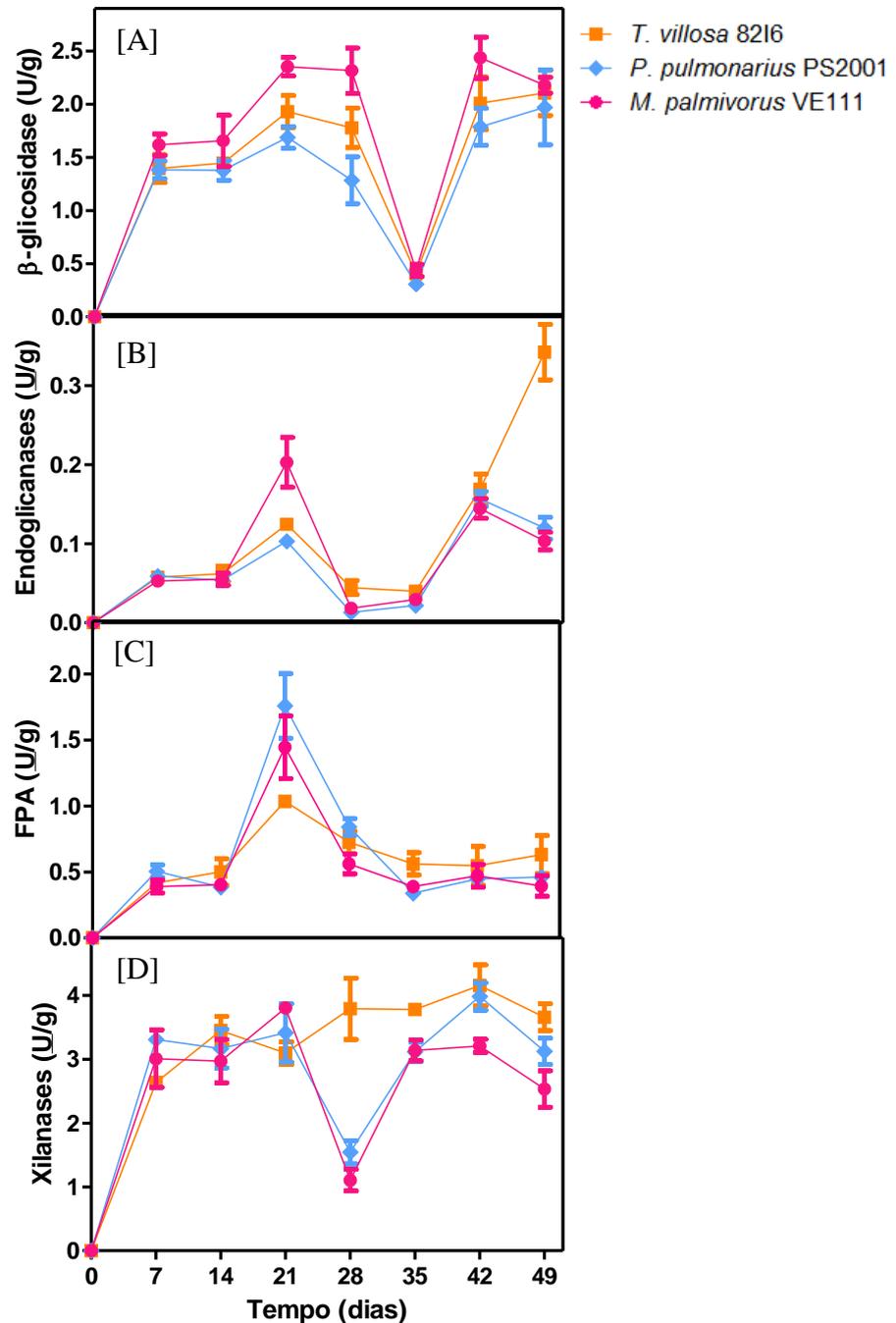


**Figura 18.** Variação da atividade de lacases [A], manganês peroxidases [B] e peroxidases totais [C] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.

Na Figura 19, são mostrados os gráficos de produção de  $\beta$ -glicosidases (Figura 19A), endoglicanases (Figura 19B) FPA (Figura 19C) e xilanases (Figura 19D) pelas espécies de basidiomicetos durante o cultivo em serragem de eucalipto.

A produção de  $\beta$ -glicosidases pelas espécies avaliadas foi baixa ao longo de todo o cultivo. Além disso, os perfis cinéticos de atividade em função do tempo seguiram a mesma

tendência, apresentando valores crescentes até 49 dias de processo, atingindo valores próximos a 2 U/g.



**Figura 19.** Variação da atividade de  $\beta$ -glicosidases [A], endoglicanases [B], FPA [C] e xilanases [D] em função do tempo de cultivo de diferentes basidiomicetos.

As atividades de endoglicanases foram baixas para todas as espécies avaliadas, o que também foi observado em meio composto por bagaço de cana-de-açúcar. *T. villosa* 8216 foi a espécie que produziu maior quantidade desta enzima ( $0,34 \pm 0,0035$  U/g), em 49 dias de

processo. Quanto à FPA, observou-se pico de atividade para todas as espécies em 21 dias de cultivo, sendo *P. pulmonarius* PS2001 a espécie que apresentou maior título enzimático ( $1,7 \pm 0,2$  U/g). Com relação à produção de xilanases, as espécies apresentaram atividades crescentes até o final do cultivo e perfis cinéticos semelhantes, atingindo valores próximos a 3 U/g.

Comparando-se a produção de enzimas por estas espécies de basidiomicetos em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto, observou-se que todas as enzimas quantificadas foram produzidas em quantidades inferiores em meio composto majoritariamente por serragem de eucalipto. Fica evidente que o complexo enzimático produzido, apesar de ser uma característica inerente a cada espécie de microrganismo, é fortemente influenciado pelo meio de cultivo. De acordo com García-Torreiro *et al.* (2016), apesar da composição semelhante, a estrutura da lignocelulose varia de acordo com a espécie, tecido, origem e período de crescimento e esses fatores parecem ter repercussão no metabolismo fúngico.

### 5.2.2 Análise dos componentes químicos da serragem de eucalipto pré-tratada

As análises da composição da serragem de eucalipto antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes espécies de basidiomicetos são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Análises da composição da serragem de eucalipto antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes espécies de basidiomicetos.

Pré-tratamento biológico (PTB)	Perda de massa (%)	Lignina total (%)	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Holocelulose (%)
Controle	-	25,9±0,7	3,6±0,1	22,3±0,8	49,9±4,4
<i>P. pulmonarius</i> PS2001	13,8±2,4	30,8±1,5	8,5±2,0	24,9±2	37,8±4,6
<i>T. villosa</i> 82I6	14,4±2,5	33,7±0,9	8,4±1,2	26,2±3,6	37,4±1,9
<i>M. palmivorus</i> VE111	5,8±2,5	35,1±1,3	7,9±1,8	25,8±1,9	44,3±3,0

*T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 promoveram maior perda de massa total na serragem de eucalipto (respectivamente,  $14,4 \pm 2,5$  e  $13,8 \pm 2,4$ %) do que no bagaço de cana-de-açúcar (respectivamente,  $11 \pm 3,6$  e  $11,5 \pm 2,4$ %). Já a linhagem *M. palmivorus* VE111 provocou menor perda de massa ( $5,8 \pm 2,5$ %) do que a apresentada em bagaço de cana-de-açúcar e, também, entre os microrganismos testados em serragem de eucalipto. A perda de massa foi mais de duas vezes superior em pré-tratamentos realizados com as mesmas linhagens em bagaço de cana-de-açúcar.

Observou-se que todas as espécies testadas promoveram aumento no percentual de

lignina total e de lignina insolúvel e solúvel em ácido, em relação ao controle. Além disso, causaram diminuição no percentual de holocelulose, o que demonstra que esses microrganismos degradaram preferencialmente os polissacarídeos presentes na biomassa.

Foi realizada espectroscopia FTIR das amostras de serragem de eucalipto não tratadas e pré-tratadas, com foco nas faixas correspondentes a lignina, celulose e hemiceluloses. Foram avaliadas as bandas  $1515\text{ cm}^{-1}$  (vibrações do esqueleto aromático da lignina),  $1427\text{ cm}^{-1}$  (núcleos condensados de siringil e guaiacil),  $1375\text{ cm}^{-1}$  (celulose e hemiceluloses),  $1098\text{ cm}^{-1}$  (celulose cristalina) e  $898\text{ cm}^{-1}$  (celulose amorfa). A análise destes espectros em termos de modificações percentuais de cada amostra tratada em relação à amostra controle (sem pré-tratamento) é mostrada na Tabela 5.

Em todas as bandas analisadas após o pré-tratamento foram observadas diminuições, porém, estas foram diferentes para todos os pré-tratamentos biológicos. A banda  $1515\text{ cm}^{-1}$ , referente às vibrações do esqueleto aromático da lignina, foi a que apresentou diminuição mais pronunciada, bem como em pré-tratamentos realizados em bagaço de cana-de-açúcar, sugerindo para todos os pré-tratamentos, remoção de lignina. Reduções na banda  $1427\text{ cm}^{-1}$  (núcleos condensados de siringil e guaiacil) corroboram a sugestão de que houve redução da lignina presente na biomassa. As espécies testadas em serragem promoveram reduções estatisticamente iguais nas bandas referentes à lignina.

**Tabela 5.** Redução em bandas específicas nos espectros FTIR da serragem de eucalipto causado pelo pré-tratamento biológico

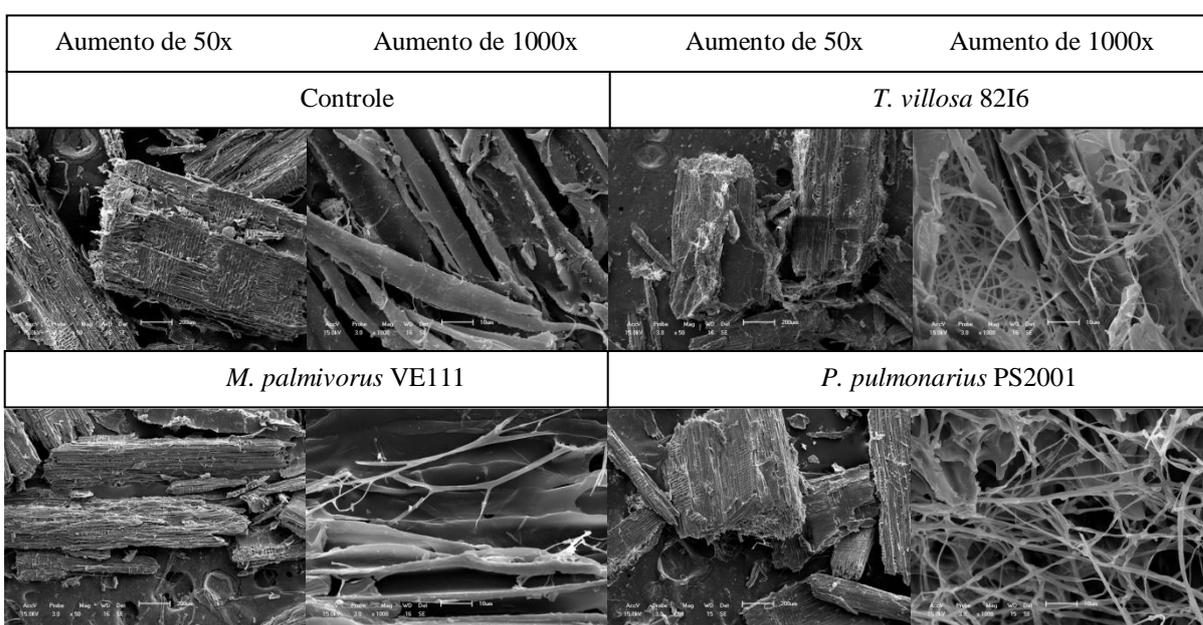
Pré-tratamento biológico (PTB)	Redução percentual em bandas específicas de análise de FTIR				
	$898\text{ cm}^{-1}$ (celulose amorfa)	$1098\text{ cm}^{-1}$ (celulose cristalina)	$1375\text{ cm}^{-1}$ (celulose e hemiceluloses)	$1427\text{ cm}^{-1}$ (núcleos condensados de siringil e guaiacil)	$1515\text{ cm}^{-1}$ (vibrações do esqueleto aromático da lignina)
<i>T. villosa</i> 82I6	$2,1 \pm 0,2^b$	$2,2 \pm 0,3^b$	$6,8 \pm 2,6^b$	$12,5 \pm 8,3^a$	$43,4 \pm 4,3^a$
<i>P. pulmonarius</i> PS2001	$2,0 \pm 1,1^b$	$1,9 \pm 0,5^b$	$4,5 \pm 1,5^b$	$14,2 \pm 2,2^a$	$40,7 \pm 12,0^a$
<i>M. palmivorus</i> VE111	$16,0 \pm 0,7^a$	$16,5 \pm 4,1^a$	$19,7 \pm 1,2^a$	$25,0 \pm 3,9^a$	$32 \pm 18,4^a$

As diminuições nas bandas  $898\text{ cm}^{-1}$  (celulose amorfa) e  $1098\text{ cm}^{-1}$  (celulose cristalina), que se referem à celulose, foram baixas para as espécies *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001. A redução nessas bandas foi especialmente pronunciada em pré-tratamento realizado com *M. palmivorus* VE111, que apresentou valores estatisticamente superiores às outras espécies testadas. Na banda  $1375\text{ cm}^{-1}$  (celulose e hemicelulose),

novamente *M. palmivorus* VE111 promoveu redução estatisticamente superior, enquanto as outras espécies apresentaram baixa redução nesta banda.

Novamente, como em pré-tratamentos realizados em bagaço de cana-de-açúcar pelas espécies *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001, observou-se proporções favoráveis entre o consumo de celulose, hemicelulose e lignina: altas reduções nas bandas referentes à lignina e baixas reduções nas bandas referentes à holocelulose.

A microscopia eletrônica de varredura da serragem de eucalipto foi realizada para verificar as mudanças estruturais causadas após 49 dias de pré-tratamentos biológicos (Figura 20).



**Figura 20.** Microscopia eletrônica de varredura da serragem de eucalipto antes e após 49 dias de pré-tratamento biológico por diferentes basideomicetos.

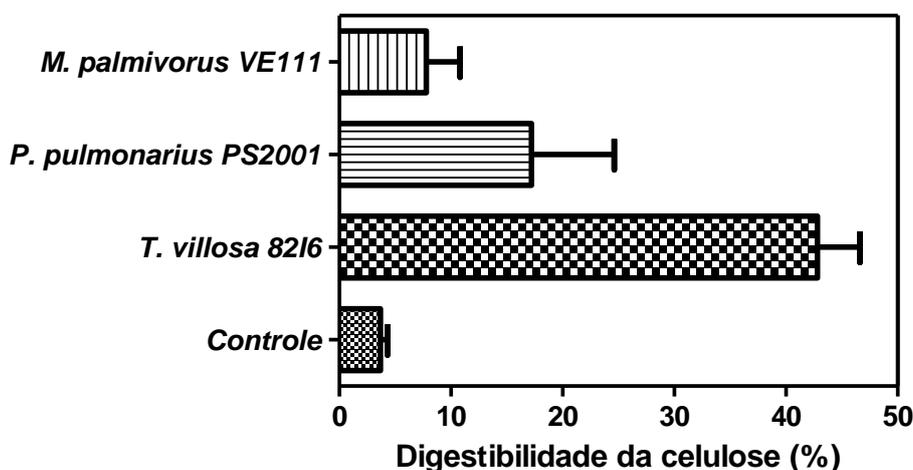
A amostra controle (não tratada) exibiu estruturas ordenadas. Após o pré-tratamento, as estruturas foram modificadas, sendo observada a cobertura da biomassa por micélio fúngico, desprendimento e desorganização das fibras. Em pré-tratamentos com as *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6, observou-se que a serragem de eucalipto foi totalmente envolta pelo micélio fúngico. Em pré-tratamento realizado com *M. palmivorus* VE111 a é possível observar as hifas penetrando na biomassa.

### 5.2.3 Hidrólise enzimática da serragem de eucalipto pré-tratada

A fim de avaliar os efeitos do pré-tratamento na liberação de açúcares durante a hidrólise enzimática, a serragem de eucalipto pré-tratada pelos macromicetos foi utilizada em

etapa de hidrólise. Na Figura 21 é mostrada a digestibilidade da celulose presente na serragem de eucalipto não tratada e após 49 dias de pré-tratamento por diferentes espécies, após 24 horas de hidrólise enzimática.

Apesar do aumento no teor de lignina da biomassa após o pré-tratamento biológico, todas as espécies promoveram aumento na digestibilidade da celulose em relação controle ( $3,7\pm 0,6\%$ ), sendo que *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6 causaram aumento significativo neste parâmetro para, respectivamente,  $17,2\pm 7,4$  e  $42,8\pm 3,8\%$ . Destaca-se que após pré-tratamento com *T. villosa* 82I6 foi possível atingir digestibilidade 10 vezes superior à da serragem de eucalipto sem pré-tratamento.

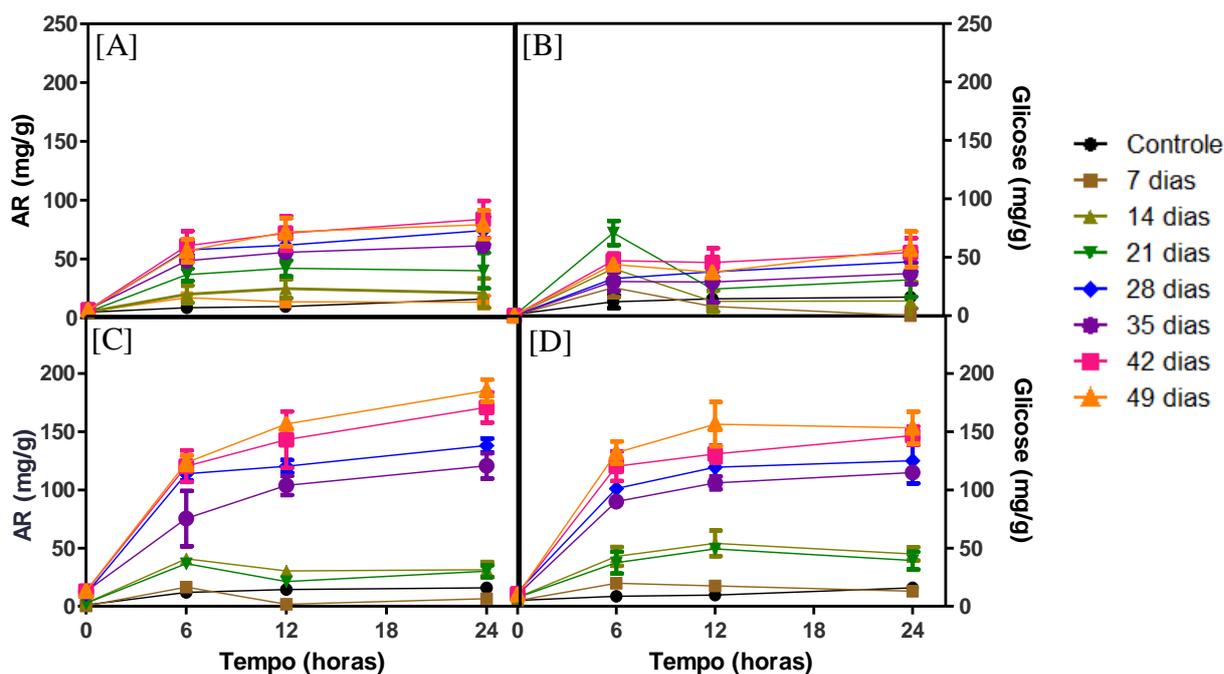


**Figura 21** – Digestibilidade da celulose de serragem de eucalipto pré-tratada por diferentes espécies de basidiomicetos por 49 dias, após processo de 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*).

Na Figura 22, são mostrados os gráficos de liberação de açúcares redutores e de glicose ao longo do tempo de hidrólise enzimática de amostras pré-tratadas por diferentes períodos de tempo – 7 a 49 dias de cultivo. Os gráficos mostrados referem-se aos pré-tratamentos realizados com as espécies que apresentaram digestibilidade significativamente superior ao controle.

Em pré-tratamento realizado com *P. pulmonarius* PS2001, observou-se que a liberação de açúcares redutores (Figura 22A) foi superior ao controle a partir de 14 dias de pré-tratamento e a liberação de glicose (Figura 22B), a partir de 21 dias. Já na hidrólise de biomassa pré-tratada por *T. villosa* 82I6, a obtenção de açúcares redutores (Figura 22C) foi superior ao controle após os primeiros 7 dias de pré-tratamento, enquanto que a formação de glicose (Figura 22D), a partir dos primeiros 14 dias.

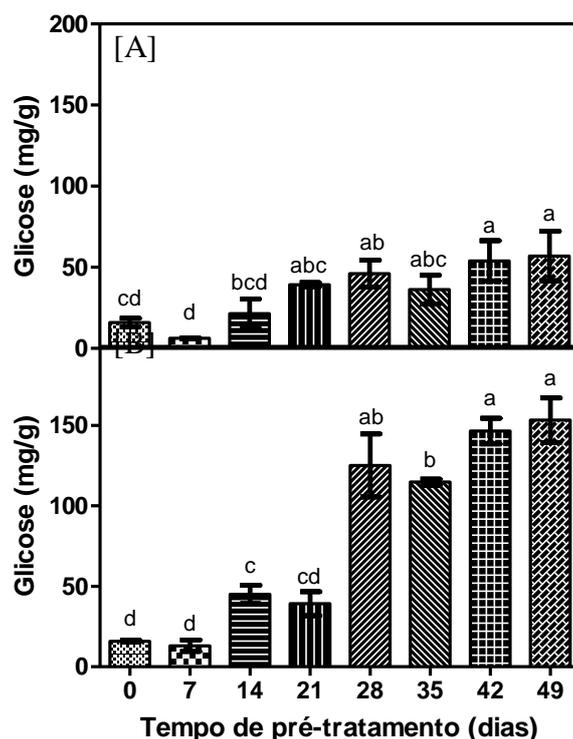
Ressalta-se que após 28 dias de pré-tratamento por *T. villosa* 82I6, a liberação de açúcares foi muito superior ao controle. Ao fim de 24 horas de hidrólise enzimática, a obtenção de glicose a partir de serragem de eucalipto sem pré-tratamento foi de  $15,9 \pm 2,7$  mg/g de biomassa seca, enquanto que após 28, 35, 42 e 49 dias de pré-tratamento, a liberação de glicose aumentou para, respectivamente,  $39,2 \pm 7,4$ ,  $114,4 \pm 1,8$ ,  $146,5 \pm 8,0$  e  $153,2 \pm 13,8$  mg/g.



**Figura 22.** Concentração de açúcares redutores (AR) e glicose liberados durante a hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de serragem de eucalipto, após diferentes tempos de pré-tratamento biológico por [A] e [B] *Pleurotus pulmonarius* PS2001 e [C] e [D] *Trametes villosa* 82I6. Legenda: (●) controle, (■) 7, (▲) 14, (▼) 21, (◆) 28, (◆) 35, (■) 42 e (▲) 49 dias de pré-tratamento.

Na Figura 23 é mostrada análise estatística da liberação de glicose em 24 horas de hidrólise enzimática a partir de amostras pré-tratadas biologicamente por diferentes tempos.

A partir de amostra pré-tratada por *P. pulmonarius* PS2001 foram obtidas quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle em amostras com tempos de pré-tratamento biológico de 28, 42 e 49 dias (respectivamente,  $46, \pm 8,3$ ,  $53,9, \pm 12,5$  e  $56,9 \pm 15,3$  mg/g) (Figura 23A). Já em pré-tratamento com *T. villosa* 82I6, observou-se que amostras com tempos de 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, liberaram quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle (respectivamente,  $44,9 \pm 5,7$ ,  $39,2 \pm 7,4$ ,  $114,4 \pm 1,8$ ,  $146,5 \pm 8,0$  e  $153,2 \pm 13,8$  mg/g) (Figura 23B).



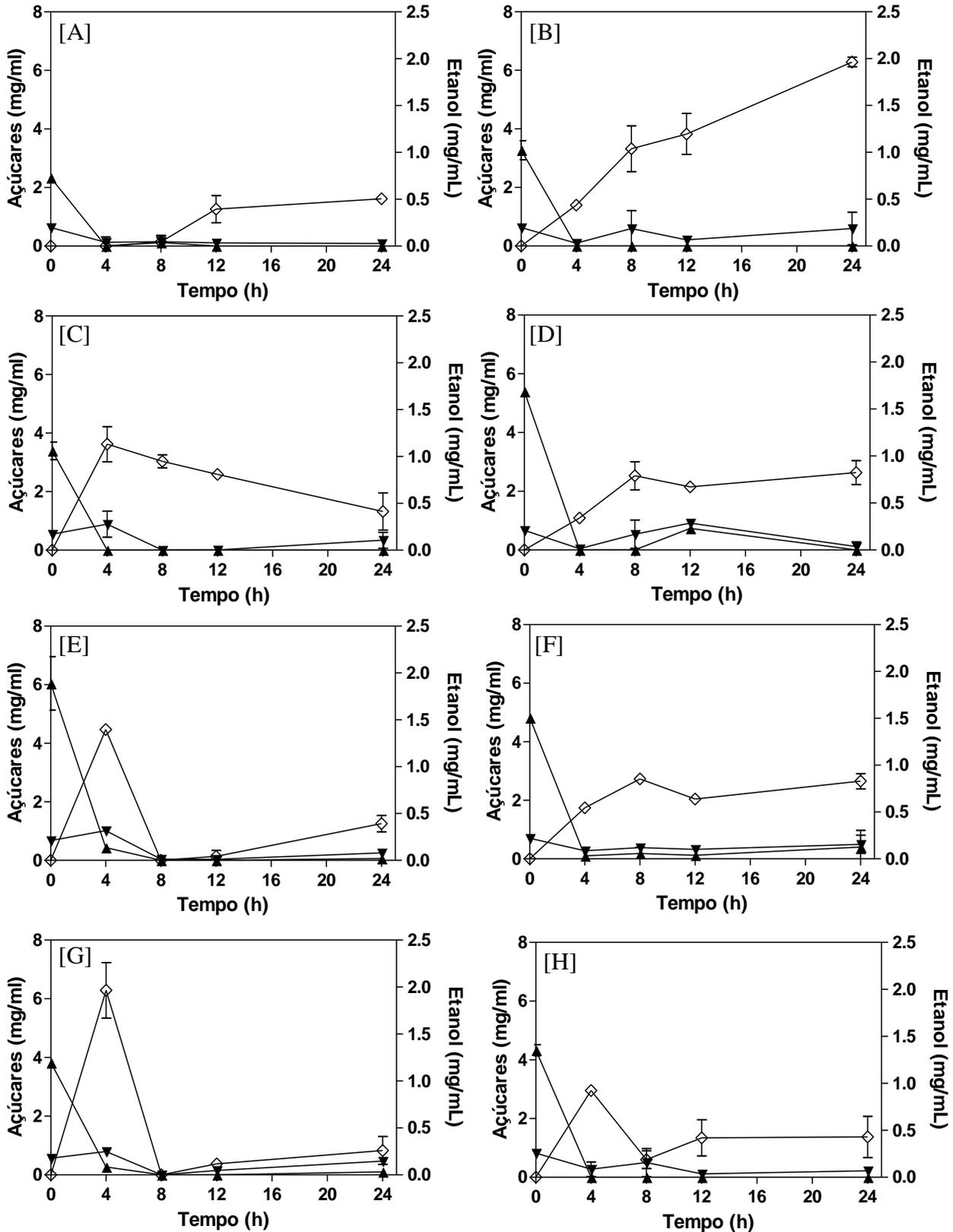
**Figura 23.** Glicose liberada após 24 horas de hidrólise enzimática (complexo enzimático de *P. echinulatum*) de amostras de serragem de eucalipto após diferentes tempos de pré-tratamento biológicos por [A] *Pleurotus pulmonarius* PS2001 e [B] *Trametes villosa* 82I6.

Entre todas as espécies avaliadas, *T. villosa* 82I6 apresentou maior potencial para ser utilizado como agente biológico em pré-tratamento de serragem de eucalipto. Isto porque o pré-tratamento biológico por este basidiomiceto aumentou de forma significativa a liberação de açúcares na etapa de hidrólise enzimática, em períodos de pré-tratamentos inferiores às outras espécies. Comportamento que também foi constatado em testes realizados em bagaço de cana-de-açúcar.

#### 5.2.4 Fermentação alcoólica dos hidrolisados de serragem de eucalipto

Bem como observado em pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar, as amostras de serragem de eucalipto pré-tratadas por *T. villosa* 82I6 também apresentaram melhores resultados na etapa de hidrólise. Desta forma, foi realizada a fermentação dos hidrolisados de amostras pré-tratadas por esta linhagem.

A Figura 24 apresenta as concentrações de açúcares – glicose e xilose – e as concentrações de etanol ao longo de 24 horas de fermentação alcoólica dos hidrolisados de serragem de eucalipto pré-tratada por *T. villosa* 82I6, por diferentes tempos, e da amostra controle (hidrolisado de serragem de eucalipto sem pré-tratamento).



**Figura 24.** Concentração de glicose, xilose e etanol (mg/mL) obtida a partir da fermentação de amostras pré-tratadas por *Trametes villosa* 8216 para 0 [A], 7 [B], 14 [C], 21 [D], 28 [E], 35 [F], 42 [G] e 49 [H] dias. Legenda: (▲) glicose, (▲) xilose e (◇) etanol.

Avaliando-se as amostras pré-tratadas, observou-se que a quantidade inicial de glicose, em todas as amostras pré-tratadas foram superiores ao controle (Figura 24A). Já em relação à xilose, as concentrações iniciais foram semelhantes entre todas as amostras.

Verificou-se que, em todas as condições, o consumo total da glicose ocorreu durante as primeiras 4 horas de fermentação. Os decréscimos nas concentrações de glicose coincidem com os aumentos na concentração de etanol. Quanto aos teores de xilose, estes mantiveram-se constantes ao longo do processo de fermentação em todas as amostras, visto que a levedura utilizada não é capaz de metabolizar este açúcar. Estes perfis de consumo de açúcares e de formação de produto também foram observados em fermentação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *T. villosa* 8216.

Com relação à formação de etanol, a amostra controle (Figura 24A) apresentou perfil de formação de produto crescente, atingindo a máxima concentração de  $0,5 \pm 0,01$  mg/mL em 24 horas de fermentação. O mesmo perfil foi observado para amostra pré-tratada biologicamente por 7 dias, onde atingiu-se concentração máxima de  $2,0 \pm 0,05$  mg/mL em 24 horas de fermentação. Concentração quatro vezes superior à obtida em amostra controle.

Em fermentação de amostras pré-tratadas por 14 e 28 dias observa-se que a concentração máxima de etanol é atingida em 4 horas de processo, e após, mantém-se até o final do processo. Já em fermentação de amostras pré-tratadas por 21, 35, 42 e 49 dias, o pico de etanol se deu em 4 horas de processo e após, há uma queda na concentração de etanol. Isto pode se dar pelo fato de a glicose ter se esgotado nas horas iniciais, o que leva as leveduras a consumirem etanol para manutenção celular (MALESZKA & SCHNEIDER, 1982).

Na Tabela 6 é mostrado o máximo rendimento de biomassa em etanol. A partir de hidrolisado da amostra controle, obteve-se o máximo rendimento de  $6,5 \pm 0,2$  mg/g. Isto é, para cada grama de biomassa utilizado,  $6,5 \pm 0,2$  mg de etanol são obtidos. As amostras pré-tratadas por 7, 14, 28, 42 e 49 dias apresentaram rendimento em etanol estatisticamente superiores ao controle.

A partir desse resultado, percebe-se a influência positiva da realização do pré-tratamento biológico sobre as etapas seguintes do processo. Ressalta-se ainda que, a glicose foi totalmente consumida em todos os casos, demonstrando que após o pré-tratamento e hidrólise, não houve formação de compostos inibidores.

**Tabela 6.** Avaliação dos rendimentos máximos de etanol obtidos pela fermentação - utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 - da glicose liberada na hidrólise de serragem de eucalipto pré-tratada por *Trametes villosa* 82I6 por diferentes períodos de tempo.

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Rendimento em etanol (mg/g)*</b>
Controle	24	6,5±0,2 <sup>d</sup>
Pré-tratada por 7 dias	24	25,5±0,7 <sup>a</sup>
Pré-tratada por 14 dias	4	14,7±2,5 <sup>c</sup>
Pré-tratada por 21 dias	8	10,3±1,9 <sup>cd</sup>
Pré-tratada por 28 dias	4	18,2±0,03 <sup>bc</sup>
Pré-tratada por 35 dias	8	11,1±0,6 <sup>cd</sup>
Pré-tratada por 42 dias	4	25,5±3,8 <sup>ab</sup>
Pré-tratada por 49 dias	4	12,0±0,4 <sup>ab</sup>

\*mg de etanol/g de serragem de eucalipto – rendimento calculado com a máxima produção de etanol.

### 5.3 DISCUSSÃO GERAL

Com relação ao crescimento celular, observou-se que todas as linhagens foram capazes de colonizar ambos os substratos testados. Em pré-tratamento biológico realizado em bagaço de cana-de-açúcar, foram quantificadas altas atividades de enzimas lignolíticas para algumas das linhagens testadas. Com relação à produção de lacases, destacaram-se as linhagens *M. palmivorus* VE111, *P. pulmonarius* PS2001, *P. albidus* 88F-13 e *P. sanguineus* PR32. Quanto às MnPeroxidasas, destacaram-se as linhagens *P. albidus* 88F-13, *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6. Já com relação às peroxidases totais, *M. palmivorus* VE111 e *P. albidus* 88F-13 apresentaram maiores títulos destas enzimas. Já em pré-tratamento biológico realizado em serragem de eucalipto a espécie *P. pulmonarius* PS2001 destacou-se na produção de todas as enzimas em questão. Porém, as atividades das enzimas lignolíticas produzidas por *P. pulmonarius* PS2001, *T. villosa* 82I6 e *M. palmivorus* VE111 em serragem de eucalipto foram inferiores às obtidas pelas mesmas linhagens em bagaço de cana-de-açúcar. Isto demonstrou a influência do meio de cultivo sobre o complexo enzimático produzido por estas espécies e comportamento fúngico distinto entre os diferentes substratos. Quanto às enzimas celulolíticas, as quantidades produzidas em todos os pré-tratamentos não foram relevantes. Ficou evidente que as espécies estudadas apresentam secreção de diferentes complexos enzimáticos, o que resulta em diferenças na degradação dos componentes das biomassas.

Quanto aos efeitos dos pré-tratamentos biológicos sobre os componentes da biomassa, em análise de espectros de FTIR, *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 apresentaram proporções favoráveis entre o consumo de celulose, hemicelulose e lignina em ambas as biomassas testadas, ou seja, apresentaram altas reduções nas bandas referentes à lignina e baixas reduções nas bandas referentes à holocelulose. Ainda, em análise por MEV, em pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com *T. villosa* 82I6, ficou evidente a desorganização na estrutura da biomassa, fissuras e o aumento do tamanho de poros, além da presença de micélio, quando comparado com a amostra controle. Em pré-tratamentos em serragem de eucalipto com *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6, observou-se que a biomassa foi totalmente envolta pelo micélio fúngico.

Em ensaios de hidrólise enzimática, tanto os bagaços de cana-de-açúcar, quanto as serragens de eucalipto, pré-tratados pelas espécies *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6 apresentaram maiores digestibilidades em relação ao controle. Estas espécies foram as que apresentaram as melhores proporções entre consumo da holocelulose e lignina presentes na

biomassa. Entre todas as espécies testadas como agentes biológicos em pré-tratamentos, a que se destacou foi *T. villosa* 82I6, visto que, em ambas as biomassas, foi o basidiomiceto que promoveu o maior aumento na digestibilidade e maior liberação de açúcares na hidrólise em menores tempos de pré-tratamento. Na Tabela 7, são mostrados os principais efeitos de diferentes estratégias de pré-tratamentos biológicos encontrados na literatura em comparação com os dados obtidos em pré-tratamentos realizados no presente trabalho utilizando *T. villosa* 82I6 como agente biológico.

**Tabela 7.** Principais efeitos de diferentes estratégias de PTB encontrados na literatura em comparação com os dados obtidos no presente trabalho.

Biomassa	Agente biológico	Tempo de PTB	Efeitos mais evidentes	Fonte
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trametes villosa</i> 82I6	49 dias	Obtenção de 77 mg de glicose/g de biomassa e digestibilidade de 23%	Presente trabalho
Serragem de eucalipto	<i>Trametes villosa</i> 82I6	49 dias	Obtenção de 153 mg de glicose/g de biomassa e digestibilidade de 42%	Presente trabalho
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Phanerochaete sordid</i> SK-7	20 dias	Obtenção de 65 mg de açúcares redutores/g de biomassa	Jiraprasertwong, Gulari & Chavadej (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	60 dias	Obtenção de 210 mg de glicose/g de biomassa e digestibilidade de 55%	da Silva Machado & Ferraz (2017)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Pleurotus ostreatus</i>	60 dias	Obtenção de 140 mg de glicose/g de biomassa e digestibilidade de 35%	da Silva Machado & Ferraz (2017)
Serragem de <i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus pulmonarius</i>	30 dias	Aumento de 20 vezes na obtenção de açúcares na etapa de hidrólise	Castoldi <i>et al.</i> (2014)
Aparas de Madeira de <i>Pinus strobus</i>	<i>Trametes versicolor</i> MrP1	30 dias	Digestibilidade de 45%	Hwang <i>et al.</i> (2008)
Aparas de madeira de <i>Pinus densiflora</i>	<i>Stereum hirsutum</i>	56 dias	Rendimento de açúcares de 21 %	Lee <i>et al.</i> (2007)

Ressalte-se, ainda, que os efeitos do pré-tratamento biológico por *T. villosa* 82I6 foram mais significativos em serragem de eucalipto do que em bagaço de cana-de-açúcar, visto que aumentou a digestibilidade da celulose presente na serragem para 42%, frente a aumento da digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar para 22%.

Em fermentação alcoólica dos hidrolisados de ambas as biomassas pré-tratadas por *T. villosa* 82I6, por diferentes tempos, observou-se que a quantidade inicial de açúcares, bem como a concentração de etanol alcançada, em todas as amostras pré-tratadas foram superiores ao controle. Observou-se ainda que, o máximo rendimento de etanol (em mg de etanol/g de biomassa) foi aumentado. A glicose foi totalmente consumida em todos os casos, demonstrando que após o pré-tratamento e hidrólise, não houve formação de compostos inibidores.

O longo tempo de pré-tratamento ainda é uma das desvantagens deste método. Possivelmente este parâmetro pode ser diminuído com o aumento da quantidade de inóculo nesta etapa. Porém, vale ressaltar que, em processos produtivos onde há a geração de biomassa lignocelulósica como subproduto, este material acaba sendo armazenado por longos períodos de tempo até que seja destinado de forma correta. Desta forma, a nível industrial, uma maneira de contornar esta desvantagem seria realizar o pré-tratamento durante o período de estocagem do material.

Além disso, em pré-tratamentos em que há a formação de compostos inibidores, há a necessidade de uma etapa de desintoxicação da biomassa para que as fases de hidrólise enzimática e fermentação sejam viáveis. A ausência destas substâncias tóxicas - comumente formadas após alguns tipos de pré-tratamentos - apresenta-se como uma vantagem. Isto porque a ausência destes compostos implica na diminuição de uma etapa do processo produtivo do etanol de segunda geração.

Ainda, durante o pré-tratamento biológico (cultivo sólido), ocorre a produção de diversas enzimas que podem ser extraídas do meio, sendo também um produto de valor, podendo tornar o processo mais vantajoso economicamente.

Por fim, os pré-tratamentos biológicos combinados com outros tipos de pré-tratamentos (físicos, químicos e físico-químicos) têm mostrado muitas vantagens, como aumento nos rendimentos em açúcares e etanol e diminuição na carga de químicos, da demanda energética e da formação de inibidores. Então, a combinação de pré-tratamentos biológicos com pré-tratamentos químicos ou físico-químicos é uma maneira de diminuir o tempo de processo e de abrandar as condições de trabalho dos métodos mais utilizados atualmente, como por exemplo, explosão a vapor.

A partir destes resultados, fica evidente a influência positiva da realização do pré-tratamento biológico sobre as etapas seguintes do processo. Foi demonstrado o potencial do *T. villosa* 82I6 como agente biológico em pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas.

## 6 CONCLUSÕES

Em cultivo sólido, em meio composto majoritariamente por bagaço de cana-de-açúcar, conclui-se que:

- todas as espécies testadas são capazes de colonizar o meio;
- na produção de enzimas lignolíticas destacam-se as linhagens *M. palmivorus* VE111, *P. pulmonarius* PS2001, *P. albidus* 88F-13, *P. sanguineus* PR32 e *T. villosa* 82I6.
- a produção de enzimas celulolíticas não é relevante;
- *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 apresentam altas reduções nas bandas referentes à lignina e baixas reduções nas bandas referentes à holocelulose.
- em análises de MEV, amostra de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *T. villosa* 82I6 apresenta desorganização na estrutura, surgimento de fissuras e o aumento do tamanho de poros, quando comparado com imagem de MEV de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento;
- pré-tratados pelas linhagens *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6 apresentam maiores digestibilidades e obtenção de açúcares na etapa de hidrólise enzimática em relação ao controle.

Em cultivo sólido, em meio composto majoritariamente por serragem de eucalipto, conclui-se que:

- todas as espécies testadas são capazes de colonizar o meio;
- entre as linhagens testadas, na produção de enzimas lignolíticas *P. pulmonarius* PS2001 se destaca;
- as atividades enzimáticas das ligninases são inferiores às obtidas pelas mesmas linhagens testadas em bagaço de cana-de-açúcar;
- a produção de enzimas celulolíticas não é relevante;
- *T. villosa* 82I6 e *P. pulmonarius* PS2001 apresentam altas reduções nas bandas referentes à lignina e baixas reduções nas bandas referentes à holocelulose.
- em análises de MEV, amostras de serragem de eucalipto pré-tratadas por *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6, apresentam-se totalmente envoltas pelo micélio fúngico.
- pré-tratados pelas espécies *P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6 apresentam maiores digestibilidades e obtenção de açúcares na etapa de hidrólise

enzimática, em relação ao controle.

De modo geral, constata-se que:

- somente com base na produção das enzimas avaliadas no presente trabalho não se pode avaliar o potencial de determinada espécie como agente biológico em pré-tratamentos;
- em ensaios de hidrólise enzimática, de ambas as biomassas testadas, àquelas pré-tratadas pelas linhagens que promovem as melhores proporções entre consumo da holocelulose e lignina presentes na biomassa (*P. pulmonarius* PS2001 e *T. villosa* 82I6), apresentam maiores digestibilidades e obtenção de açúcares em relação ao controle;
- na etapa de fermentação alcoólica dos hidrolisados, o máximo rendimento de etanol (em mg de etanol/g de biomassa) é aumentado após o pré-tratamento biológico;
- no pré-tratamento biológico não há formação de compostos inibidores, visto que a glicose é totalmente consumida na etapa da fermentação;
- *T. villosa* 82I6 destaca-se como agente biológico em ambas as biomassas, visto que, este basidiomiceto que promove maior aumento na digestibilidade e maior liberação de açúcares na hidrólise em menores tempos de pré-tratamento;
- os efeitos do pré-tratamento biológico por *T. villosa* 82I6 são mais evidentes em serragem de eucalipto do que em bagaço de cana-de-açúcar;
- a realização do pré-tratamento biológico pode impactar de maneira positiva sobre as etapas seguintes do processo;
- é evidente o potencial do *T. villosa* 82I6 como agente biológico em pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas.

## 7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade do trabalho e desenvolvimento de tecnologias associadas aos dados obtidos, sugere-se:

- utilizando *T. vilosa* 82I6 como agente biológico em pré-tratamentos das biomassas testadas no presente trabalho, avaliar o efeito do aumento da quantidade de inóculo nesta etapa, a fim de diminuir o tempo de processo;
- testar *T. vilosa* 82I6 como agente biológico em pré-tratamentos de outros tipos de biomassas lignocelulósicas;
- realizar testes de pré-tratamento, em meios compostos majoritariamente por serragem de eucalipto ou bagaço de cana-de-açúcar, sem a esterilização das biomassas, a fim de diminuir uma etapa do processo;
- realizar o escalonamento do processo, empregando as condições selecionadas no trabalho;
- realizar pré-tratamento biológico de biomassas por *T. vilosa* 82I6 combinado com outros tipos de pré-tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ACHYUTHAN, K. E., ACHYUTHAN, A. M., ADAMS, P. D., DIRK, S. M., HARPER, J. C., SIMMONS, B. A., & SINGH, A. K. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641-8688, 2010.
- AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., & LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AMIRTA, R., TANABE, T., WATANABE, T., HONDA, Y., KUWAHARA, M., & WATANABE, T. Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 71-77, 2006.
- ASADA, C., ASAKAWA, A., SASAKI, C., & NAKAMURA, Y. Characterization of the steam-exploded spent *Shiitake* mushroom medium and its efficient conversion to ethanol. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 10052-10056, 2011.
- BABA, Y., TANABE, T., SHIRAI, N., WATANABE, T., HONDA, Y., & WATANABE, T. Pretreatment of Japanese cedar wood by white rot fungi and ethanolysis for bioethanol production. **biomass and bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 320-324, 2011.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K.. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BAIOCCO, P., BARRECA, A. M., FABBRINI, M., GALLI, C., & GENTILI, P.. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 1, p. 191-197, 2003.
- BALAN, V., DA COSTA SOUSA, L., CHUNDAWAT, S. P., VISMESH, R., JONES, A. D., & DALE, B. E. Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 293-301, 2008.
- BEZERRA, T. L., & RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2016.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BETTIN, F., DA ROSA, L. O., MONTANARI, Q., CALLONI, R., GAIO, T. A., MALVESSI, E., SILVEIRA, M.M.; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 758-764, 2011.

BINOD, P., JANU, K. U., SINDHU, R., & PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes**, p. 229-250, 2011.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

CAMASSOLA, M. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos e em estado sólido para a hidrólise de lignocelulósicos**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, Brasil.

CAPELARI, M.; ZADRAZIL, F. Lignin degradation and *In vitro* digestibility of wheat straw treated with Brazilian tropical species of white rot fungi. **Folia microbiologica**, v. 42, n. 5, p. 481-487, 1997.

CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., & PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CASTOLDI, R., BRACHT, A., DE MORAIS, G. R., BAESSO, M. L., CORREA, R. C. G., PERALTA, R. A., & PERALTA, R. M. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: study of degradation patterns and saccharification kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240-246, 2014.

CHANDRA, R. P., BURA, R., MABEE, W. E., BERLIN, D. A., PAN, X., & SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. In: **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 67-93.

CHAN, E. S., RUDRAVARAM, R., NARASU, M. L., RAO, L. V., RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 14-32, 2007.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, D. A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. In: **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 67-93.

CHANG, V. S., & HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In: **Twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals**. Humana Press, 2000. p. 5-37.

CHUNDAWAT, S. P., DONOHOE, B. S., DA COSTA SOUSA, L., ELDER, T., AGARWAL, U. P., LU, F., & DALE, B. E. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 3, p. 973-984, 2011.

CIANCHETTA, S.; DI MAGGIO, B., BURZI, P. L., & GALLETTI, S. Evaluation of selected white-rot fungal isolates for improving the sugar yield from wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 609-623, 2014.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira - cana-de-açúcar, v. 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-73, 2017.

ČUČEK, L., MARTÍN, M., GROSSMANN, I. E., & KRAVANJA, Z. Energy, water and process technologies integration for the simultaneous production of ethanol and food from the entire corn plant. **Computers & Chemical Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1547-1557, 2011.

DALE, B. E., & ONG, R. G. Energy, wealth, and human development: why and how biomass pretreatment research must improve. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2012.

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

DAROIT, D. J., SIMONETTI, A., HERTZ, P. F., & BRANDELLI, A. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 933-941, 2008.

DE MORAES ROCHA, G. J.; MARTIN, C., SOARES, I. B., MAIOR, A. M. S., BAUDEL, H. M., & DE ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011

DEMIRBAŞ, A. Estimating of structural composition of wood and non-wood biomass samples. **Energy Sources**, v. 27, n. 8, p. 761-767, 2005.

DHIMAN, S.S.; HAW, J. R., KALYANI, D., KALIA, V. C., KANG, Y. C., & LEE, J. K. . Simultaneous pretreatment and saccharification: Green technology for enhanced sugar yields from biomass using a fungal consortium. **Bioresource technology**, v. 179, p. 50-57, 2015.

DIAS, M. O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROCHA, G. J., PRADELLA, J. G. C., ROSSELL, C. E., FILHO, R. M., BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production?. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 8964-8971, 2011.

DIAS, M. O., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D.,

MANTELATTO, P. E., & BONOMI, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical engineering research and design**, v. 91, n. 8, p. 1411-1417, 2013.

DIAS, M. O., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROSSELL, C. E., & BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

DU, W., YU, H., SONG, L., ZHANG, J., WENG, C., MA, F., & ZHANG, X. The promoting effect of byproducts from *Irpex lacteus* on subsequent enzymatic hydrolysis of bio-pretreated cornstalks. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 37, 2011.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, v.1, 2004. cap. 6, p.215-242.

FERRAZ, A. ; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 641-645, 2000.

FERREIRA, V. F., ROCHA, D. R. D., & SILVA, F. D. C. D. Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FISSORE, A., CARRASCO, L., REYES, P., RODRÍGUEZ, J., FREER, J., & MENDONÇA, R. T. Evaluation of a combined brown rot decay–chemical delignification process as a pretreatment for bioethanol production from *Pinus radiata* wood chips. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 9, p. 893-900, 2010.

FRANKÓ, B., GALBE, M., & WALLBERG, O. Bioethanol production from forestry residues: A comparative techno-economic analysis. **Applied Energy**, v. 184, p. 727-736, 2016.

FRANKOVÁ, L., & FRY, S. C. Biochemistry and physiological roles of enzymes that ‘cut and paste’ plant cell-wall polysaccharides. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 12, p. 3519-3550, 2013.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 618-628, 2002.

GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J., RAMÍREZ, J. A., GARROTE, G., & VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of food engineering**, v. 74, n. 1, p. 78-88, 2006.

GARCÍA-TORREIRO, M., LÓPEZ-ABELAIRAS, M., LU-CHAU, T. A., & LEMA, J. M. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 486-492, 2016.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2,

p. 257-268, 1987.

GILL, P.; ARORA, D. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 28-33, 2003.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., & BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GONCALVES, A. R., ESPOSITO, E., BENAR, P. Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. **Journal of biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 177-185, 1998.

GUI, X., WANG, G., HU, M., & YAN, Y. Combined fungal and mild acid pretreatment of *Glycyrrhiza uralensis* residue for enhancing enzymatic hydrolysis and oil production. **BioResources**, v. 8, n. 4, p. 5485-5499, 2013.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 0, p. 550-567, 2015.

GUPTA, V. K., KUBICEK, C. P., BERRIN, J. G., WILSON, D. W., COUTURIER, M., BERLIN, A., & EZEJI, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. PC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HATAKKA, A. I. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 350-357, 1983.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601-1606, 1998.

HOFSETZ, K., & SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564-573, 2012.

HOFSTRAND, Don. Brazil's ethanol industry. **Ag Decision Maker Newsletter**, v. 13, n. 3, p. 2, 2016.

HWANG, S. S., LEE, S. J., KIM, H. K., KA, J. O., KIM, K. J., & SONG, H. G. Biodegradation and saccharification of wood chips of *Pinus strobus* and *Liriodendron tulipifera* by white rot fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1819-1826, 2008.

ISHIZAWA, C. I., DAVIS, M. F., SCHELL, D. F., & JOHNSON, D. K. Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. **Journal of**

**Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2575-2581, 2007.

ISHOLA, M. M., & TAHERZADEH, M. J. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). **Bioresource technology**, v. 165, p. 9-12, 2014.

ITOH, H., WADA, M., HONDA, Y., KUWAHARA, M., & WATANABE, T. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 273-280, 2003.

JEON, T., JOHNSON, D. K., ADNEY, W. S., & HIMMEL, M. E. Measuring cellulase accessibility of dilute-acid pretreated corn stover. In: **Prepr Symp Am Chem Soc Div Fuel Chem**. 2005. p. 673-674.

JIRAPRASERTWONG, A.; GULARI, E.; CHAVADEJ, S. Effect of Different Microbial Strains on Biological Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enzymatic Hydrolysis. **International Science Index**, v. 9, p. 875-879, 2014.

KADIMALIEV, D. A., REVIN, V. V., ATYKYAN, N. A., & SAMUILOV, V. D. Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 488-492, 2003.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. Wiley, New York, p. 273-307, 1998.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465-501, 1987.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal** v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004.

KOSTIN, A. M., GUILLÉN-GOSÁLBEZ, G., MELE, F. D., BAGAJEWICZ, M. J., & JIMÉNEZ, L. Design and planning of infrastructures for bioethanol and sugar production under demand uncertainty. **chemical engineering research and design**, v. 90, n. 3, p. 359-376, 2012.

KUMAR, R., TABATABAEI, M., KARIMI, K., & SÁRVÁRI HORVÁTH, I. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol-A review. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 347-356, 2016.

KUHAR, S., NAIR, L. M., & KUHAD, R. C. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 305-313, 2008.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of

*Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEE, H. V., HAMID, S. B. A., & ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.  
LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LEE, J., GWAK, K., PARK, J., PARK, M., CHOI, D., KWON, M., & CHOI, I. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. **Journal of Microbiology-Seoul-**, v. 45, n. 6, p. 485, 2007.

LEISOLA, M.; PASTINEN, O.; AXE, D.D. Lignin - Designed Randomness. **Bio-complexity**, v. 2012, 2012.

LEWANDOWSKI, I., SCURLOCK, J. M., LINDVALL, E., & CHRISTOU, M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 4, p. 335-361, 2003.

LI, G., & CHEN, H. Synergistic mechanism of steam explosion combined with fungal treatment by *Phellinus baumii* for the pretreatment of corn stalk. **biomass and bioenergy**, v. 67, p. 1-7, 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIMAYEM, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

LUO, L., VAN DER VOET, E., & HUPPES, G. An energy analysis of ethanol from cellulosic feedstock–Corn stover. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2003-2011, 2009.

LYND, L. R., CUSHMAN, J. H., NICHOLS, R. J., & WYMAN, C. E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323, 1991.

LYND, L. R., LASER, M. S., BRANSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., & WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169, 2008.

MA, F., YANG, N., XU, C., YU, H., WU, J., & ZHANG, X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource technology**, v. 101, n. 24, p. 9600-9604, 2010.

MANAVALAN, T., MANAVALAN, A., & HEESE, K. Characterization of lignocellulolytic

enzymes from white-rot fungi. **Current microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485-498, 2015.

MAURYA, D. P., SINGLA, A., & NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 597-609, 2015.

MEZZOMO, A. G. **Levantamento e seleção de macrofungos (basidiomycota - agaricomycotina) lignolíticos do Parque Estadual de Itapeva, Torres, Rio Grande do Sul**. 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIN, K.L. KIM, Y. H.; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279-286, 2001.

MONRROY, M., IBANEZ, J., MELIN, V., BAEZA, J., MENDONÇA, R. T., CONTRERAS, D., & FREER, J. Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloephyllum trabeum*) and ethanolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 1, p. 11-16, 2010.

MONTEIRO, J. M., VEIGA, L. B. E., & COUTINHO, H. L. C. Sugarcane crop for biofuel production, demand on soil resource and food security in Brazil. In: **19th World congress of soil science, soil solutions for a changing world**. 2010.

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, n. 6, p. 673-686, 2005.

MÜLLER, H. W.; TRÖSCH, W. Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 180-185, 1986.

NAZARPOUR, F., ABDULLAH, D. K., ABDULLAH, N., & ZAMIRI, R. Evaluation of biological pretreatment of rubberwood with white rot fungi for enzymatic hydrolysis. **Materials**, v. 6, n. 5, p. 2059-2073, 2013.

NIGAM, P. S., & SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in energy and combustion science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

NOVELLO, M.; [VILASBOA, J.](#); [SCHNEIDER, W.D. H.](#); REIS, L.; [FONTANA, R. C.](#); CAMASSOLA, M. Enzymes for second generation ethanol: exploring new strategies for the use of xylose. **RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences**, v. 4, p. 21361, 2014.

OLIVA, J. M., SÁEZ, F., BALLESTEROS, I., GONZÁLEZ, A., NEGRO, M. J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast

Kluyveromyces marxianus. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 141, 2003.

OOSHIMA, H., SAKATA, M., & HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 11, p. 1727-1734, 1986.

PACHECO, T. Produção de etanol: primeira ou segunda geração? **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1069-1079, 2005.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., & SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PAWELZIK, P., CARUS, M., HOTCHKISS, J., NARAYAN, R., SELKE, S., WELLISCH, M., & PATEL, M. K. Critical aspects in the life cycle assessment (LCA) of bio-based materials—Reviewing methodologies and deriving recommendations. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 73, p. 211-228, 2013.

PEREZ, V., DE TROYA, M. T., MARTINEZ, A. T., GONZALEZ-VILA, F. J., ARIAS, E., & GONZALEZ, A. E. (1993). In vitro decay of *Aextoxicon punctatum* and *Fagus sylvatica* woods by white and brown-rot fungi. **Wood science and technology**, v. 27, n. 4, p. 295-307, 1993.

POGANIETZ, W.R. Ligno-ethanol in competition with food-based ethanol in Germany. **Biomass and Bioenergy**, v. 38, n. 0, p. 49-57, 2012.

POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 20-33, 2001.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 8, p. 850-871, 2002.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RANGEL, J. HORNUS, M., FELISSIA, F. E., & AREA, M. C. Hydrothermal treatment of eucalyptus sawdust for a forest biorefinery. **Cellul. Chem. Technol**, v. 50, n. 5-6, p. 521-528, 2016.

ROSA, L. O; WASUM, R. A; DILLON, A. J. P. **Macrofungos (Filo Basidiomycota) do Sul do Brasil - Levantamento e Verificação da Capacidade de Secreção de Enzimas Ligninolíticas**. 1ª Ed. Saarbrucken, Deutschland: Novas Edições Acadêmicas, 272p, 2016.

SAHA, B. C., QURESHI, N., KENNEDY, G. J., & COTTA, M. A. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

- SALES-CAMPOS, Ceci; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. **Interciencia**, v. 35, n. 3, p. 198-201, 2010.
- SALVACHÚA, D., PRIETO, A., LÓPEZ-ABELAIRAS, M., LU-CHAU, T., MARTÍNEZ, Á. T., & MARTÍNEZ, M. J. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 16, p. 7500-7506, 2011.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.
- SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.
- SAPARRAT, M. C. N.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1534–1540, 2002.
- SAWADA, T., NAKAMURA, Y., KOBAYASHI, F., KUWAHARA, M., & WATANABE, T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. **Biotechnology and bioengineering**, v. 48, n. 6, p. 719-724, 1995.
- SAWADA, T., NAKAMURA, Y., KOBAYASHI, F., KUWAHARA, M., & WATANABE, T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. **Biotechnology and bioengineering**, v. 48, n. 6, p. 719-724, 1995.
- SCHMIDT, A. S.; THOMSEN, A. B.. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 139-151, 1998.
- SEDIAWAN, W. B., SULISTYO, H., & HIDAYAT, M. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 2062-2067, 2011.
- SHIRKAVAND, E.; BAROUTIAN, S., GAPES, D. J., & YOUNG, B. R.. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 217-234, 2016.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A.. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624-631, 2015.
- SIMS, R. E., MABEE, W., Saddler, J. N., Taylor, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.
- SINDHU, R; BINOD, P; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2015.

SINGH, P.; SUMAN, A.; TIWARI, P.; ARYA, N.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 667-673, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory, **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, v. 1617, 2011.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of ash in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42622, National Renewable Energy Laboratory, **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, v. 1617, 2005.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619, National Renewable Energy Laboratory, **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, v. 1617, 2005.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S., MEDEIROS, A.B.P., KARP, S.G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L.P., PITARELO, A.P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A., BON, E.P.S., MORAES, L.M.P., ARAÚJO, A., TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SONG, L.; YU, H., MA, F., & ZHANG, X. Biological pretreatment under non-sterile conditions for enzymatic hydrolysis of corn stover. **BioResources**, v. 8, n. 3, p. 3802-3816, 2013.

SUHARA, H. KODAMA, S., KAMEI, I., MAEKAWA, N., & MEGURO, S. Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 176-180, 2012.

SUHARDI, V. S. H., PRASAI, B., SAMAHA, D., & BOOPATHY, R. Combined biological and chemical pretreatment method for lignocellulosic ethanol production from energy cane. 2013.

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

TAHA, M., FODA, M., SHAHSAVARI, E. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. **Current opinion in biotechnology**, v. 38, p. 190-197, 2016.

TAHA, M.; SHAHSAVARI, E., AL-HOTHALY, K., MOURADOV, A., SMITH, A. T., BALL, A. S., & ADETUTU, E. M. Enhanced biological straw saccharification through coculturing of lignocellulose-degrading microorganisms. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3709-3728, 2015.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from

lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, Y.; WAHAB, M. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 613-617, 1997.

TANIGUCHI, M., SUZUKI, H., WATANABE, D., SAKAI, K., HOSHINO, K., & TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637-643, 2005.

TANIGUCHI, M., TAKAHASHI, D., WATANABE, D., SAKAI, K., HOSHINO, K., KOUYA, T., & TANAKA, T. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 449-452, 2010.

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 26, n. 74, p. 247-260, 2012.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000.  
WAN, C., & LI, Y. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9788-9793, 2011.

WAN, C., & LI, Y. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6398-6403, 2010.

WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 805-812, 1982.

YANG, H., WANG, K., WANG, W., & SUN, R. C. Improved bioconversion of poplar by synergistic treatments with white-rot fungus *Trametes velutina* D10149 pretreatment and alkaline fractionation. **Bioresource technology**, v. 130, p. 578-583, 2013.

YU, H., ZHANG, X., SONG, L., KE, J., XU, C., DU, W., & ZHANG, J. Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 660-664, 2010.

YU, J., ZHANG, J., HE, J., LIU, Z., & YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 903-908, 2009.

ZHANG, L. H., LI, D., WANG, L. J., WANG, T. P., ZHANG, L., CHEN, X. D., & MAO, Z. H. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8512-8515, 2008.

ZHANG, X., XU, C., & WANG, H. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 149-151, 2007.

ZHAO, J., & XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 2010.

ZHONG, W., YU, H., SONG, L., & ZHANG, X. Combined pretreatment with white-rot fungus and alkali at near room-temperature for improving saccharification of corn stalks. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3440-3451, 2011.

ZHONG, W., YU, H., SONG, L., & ZHANG, X. Combined pretreatment with white-rot fungus and alkali at near room-temperature for improving saccharification of corn stalks. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3440-3451, 2011.