

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali  
utilizando enzimas microbianas comerciais**

**Vivian Cristina Pietrobon**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vivian Cristina Pietrobon  
Engenheira Agrônoma

**Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas  
microbianas comerciais**

Orientadora:  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2008**

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

Pietrobon, Vivian Cristina

Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais / Vivian Cristina Pietrobon. - - Piracicaba, 2008.  
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.  
Bibliografia.

1. Açúcares 2. Bagaços 3. Cana-de-açúcar 4. Enzimas celulolíticas 5. Hidrólise I. Título

CDD 576.119254  
P626h

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

*Ofereço:*

*A Deus e ao meu mentor espiritual por sempre estarem ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades.*

*Dedico:*

*Aos meus pais Valdir e Cleusa,  
ao meu irmão Rodrigo e à minha cunhada Flávia  
pelo amor, carinho e paciência durante todos esses anos.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de participar do curso de pós-graduação em Agronomia.

À coordenação do programa de pós-graduação da Microbiologia Agrícola.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, pela grande amizade, orientação, estímulo e incentivo à conclusão deste trabalho, compreensão e agradável convivência durante esses dois anos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa AB enzymes, pela doação das enzimas utilizadas nesse projeto.

À empresa Fermentec Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica Ltda. e ao Dr. Henrique Vianna de Amorim, pelo auxílio financeiro e técnico desse projeto de pesquisa e pela confiança.

Ao pesquisador Dr. Eduardo Poggi e Borges, e ao coordenador científico Dr. Mário Lúcio Lopes, pelo auxílio na condução dos experimentos, sugestões, conhecimentos transmitidos e amizade.

À técnica Maria Eliete Ramos de Moraes, pelo auxílio, conhecimentos transmitidos e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Helena da Cruz, pelos conhecimentos transmitidos e pela ajuda nos experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina Nogueira Stolf e ao Prof. Dr. Décio Barbin, pela ajuda com as análises estatísticas dos experimentos.

Ao Dr. Lydio de Nascimento Dutra, por toda ajuda fornecida a mim e a toda minha família durante esses anos de tratamento. Obrigada pela amizade e por me mostrar uma nova forma de viver!

Aos meus pais Valdir e Cleusa, ao meu irmão Rodrigo e à minha cunhada Flávia, pelo amor, carinho e por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

A Deus, pela minha vida.

Aos amigos do laboratório: Laise, Tâmara, Mário, Luis Fernando, Cristiane, Milena, Nuno, Gabriela, Maria Alice, Maria Júlia, Rosângela e Geórgia, por toda ajuda oferecida durante o mestrado.

Aos amigos: Laise e Laurisa Wadt, Tâmara Messias, Milena Falqueto, Raphaelle Dalla Vale, Maristela Minatel, Cristina Lourenço, Flávia Quaino, Cristiano Silva, Luana Erlo, Paula Porrelli, Dinailson Campos, Vanessa Costa, Marta Moraes, Claudio Rafael Alves, Valmir Loyola, Denise Machado, Ligia Domingos, Kátia Canale, Anna Carolina de Luca, André Signoretti, Edinéia Gomes, Vivian e Viviane Pandorfi e Felipe Assarisse, pela convivência, conhecimento e amizade durante esses últimos anos.

A um amigo, com o qual tive a oportunidade de conviver e aprender a ser uma pessoa mais forte, a dar o rumo para minha vida e a lutar para conquistar meus sonhos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente ao desenvolvimento do trabalho.

*“Quando se semeia um pensamento, colhe-se uma ação.  
Quando se colhe uma ação, planta-se um hábito.  
Quando se planta um hábito, colhe-se um caráter.  
Quando se planta um caráter, colhe-se o destino.”*

*(Yogi Raman – O Monge que vendeu sua Ferrari)*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA .....	15
2.1 Enzimas microbianas.....	15
2.2 Extração e Purificação de enzimas .....	17
2.3 Transformação genética de fungos para obtenção de enzimas.....	19
2.4 Fungos lignocelulolíticos.....	20
2.5 Composição da biomassa lignocelulolítica.....	21
2.6 Biodegradação da celulose .....	22
2.7 Complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i> .....	25
2.8 Hidrólise de materiais lignocelulolíticos .....	26
2.9 Características do bagaço de cana-de-açúcar .....	30
2.10 Obtenção de açúcares .....	31
2.11 Etanol e meio ambiente .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Enzimas comerciais .....	34
3.2 Determinação da atividade enzimática .....	35
3.3 Reagentes e soluções .....	37
3.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar .....	37
3.5 Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose.....	37
3.6 Sacarificação enzimática .....	38
3.7 Determinação de açúcares totais (DNS).....	38
3.8 Determinação e identificação de açúcares por cromatografia líquida.....	39
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Determinação da atividade celulolítica total .....	39
4.2 Análise dos teores de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.....	41

4.3 Determinação de açúcares no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por DNS.....	42
4.4 Determinação e identificação de açúcares no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por HPAEC .....	46
4.5 Comparação da quantificação de açúcares totais pelas metodologias HPAEC e DNS.....	51
5 CONCLUSÃO .....	53
REFERÊNCIAS .....	54
ANEXOS.....	62

## RESUMO

### **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**

O álcool, considerado um subproduto de grande importância da cultura de cana-de-açúcar, tem apresentado grande interesse nos últimos anos devido a questões econômicas e ambientais. A estimativa de produção para a safra 2007-2008, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), é de 251,59 milhões de toneladas de álcool. Por ser considerada uma fonte de energia alternativa (em substituição aos combustíveis fósseis) e renovável, muitos estudos estão sendo direcionados à cultura da cana-de-açúcar como, por exemplo, o aproveitamento do bagaço considerado um resíduo do setor sucroalcooleiro. O intuito deste trabalho foi o de realizar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por meio de enzimas celulolíticas comerciais visando identificar e quantificar açúcares fermentescíveis. Com essa finalidade, primeiramente, foram selecionadas as seguintes enzimas comerciais HPL1800, CL3708, P1250 e P4500; as quais apresentaram maior atividade celulolítica total em papel de filtro. Posteriormente foram testados dois pré-tratamentos do bagaço (ácido ou alcalino) e verificadas a atuação dessas enzimas em cada pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar pelas metodologias do ácido dinitrosalicílico (DNS) e da cromatografia líquida (HPAEC - PAD). Os dados obtidos por ambas as metodologias foram analisados estatisticamente e concluiu-se que a ação conjunta do pré-tratamento ácido 0,5%, autoclave a 121°C por 30 minutos e a enzima P4500 foram as melhores formas de tratamento para a obtenção de açúcares.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, Enzimas comerciais, DNS, HPAEC-PAD, Açúcares totais

## ABSTRACT

### **Sugar cane bagasse hydrolysis with acid and alkali pre-treatment using commercial microbial enzymes**

Ethanol is considered an important by-product from sugar cane culture. Nowadays it has been shown great importance in economics and environmental questions. The estimate ethanol production 2007-2008 is about 251.59 millions of tons, according to Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Alcohol is considered an alternative and renewable source of energy; this has lead several new studies on development of sugarcane culture and its derivatives, such as bagasse which is considered a residue from sugarcane industry. The aim of this research is the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for sugar production and its quantification and identification. The first step consisted at the selection of higher cellulolytic activity commercial enzymes in filter paper. The four enzymes selected were: HPL1800, CL3708, P1250 and P4500. After that, their performances were tested with two different pre-treated (acid and alkali) bagasse. The total sugars presents in the hydrolyzed were measured by dinitrosalicilic acid (DNS) and liquid chromatography (HPAEC - PAD) methodologies. The results were analyzed with statistics program. The datelines showed that joint action of 0.5% acid pre-treatment, 121°C per 30 minutes and enzyme P4500 were the best treatment to sugars attainment.

Key-words: Sugar cane bagasse, Commercial enzymes, DNS, HPAEC - PAD, Total sugars

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Quantidade de açúcares liberados de acordo com as absorvâncias obtidas a partir da solução padrão de glicose 1% .....36
- Figura 2 - Ação de diferentes enzimas sobre os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância).....44
- Figura 3 - Ação conjunta das enzimas e dos diferentes pré-tratamentos sobre o bagaço de cana-de-açúcar (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância).....45
- Figura 4 - Porcentagem de açúcares totais, pentoses e hexoses presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em cada tratamento com ácido, base e enzima.....49
- Figura 5 - Pentoses e hexoses ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos diferentes tratamentos com ácido, base e enzimas no bagaço .....50
- Figura 6 - Comparação das metodologias DNS e HPAEC na avaliação de açúcares liberados ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) .....52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tampões de extração .....	18
Tabela 2 - Enzimas comerciais utilizadas, microrganismos de origem e pH ótimo de atividade .	35
Tabela 3 - Concentração das enzimas e concentração média de açúcares totais liberados nas duas diluições de cada enzima visando obter a concentração necessária para a liberação de, aproximadamente, 2 mg de açúcares por 0,5 mL de solução .....	40
Tabela 4 - Concentração das enzimas necessária para a liberação de 2 mg 0,5mL <sup>-1</sup> de açúcares totais e atividade de cada enzima (FPU).....	41
Tabela 5 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar sem e com pré-tratamento, alcalino ou ácido em porcentagem da matéria seca .....	42
Tabela 6 - Concentrações e atividades das enzimas; concentração média de açúcares e desvio padrão, liberados de acordo com o pré-tratamento ácido ou básico, seguido de autoclave 121°C por 30 minutos.....	43
Tabela 7 - Concentrações e atividades das enzimas; concentração média de açúcares e desvio padrão, liberados de acordo com a ação conjunta das enzimas e pré-tratamento ácido ou básico, seguido de autoclave 121°C por 30 minutos .....	45
Tabela 8 - Média e desvio padrão dos açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose; hexoses (C6); pentoses (C5) e açúcares totais presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar determinado por cromatografia líquida .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil e, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a estimativa da produção nacional destinada à indústria para a safra 2007-2008 é de 475,07 milhões de toneladas, superando a produção da safra passada em 10,62%. Do total, 47% (223,48 milhões de toneladas) são destinadas à fabricação de açúcar e 53% (251,59 milhões de toneladas) à produção de álcool (BRASIL, 2007).

Dentre os subprodutos da produção de açúcar e álcool destacam-se o bagaço, a vinhaça, a torta de filtro e a levedura. Esses subprodutos vêm sendo reutilizados visando reduzir custos de produção ou até mesmo comercializados com outros setores industriais.

O bagaço excedente das destilarias (cerca de 30%) e das usinas (cerca de 10%) é utilizado como fonte energética em várias indústrias de diferentes setores. Uma tonelada de cana resulta em: 560.000 kcal, provenientes de 250 kg de bagaço úmido; 392.000 kcal, provenientes dos 70 litros de álcool e 60.000 kcal dos 11.830 litros de biogás obtidos da biodigestão da vinhaça. Através desses dados pode-se dizer que há mais energia na cana-de-açúcar e seus derivados do que se pode conseguir com o álcool isoladamente (CORTEZ et al., 1992).

A cana-de-açúcar é composta por: 12-18% de açúcar; 12-14% de fibras (sem computar os resíduos de colheita); 0,1-0,3% de cera e 2-3% de cinzas. Já o bagaço é constituído por 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina, 3,22-5,5% de cinza, 0,10-0,15% de enxofre, 0,73-0,97% de potássio (BANERJEE et al., 2002).

O bagaço, através de processos biotecnológicos, também pode ser utilizado para a produção do etanol e proteína enriquecida (utilizada na formulação de rações de gado). Para a produção de etanol é necessário utilizar grande quantidade de bagaço. As etapas envolvidas nesse processo consistem em hidrólise seguida de fermentação. Essa hidrólise é realizada por sacarificação enzimática.

Atualmente é de grande interesse de vários países (Brasil, Estados Unidos, Canadá e outros) o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, considerados hoje como resíduos do setor sucroalcooleiro. Através dessa nova tecnologia será possível aumentar a produção de etanol em até 30% sem promover um aumento na área plantada de cana-de-açúcar (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006).

A hidrólise com ácido concentrado é um método rápido e bem conhecido, no entanto, para o desenvolvimento do processo, é necessário: a utilização de materiais resistentes à corrosão, os quais tendem a ter um custo elevado; reutilização do ácido, para tornar o projeto economicamente viável; neutralizar e retirar os compostos fenólicos do hidrolisado. A sacarificação enzimática torna-se um procedimento com maiores vantagens sobre a hidrólise ácida, pois com a diminuição no consumo do ácido é possível ter benefícios tanto econômicos, quanto ambientais (MARTÍN et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo a seleção de enzimas celulolíticas purificadas e disponíveis no mercado por meio da determinação da atividade celulolítica total, utilizando como substrato o papel de filtro. Posteriormente, as melhores enzimas selecionadas foram verificadas quanto sua eficiência no processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, com determinação e identificação dos açúcares totais pelas metodologias de ácido dinitrosalicílico (DNS) e cromatografia líquida (HPAEC), respectivamente.



## 2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

### 2.1 Enzimas microbianas

O crescimento da tecnologia de produção de enzimas teve início em 1833 quando os químicos franceses Anselme Payen e Jean-Francois Persoz descreveram o complexo enzimático de amilase de cevada germinante, denominada diastase. Após várias pesquisas, novas enzimas foram descobertas como: isolamento da pepsina (responsável pela digestão da albumina) pelo fisiologista alemão Theodor Schwann (1836); a padronização das enzimas voltadas para uma aplicação tecnológica (produção de queijo) por Christian Hansen (1874); enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcar (1894); início da produção comercial de koji que são utilizados na produção de alguns gêneros alimentícios e aditivos aromatizantes (koji é produzido a partir do fungo *Aspergillus oryzae*) (1894); extração da enzima zimase pelos irmãos Eduard e Hans Buchner comprovando que um extrato livre de células de leveduras poderia causar a fermentação alcoólica (1897); proteinases pancreáticas (1907), enzimas proteolíticas utilizadas na indústria de cerveja (1911); enzimas bacterianas utilizadas na indústria têxtil (1917); tripsina e pepsina (1950); malte e amilase (1900); papaína (1950); proteinase de *Bacillus* (1950); isomerase de glicose (1976); amilases de fungos (1900); pectinase (1950) e outros (GACESA; HUBBLE, 1987; AMORIM, 2005).

No começo de 1970 a tecnologia de enzimas passou para a produção em larga escala com o desenvolvimento dos processos de produção de aminoácidos e glicose isomerase industrial. De acordo com Gacesa e Hubble (1987), o mercado Europeu e Americano eram dominados pela produção de proteinases utilizadas na indústria de detergentes, no entanto o mercado de produção de enzimas voltado para a indústria de alimentos mostrou ter um maior aumento. Durante o ano de 1970 o mercado de produção de enzimas apresentou um elevado crescimento, com o desenvolvimento de grande volume de usuários na indústria de alimentos.

Os microrganismos produzem uma elevada gama de enzimas de grande utilidade industrial. Além de apresentarem uma rapidez e facilidade de crescimento em meios de cultivos específicos, a tecnologia de produção em grande escala já se encontra bem estabelecida (GACESA; HUBBLE, 1987).

A produção de enzimas pode ser extracelular ou intracelular, no entanto a produção

extracelular apresenta como vantagens a não necessidade de promover a quebra da célula, técnica difícil de ser realizada na produção em grande escala. Outra vantagem seria que apenas um número limitado de proteína é secretado facilitando o isolamento da enzima desejada. No caso de enzimas intracelulares, o processo de isolamento torna-se mais oneroso devido à presença de proteínas e materiais contaminantes, como os ácidos nucléicos. Também deve ser ressaltado que as enzimas extracelulares apresentam uma estrutura mais robusta em relação às intracelulares, além de serem menos susceptíveis as desnaturações (GACESA; HUBBLE, 1987; HOLLAND et al., 1986).

De acordo com Priest (1983) as enzimas extracelulares podem ser induzidas, parcialmente induzidas ou constitutivas (quando a enzima é produzida constantemente, sob qualquer condição fisiológica). No caso das enzimas extracelulares, uma pequena quantidade similar a enzima em questão já existe previamente. Essas enzimas promovem a hidrólise de moléculas poliméricas, as quais são muito grandes para entrarem na célula diretamente gerando, assim, compostos de baixo peso molecular. Esses compostos são capazes de entrar na célula e induzir a produção da enzima. Como exemplo desse mecanismo pode ser citado a síntese do complexo enzimático da celulase por *Trichoderma viride*, o qual é induzido por celulose, porém a celobiose e celobiopentaose são considerados indutores pobres. Já a sofrorose ( $\beta$ -1,2 dissacarídeo de glicose) apresenta uma hidrólise mais lenta e é considerado um efetivo indutor do complexo enzimático das celulasas (MANDELS et al., 1962).

Gacesa e Hubble (1987) comentam que, indiferentemente da enzima ser constitutiva ou induzida, existe um mecanismo de controle que opera reprimindo a síntese de várias enzimas caso, no meio de cultivo em que o microrganismo se encontre, ocorram a presença de fonte de carbono prontamente assimilável. Com isso o microrganismo pode utilizar o composto necessário sem promover dispêndio de energia para a produção de enzimas que seriam utilizadas para degradar fontes de carbono mais complexas. A repressão catabólica é uma característica comum dos microrganismos, e que é capaz de afetar muitas enzimas.

Outra forma de repressão das enzimas é citada por Priest (1983), na qual a síntese de enzimas biosintéticas endocelulares controla a produção de enzimas extracelulares. Como exemplo, Priest (1983), comenta a secreção da enzima constitutiva protease sendo reprimida por uma combinação de aminoácidos.

## 2.2 Extração e Purificação de enzimas

As enzimas apresentam um processo de isolamento e purificação diferenciado entre si, mesmo assim são poucas as técnicas disponíveis. No entanto, por meio da utilização e exploração dessas técnicas, tem sido possível isolar enzimas puras ou quase puras. Algumas técnicas utilizadas para o isolamento de proteínas também promovem uma purificação satisfatória de enzimas (GACESA; HUBBLE, 1987).

O processo de extração de algumas enzimas hidrolíticas, de origem microbiana, envolve apenas a centrifugação do meio de cultura para a remoção das células microbianas. Esse é o caso de muitas bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas, devido à presença da membrana externa, a qual pode dificultar ou liberar apenas uma porção da enzima de interesse no meio de cultivo (GACESA; HUBBLE, 1987).

No caso dos microrganismos eucariotos, a enzima geralmente localiza-se fora da membrana celular, mas não no meio de cultura; para a sua obtenção torna-se necessário promover a destruição (parcial ou total) da célula microbiana. Gacesa e Hubble (1987) comentam que as extrações de enzimas intracelulares tendem a ser um processo mais complexo devido à necessidade de promover a lise da célula por meio de técnicas de rompimento mecânico, sonicação, choque osmótico e tratamentos com detergentes.

Alguns parâmetros como pH (potencial hidrogeniônico), força iônica e a composição do meio que é utilizado para a extração de enzimas, devem ser monitorados para se ter uma boa extração e purificação das mesmas. Alguns tampões de extração também são utilizados para evitar a desnaturação ou degradação da enzima de interesse (Tabela 1).

Tabela 1 - Tampões de extração

Exemplo de tampões	Usos
Ditiotreitol	Protege o sítio ativo do grupo sulfidril de oxidação.
EDTA/ EGTA	Quelatos de cátions, particularmente metais pesados. EGTA é específico para $\text{Ca}^{+2}$ .
Tween 20	Solubilização das proteínas da membrana ou rompimento das vesículas.
Substratos/ inibidores competitivos	Geralmente ajuda a estabilizar a enzima contra inativação por temperatura ou extremos de pH.
Polivinilpirolidone	Compostos reativos utilizados para extração a partir de plantas.
EDTA/ reagentes alcalinizantes	Inibidores da degradação de enzimas como proteinases e certas glicosidases.

Modificado a partir de Gacesa e Hubble (1987)

Após a extração de enzimas é necessário realizar sua purificação, pois a mesma encontra-se contaminada com muitos outros componentes que constituem a célula microbiana, esses componentes devem ser reconhecidos para só então serem determinados os estágios da etapa de purificação. Os estágios iniciais do processo de purificação são caracterizados por conseguirem remover a maior quantidade de contaminantes possível, de forma facilitada e custo reduzido. Gacesa e Hubble (1987) comentam alguns métodos de purificação como: fracionamento, cromatografia de troca iônica, “cromatofocusing”, cromatografia de permeação em gel, cromatografia de afinidade, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC).

No caso de lípases, o processo de purificação envolve três tipos de colunas

cromatográficas: coluna de troca iônica, coluna de interação hidrofóbica, e coluna de permeação em gel. Koblitz e Pastore (2004) relatam que colunas de bioafinidade e de adsorção específica também podem ser utilizadas.

A purificação em larga-escala pode ser realizada através de adaptações da metodologia utilizada em laboratório; no entanto, problemas de engenharia extremamente importantes são observados como fluxo do líquido, transferência de massa e de calor (GACESA; HUBBLE, 1987).

De acordo com Kroner a metodologia apropriada para a produção em larga-escala seria o sistema de extração líquida em fase aquosa. Essa técnica possibilita a remoção de contaminantes (proteínas, restos de célula, ácido nucléico e polissacarídeos) sem a necessidade de equipamentos de centrifugação e filtração. Em alguns casos esse sistema elimina a necessidade de diferentes colunas na etapa da cromatografia, porém ainda acaba sendo necessário realizar a concentração da enzima (GACESA; HUBBLE, 1987).

### **2.3 Transformação genética de fungos para obtenção de enzimas**

A utilização de fungos na biologia molecular iniciou-se em 1978, com a transformação de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e, posteriormente, do fungo *Neurospora crassa*. Atualmente, nos processos de transformação, não se utiliza mais o DNA isolado, mas sim plasmídeos com o DNA de fungos. De acordo com Azevedo et al. (2004) as etapas do processo de transformação compreendem a extração do DNA da célula doadora, construção de vetores e plasmídeos com o DNA de interesse, clonagem desses plasmídeos e a preparação das células receptoras. Para que a transformação apresente resultados esperados é necessário que a célula receptora se encontre em um estado de competência, o qual pode ser conseguido através de determinadas substâncias químicas como acetato de lítio para leveduras, com esporos de alguns fungos filamentosos ou protoplastizando as células de fungos filamentosos. A utilização do plasmídeo Ti (tumor induzido) da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* também pode ser utilizada na transformação de fungos. Essa forma de transformação já foi utilizada no cogumelo comestível *Agaricus bisporus*.

Azevedo et al. (2004) também mencionam a biobalística ou biolística como um método de transformação de fungos. Essa técnica consiste na introdução do DNA exógeno, o qual se

encontra adsorvido as micropartículas de ouro ou tungstênio, sob alta velocidade. Uma vez que o DNA exógeno se encontre dentro da célula alvo, ele pode ser incorporado ao material genético do hospedeiro.

O DNA exógeno, ao penetrar na célula hospedeira, apresenta três destinos: pode ser integrado ao cromossomo do fungo em local de homologia (integração homóloga); pode substituir o gene homólogo no fungo por permutação (substituição) ou pode ser inserido em outro local do genoma sem ser a região homóloga (integração heteróloga) (AZEVEDO et al., 2004).

Na União Européia já existem alguns microrganismos geneticamente modificados, cuja comercialização já foi aprovada por órgãos competentes como: vírus geneticamente modificado da pseudo-raiva (estirpe Begonia) - contra a doença Aujeszky em suínos; *Streptococcus thermophilus* geneticamente modificado exprimindo o codão *cat* para a resistência ao clorofenicol e possuindo os genes *lux A* e *lux B* (FERNANDES, 2001).

Duarte et al. (2003) também cita alguns exemplos de aplicações industriais de microrganismos geneticamente modificados como: lípases produzidas pelo fungo modificado *Aspergillus oyizae*; clonagem do gene da quimosina de vitelos na levedura *Kluyveromyces lactis*; utilização de um biosensor (microrganismos detectores de um determinado composto ou grupo de compostos químicos) através da estirpe modificada *Escherichia coli* AW101; linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* que sofreu uma modificação visando destruir o seu próprio DNA quando o substrato é esgotado e outros.

## 2.4 Fungos lignocelulolíticos

Dentre os microrganismos mais efetivos na biotransformação de materiais lignocelulósicos podemos encontrar os fungos de decomposição branca (responsáveis pela degradação dos componentes da madeira) e os de decomposição parda (promovem a degradação de polissacarídeos principalmente). A grande maioria desses microrganismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branda, ou seja, promovem a degradação da lignina e polissacarídeos em velocidades muito baixas (KIRK; CULLEN, 1998; RODRIGUEZ et al., 1997; FERRAZ et al., 1991).

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

Ferraz (2004) relata que a biodegradação dos materiais lignocelulósicos por fungos ocorre devido a uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar extracelulares. No início do processo de degradação os lignocelulósicos sofrem uma despolimerização e transformam-se em compostos menores; sendo esses compostos susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos.

Para iniciar a degradação dos materiais lignocelulósicos, os fungos promovem a penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais. Essas hifas têm por finalidade a produção de grande diversidade de metabólitos extracelulares, os quais atuam na degradação da parede celular vegetal (FERRAZ, 2004).

## **2.5 Composição da biomassa lignocelulolítica**

Os materiais lignocelulósicos são compostos, basicamente, de celulose, hemicelulose e lignina. No caso do bagaço de cana-de-açúcar encontramos 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose e 23-32% de lignina (BANERJEE; PANDEY, 2002).

A lignina é uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos. Devido ao mecanismo de biossíntese da lignina, o acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de maneira irregular e não repetitiva. Vários tipos de ligação entre as unidades de fenilpropano são observados como:  $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4 (50-65%),  $\beta$ -5 (6-15%),  $\beta$ -1(9-15%), 5-5(2-9%) e  $\beta$ - $\beta$  (2-5%) (AZEVEDO, 2004).

A hemicelulose é formada por cadeias de açúcares curtas, lineares e altamente ramificada. Em contraste a celulose (polímero formado por apenas glicose), a hemicelulose é um polímero heterogêneo formado por D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-manose e L-arabinose (CHANDEL et al., 2007).

## 2.6 Biodegradação da celulose

A celulose (um polissacarídeo estrutural) é o principal componente das plantas superiores; sua função é dar proteção, forma e suporte as células vegetais. Smith et al. (1983) e Lehninger (1991) comentam, de forma simplificada, a conversão enzimática da celulose para glicose. Primeiramente a celulose sofre a ação da celulase resultando em um dissacarídeo, a celobiose. A celulase é uma enzima composta por  $\beta$ -glicosidase (celobiase); 1,4- $\beta$  glican celobiohidrolase (celobiohidrolase) e 1,4- $\beta$ -glican glicanohidrolase (endoglicanase). A endoglicanase age sobre a celobiose resultando, assim, em glicose.

Algumas características estruturais da celulose como cristalinidade, grau de polimerização e acessibilidade podem interferir na ação do complexo de enzimas celulolíticas. A cristalinidade está relacionada com a reatividade do substrato e, de acordo com Zhang e Lynd (2004), ela tende a aumentar após um determinado período em contato com a água devido à recristalização. Estudos demonstraram que as hidrólises mediadas por celulases fúngicas são de 3 a 30 vezes mais eficientes em celulose amorfa, quando comparadas com celulose altamente cristalinizada. Devido a isso é de se esperar que a cristalinidade aumente durante o processo de hidrólise, como resultado da reação preferencial pela celulose amorfa; no entanto muitos estudos provaram que a cristalinidade não aumenta. Mais estudos são necessários para verificar a importância da cristalinidade sobre a hidrólise. Zhang e Lynd (2004) ainda relatam que a acessibilidade à celulose é um fator mais importante na determinação da taxa de hidrólise em relação à cristalinidade.

A quantidade relativa de pontes  $\beta$ -glicosídicas (terminais e internas) e o substrato para a ação de exo e endo enzimas, respectivamente, são determinados pelo grau de polimerização. Para realizar a sua medida, a dissolução da celulose em soluções como complexos metálicos e solventes orgânicos, deve ocorrer de modo a não alterar o comprimento das cadeias. Zhang e Lynd (2004) observaram um decréscimo drástico da solubilidade da celulose com o aumento do grau de polimerização, da mesma, devido às pontes de hidrogênio presentes entre as moléculas. O grau de polimerização dos substratos celulósicos pode variar entre: menor que 100 à maior que 15.000, essa grande variação está em função do substrato de origem e de sua preparação.

Outros fatores ligados ao grau de polimerização durante a hidrólise seriam a proporção entre exo-endo enzimas e as propriedades da celulose em questão. Enquanto as exoglucanases



agem no final das cadeias as endoglucanases agem na porção interior; ambas as ações contribuem para diminuir o grau de polimerização de modo mais lento e rápido, respectivamente (ZHANG; LYND, 2004).

A acessibilidade ao substrato também é uma característica importante da estrutura de celulose, pois, antes de iniciar a hidrólise da celulose insolúvel, as celulases necessitam ligar-se a superfície das partículas do substrato. O formato em 3D dessas partículas juntamente com o tamanho e formato das celulases, em determinadas condições, são condicionadores do acesso ou não as pontes  $\beta$ -glicosídicas pelas enzimas. As partículas de celulose são compostas por superfície interna e externa, sendo a primeira dependente de estruturas capilares, poros intraparticulados (1-10 nm), e vácuos interparticulados ( $>5 \mu\text{m}$ ). A superfície externa é dependente do formato e tamanho da partícula; sendo a adsorção da celulase e a reatividade da celulose aumentada conforme o decréscimo do tamanho das partículas (ZHANG; LYND, 2004).

Dentre os microrganismos utilizados na indústria para a produção de enzimas destacam-se os fungos (MENEZES, 1997). Entre os principais fungos celulolíticos produtores de celulases e xilanases podem ser citados *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium irienseis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp, (BISARIA; GHOSE, 1984) e *Humicola* sp (DA SILVA et al., 1994). Em bactérias dos gêneros *Bacillus* sp, *Bacteroides* sp, *Ruminococcus* sp, *Clostridium* sp (BISARIA; GHOSE, 1984) e em fungos dos gêneros *Myrothecium* sp, *Humicola* sp e *Penicillium* sp (DA SILVA et al., 1994) são encontradas xilanases, consideradas as principais hemicelulases estudadas (AGUIAR; MENEZES, 2000). Também podemos verificar a produção dessa enzima em algumas leveduras do gênero *Trichosporium* sp; elevados níveis de  $\beta$ -glicosidase podem ser produzidos por diversas espécies de *Aspergillus*.

Para a obtenção de grandes quantidades de enzimas celulolíticas podemos utilizar diversos substratos (VITTI, 1988; SILVA; DILLON, 1988) como, por exemplo, resíduos agrícolas que ao serem moídos ou triturados servem como fonte de nutrientes, principalmente carbono, em fermentação submersa (DA SILVA et. at., 1994). Porém, para poder utilizar esses compostos é necessário promover o seu enriquecimento com fontes de nitrogênio e minerais ou vitaminas (BISARIA; GHOSE, 1984; ELISASHVILI, 1993).

Segundo a literatura, têm sido obtidas enzimas celulolíticas e xilanolíticas, produzida por

*Neocalimastix frontalis*, utilizando-se papel de filtro e celulose microcristalina como substrato (LOWE et al., 1987). Também foi verificado que açúcares como sacarose, glicose, maltose e arabinose não conseguiram induzir a produção de celulase pelo microrganismo *Aspergillus fumigatus* (VITTI, 1988); porém quando a celulose insolúvel foi utilizada, como fontes de carbono, foram produzidos teores elevados da enzima celulolítica.

Smith (1983) comenta que o mecanismo de indução da produção de celulase consiste na reação da celulose, o qual é insolúvel em solução aquosa, com pequenas quantidades de celulase (produzidos mesmo sem a presença de um indutor) com a finalidade de fornecer celobiose (solúvel em água) para uma posterior indução. Com os estudos promovidos por Gong, Ladisch e Tsao (1979) ficou evidenciado que o microrganismo *Trichoderma reesei* produz pequenas quantidades (traços) da enzima em questão. O mecanismo de indução funciona com o transporte do indutor para o interior do microrganismo ativando, assim, a biossíntese da celulase. A biossíntese dessa enzima pode ser reprimida pela presença de glicose e outros açúcares simples, mesmo com a presença do indutor no meio de cultivo (MANDELS, 1975).

Segundo Vitti (1988) a utilização de substratos como algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetil celulose propiciaram um pequeno desenvolvimento e baixa atividade celulolítica do fungo *Penicillium funiculosum* UV-49. No entanto, Vitti (1988) relata que substratos como Avicel, algodão, celulose em pó e carboximetil celulose não são facilmente hidrolisados pelas celulases; mas, mesmo assim, parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase. De acordo com Gong e Tsao (1975) a celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose são consideradas excelentes indutores da síntese de celulase.

Abd-El-Nasser et al. (1997) realizaram testes em substratos de resíduos agrícolas como bagaço de cana tratado e não-tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó, com os fungos *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102; verificaram que correu uma maior indução de xilanase e celulase em espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado.

Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) realizaram um estudo com cultura mista de *Trichoderma reesei* LM-UC 4 e *Aspergillus phoenicis* em substrato de bagaço de cana, como indutor da produção de celulase total, atingindo atividade enzimática de 13,4 UI g<sup>-1</sup> após 120 horas de incubação a 30°C.

A literatura relata a produtividade de enzimas por *Trichoderma reesei* QM9414, em casca de semente de soja (material lignocelulolítico), de 81 FPU L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Em experimentos realizados com madeira verificou-se que a linhagem de *T. reesei* Rut C30 apresentou uma produtividade enzimática de 36 FPU L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (PERSSON et al., 1991).

De acordo com Fernandes-Salomão et al. (1996) o sistema de fermentação submersa é o método utilizado para a produção de grande parte das enzimas comerciais, pois esse sistema garante um maior controle e adaptação da metodologia, maior rendimento e menores custos e riscos de contaminação.

## 2.7 Complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*

Geralmente as celulasas provenientes de gênero *Trichoderma* costumam ser as mais citadas, devido aos elevados níveis de celulasas secretadas. A espécie *Trichoderma reesei* foi desenvolvida a partir de um isolado (QM6a) pelo pesquisador Elwin Reese. Dentre as celulasas comerciais, a maioria é obtida através do *Trichoderma* spp., com uma pequena porção sendo obtida através do fungo *Aspergillus niger* (ZHANG; LYND, 2004).

Dentre o complexo celulolítico, produzido por diversos microrganismos, o secretado pelo *Trichoderma reesei* é o mais estudado em toda a literatura. Esse microrganismo possui pelo menos cinco endoglucanases (EG I, II, III, IV e V) sendo que, cerca de 5% do total de proteínas liberadas no meio de cultura correspondem a EG I e 0,5% a EG II; já as produções das endoglucanases restantes chegam a ser mínimas (MARTINS, 2005).

Com relação às celobiohidrolases, as quais são produzidas em maior quantidade quando comparadas com as outras enzimas do complexo, já foram relatadas dois tipos (CBH I e CBH II). Do total de proteínas liberadas no meio de cultura a CBH I e a CBH II respondem por 60% e 20%, respectivamente (MARTINS, 2005). Também já foi identificado, por meio da eletroforese em 2D, a produção de  $\beta$ -glicosidases e hemicelulasas (ZHANG; LYND, 2004).

A atuação em conjunto dessas enzimas sobre materiais celulósicos caracterizam um efeito de sinergismo. A literatura descreve os sinergismos exo-endo pelo fato de endoglucanases promoverem a quebra da superfície da celulose em cadeias menores e livres para a ação das celobiohidrolases. Dentro do processo de degradação também é verificado o sinergismo endo-endo e exo-exo (LEMOS et al., 2003).

Com o intuito de se obter glicose, a partir da hidrólise da celulose, é necessário que o microrganismo apresente o complexo enzimático de celulases abaixo (ÂNGELO, 2004):

- Endoglicanase ou carboximetil celulase (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicana glicanahidrolase, EC 3.2.1.4.): responsável pela endohidrólise randômica das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celulose.
- Exoglicanase (4- $\beta$ -celobiohidrolase, EC 3.2.1.91): promove a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celulose e de celutetraoses acarretando a liberação de celobiose.
- $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -D-glicosideo glicohidrolase ou celobiase, EC 3.2.1.21): promove a hidrólise de resíduos terminais de  $\beta$ -D-glicose ou oligossacarídeos.
- Exo- $\beta$ -glicosidase (glicana-1,4- $\beta$ -glicohidrolase, EC 3.2.1.74): realiza remoções sucessivas de unidades de D-glicose em 1,4- $\beta$ -D glicanas.

A eficiente e completa hidrólise da celulose está em função da proporção certa entre as enzimas endoglicanase, exoglicanase e  $\beta$ -glucosidase (CHAHAL, 1991).

A adsorção das enzimas em substratos sólidos é outro fator importante a ser considerado, sendo o mesmo o passo inicial para a hidrólise. A importância da adsorção está refletida no domínio estrutural da celulase, sendo que a maioria dela é formada por um domínio ativo catalítico e um domínio de ligação da celulose (CBD) (MEDVE et al., 1998).

Zhang e Lynd (2004) relatam que de acordo com análises estruturais, ficou evidenciado que a celobiose é o primeiro produto a ser formado após a hidrólise, mediada por CBH I e CBH II; além disso, as ações dessas duas celobiohidrolases acarretaram uma diminuição gradual no grau de polimerização da celulose. Enquanto as atividades de exoglucanases podem ser medidas através da quantificação de açúcares redutores gerados quando reagem com o substrato Avicel; a atividade das endoglucanases são medidas em cima da taxa de mudança da viscosidade da celulose solúvel carboximetilcelulose (CMC).

## **2.8 Hidrólise de materiais lignocelulolíticos**

Por serem considerados fontes renováveis de etanol e outros produtos utilizados em diversas indústrias farmacêuticas e químicas, os materiais lignocelulósicos provenientes de atividades agrícolas (madeira, bagaço de cana-de-açúcar, restos da cultura do milho, palha, entre outros) têm sido objeto de vários estudos nos últimos anos. Atualmente o interesse nesse tipo de

material deve-se ao aumento da demanda de energia verificada nos últimos 100 anos em consequência do crescimento populacional e da industrialização dos países. Um outro fator favorável à procura de novas tecnologias para a produção de energia a partir da biomassa é devido à redução das reservas petrolíferas mundiais. Estimativas demonstram que a produção do petróleo tende a declinar de 25 bilhões de barris (produção anual global) para aproximadamente 5 bilhões de barris em 2050 (SUN; CHENG, 2002).

Sun e Cheng (2002) comentam as extensas pesquisas que já foram realizadas nas últimas duas décadas visando converter o material lignocelulósico em etanol. Através das mesmas pode-se verificar a necessidade de duas etapas para o processo: a hidrólise ácida ou enzimática desse material em açúcares redutores fermentescíveis e a fermentação desses açúcares. O fundamento da hidrólise ácida é o de realizar a quebra das moléculas de celulose (presentes nas fibras do bagaço e da palha) por meio da adição de ácido aos resíduos. No caso da hidrólise enzimática utilizam-se enzimas secretadas por microrganismos lignocelulolíticos (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006).

A diferença entre as duas tecnologias ocorre devido à hidrólise ácida envolver um catalisador ácido, o qual é mais rápido na conversão e por isso a reação deve ser controlada para evitar reações paralelas indesejáveis ou incontroláveis. Na hidrólise enzimática o catalisador além de ser de origem biológica, realiza reações específicas causando menores impactos ambientais, porém, para maximizar o seu processo, é necessário controlar diversos parâmetros como temperatura e meio específico; também deve ser levado em conta o maior tempo requerido para completar o processo (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006).

Durante a hidrólise enzimática alguns fatores podem interferir como: acesso a área de superfície devido à porosidade do material; presença de fibras cristalinas na celulose; e presença de lignina e hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose resultando em redução da eficiência do processo de hidrólise (SUN; CHENG, 2002).

De acordo com Baudel (2006) o obstáculo encontrado para viabilizar, economicamente, a produção do bioetanol proveniente da biomassa lignocelulósica é disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. No bagaço são encontradas celulosas e hemicelulosas apresentando diferenças acentuadas tanto em suas propriedades estruturais, quanto físico-químicas (composição química, morfologia, orientação molecular, resistência química e mecânica).

Alguns parâmetros relacionados com a eco-eficiência do processo hidrolítico devem ser considerados durante a seleção das diferentes opções tecnológicas para a disponibilização de carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar. Dentre esses parâmetros destacam-se rendimento hidrolítico, seletividade, fermentabilidade dos hidrolisados, geração de efluentes, reuso de materiais e insumos, consumo de água e energia, valorização de resíduos e operações auxiliares. Outros fatores como custo operacional, capital, aspectos associados à facilidade e flexibilidade dos sistemas operacionais à implementação de tecnologia e processos eficientes, também devem ser considerados antes de selecionar a melhor tecnologia a ser adotada (BAUDEL, 2006).

O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é uma etapa operacional importante em termos de custo direto, também apresenta grande influência nos custos das etapas anteriores e subseqüentes do processo. Baudel (2006) enfatiza que o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade para garantir acessibilidade à celulose, simplicidade operacional, segurança e higiene industrial e atributos ambientais, consumo reduzido de insumos químicos e energia, e ainda garanta adequada recuperação das pentoses e evite ou minimize a geração de compostos inibidores aos microrganismos usados na fermentação e às enzimas.

A literatura relata a utilização de álcalis ou ácidos para extrações seletivas de componentes não-celulósicos (lignina e hemicelulose) a custos relativamente razoáveis; dentre as opções de pré-tratamento a utilização de vapor d'água, ácido sulfúrico diluído, amônia e hidróxido de cálcio tem se revelado serem os mais promissores. Além do pré-tratamento da biomassa com álcalis ou ácidos utiliza-se também o tratamento com vapor (explosão a vapor), o qual consiste no aquecimento do material a temperaturas elevadas com vapor saturado seguido de uma súbita descompressão do equipamento produzindo, assim, uma mistura denominada de "slurry" de cor marrom resultante da fragmentação da biomassa. No pré-tratamento com vapor utilizam-se temperaturas de 160-240°C por um período de tempo de 1-15 minutos, promovendo transformações químicas e físicas na estrutura lignocelulósica do bagaço (BAUDEL, 2006).

No processo de pré-tratamento com ácido diluído, como  $H_2SO_4$  na concentração de 0,05% a 0,07% e temperaturas entre 140 a 200°C, ocorre a hidrólise de 80% a 95% da fração hemicelulose (recuperadas principalmente na forma de monômeros) e a extração de 30 a 50% da lignina. Esse tratamento permite uma elevada reatividade da fibra apresentando cerca de 90% de digestibilidade enzimática; porém além de demandar configurações de equipamentos complexas,

demanda elevado consumo de água e energia (BAUDEL, 2006).

Martín et al. (2007) relatam que apesar da hidrólise ácida ser um método bastante conhecido e rápido, torna-se necessário utilizar equipamentos caros que sejam resistentes a corrosão. Além disso, a recuperação do ácido e a neutralização do hidrolisado também devem ser realizados.

Em conjunto com a solução ácida no pré-tratamento, utiliza-se a explosão a vapor, no entanto a literatura relata a formação de alguns subprodutos que interferem, posteriormente, no processo de fermentação do hidrolisado. Martín et al. (2007) relatam a produção dos seguintes inibidores da fermentação: ácido acético, formado pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulose; ácidos fórmicos e levulínicos, produtos de degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da fração lignina; e furaldeídos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente.

A utilização do pré-tratamento alcalino requer temperaturas e pressões moderadas (quando comparadas com o tratamento ácido) e consiste na remoção da lignina de biomassa promovendo maior reatividade da fibra; geralmente utiliza-se soda ou cal como álcalis e, para garantir economia, torna-se necessário a recuperação dos mesmos. Por promoverem uma intensa deslignificação da biomassa, os álcalis são utilizados no tratamento de matérias com reduzido teor de lignina como, por exemplo, resíduos agroindustriais. O álcali hidróxido de cálcio apresenta vantagens em termos de custo, segurança do processo e possibilidade de recuperação sob a forma de carbonato de cálcio (BAUDEL, 2006).

O pré-tratamento tem por objetivo aumentar a área de superfície da biomassa e reduzir a cristalinidade da celulose. Enquanto o tratamento ácido promove a hidrólise da camada de hemicelulose, o tratamento alcalino promove a remoção de parte da camada de lignina deixando a hemicelulose intacta, a qual necessita de enzimas hemicelulolíticas para serem degradadas. O pré-tratamento do bagaço é de extrema importância para a posterior ação das enzimas, tanto expondo as fibras de celulose quanto tornando a celulose mais acessível ao ataque das mesmas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Estudos realizados por Martín et al. (2007) compararam a eficiência do pré-tratamento em diferentes condições (temperaturas de 205°C e 215°C, tempo de 5 e 10 minutos, impregnação com dióxido de enxofre e ácido sulfúrico) e posterior hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-

açúcar. Os parâmetros quantificados foram a produção de compostos inibidores do processo de fermentação como ácido acético, ácido fórmico, furfurool, fenol e 5-hidroximetilfurfurool; e a produção de açúcares totais. Entre os experimentos realizados verificou-se que a fermentação do bagaço hidrolisado pré-tratado a 205°C por 10 minutos resultou na maior produção de etanol por grama de bagaço, o dobro da obtida com o hidrolisado tratado a 215°C por 10 minutos. Também foi observado que o bagaço impregnado com dióxido de enxofre, antes do tratamento térmico, levou a produção elevada de açúcar; no entanto o processo de fermentação desse hidrolisado foi realizado após o tratamento de detoxificação com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  até pH 10 por 1 hora e redução do pH, com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , para 5,5 seguido de filtração.

Hahn-Hägerdal et al. (2006) comentam os testes pilotos realizados em equipamentos voltados para a produção de açúcar a partir de biomassa. Nos testes utilizam-se a explosão a vapor em conjunto com catalisadores da hidrólise visando aumentar a digestibilidade enzimática. Esse modelo é o mais viável a ser comercializado e já é possível verificar testes nas plantas pilotos da Iogen (Canadá), Souston (França), Örnköldsvik (Suécia) e Abengoa (Espanha).

## 2.9 Características do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço, por apresentar uma baixa densidade e grau de compactação, apresenta certa dificuldade com relação à alimentação do reator e a condução do pré-tratamento quando o teor de cargas de sólidos é elevado (acima de 50%). Durante o processo de moagem da cana ocorre a deposição de impurezas como cinzas e sílica conferindo, assim, uma capacidade “tamponante” ao mesmo, resultando em um elevado consumo de ácidos para a obtenção de pH adequado e, posterior, processo de pré-tratamento (BAUDEL, 2006). Sendelius (2005) verificou, em seus experimentos, um incremento, próximo de 40% no consumo de  $\text{SO}_2$  e 30% de ácido sulfúrico, devido à capacidade “tamponante” do bagaço.

Um parâmetro operacional importante para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica refere-se à impregnação adequada à substância química a ser utilizada. A elevada capacidade de absorção de líquidos, a reduzida dureza e a elevada umidade do bagaço proveniente da moenda (cerca de 50%) são características da biomassa que facilita a impregnação com soluções ácidas e alcalinas. O tratamento com soluções ácidas, visando elevada eficiência, necessita de quantidades adequadas de água; na qual o ácido dissocia-se formando o íon hidroxônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e,



também, promove o transporte desse íon para o interior da biomassa.

Experimentos realizados em Lund (Suécia) demonstram que cargas de sólido entre 25-40% (em peso seco de bagaço de cana-de-açúcar) e umidade entre 50-70% resultaram em extrações seletivas de xilose e com reduzida perda de glicose, gerando fibras com reatividade entre 85-95%.

Entre os diversos métodos empregados para realizar o pré-tratamento é necessário estar atento com o grau de severidade do procedimento, os mesmos devem ser conduzidos sob condições moderadas visando promoverem elevada reatividade das fibras celulósicas, elevada recuperação de hemiceluloses, mínima perda de glicose no hidrolisado e mínima geração de compostos inibidores às etapas posteriores de hidrólise e fermentação (BAUDEL, 2006).

## 2.10 Obtenção de açúcares

De acordo com Maris et al. (2006), ao analisar o custo efetivo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulolíticos, deve-se levar em consideração a taxa de fermentação dos açúcares presentes no material hidrolisado. Durante o processo de hidrólise são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, e as hexoses geradas na degradação de parte das hemicelulose e celulose. O xarope açucarado obtido após a hidrólise da celulose é usado para a fermentação alcoólica. A maioria dos microrganismos utilizados nos processo de fermentação alcoólica (pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*) só são capazes de converter hexoses (açúcares compostos por 6 carbonos) em etanol. De acordo com Chandel et al. (2007) as leveduras mais promissoras capazes de fermentarem não só as hexoses, como também as pentoses (açúcares compostos por 5 carbonos), seriam *Pichia stipitis*, *Candida chehatae* e *Pachysolan tannophilus*. Outro fator importante a ser considerado no custo de produção refere-se aos compostos que inibem o crescimento dos microrganismos, formados pela hidrólise do material em questão, como comentado anteriormente.

Nos experimentos realizados por Pessoa Jr. et al. (1997) foi determinado o teor de açúcares redutores pela metodologia de Somogyi-Nelson; enquanto xilose, glicose, ácido acético, furfurool e hidroximetilfurfurool foram quantificados por cromatografia líquida (HPLC). Ambas as metodologias utilizadas visavam caracterizar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. A hidrólise ácida foi realizada com uma concentração de 100 mg de ácido sulfúrico por grama de

massa seca à 140°C por 20 minutos. Os teores de açúcares redutores, xilose, glicose, furfurool, hidroximetilfurfurool e ácido acético foram, respectivamente, 25,4 g L<sup>-1</sup>; 18,5 g L<sup>-1</sup>; 5,1 g L<sup>-1</sup>; 2,0 g L<sup>-1</sup>; 0,08 g L<sup>-1</sup> e 3,7 g L<sup>-1</sup>.

Em outro estudo realizado por Gámez et al. (2004), uma hidrólise ácida com diferentes concentrações do ácido fosfórico (2, 4 e 6%) em proporção de oito gramas de solução por grama de bagaço seco a 100°C e tempo de 0-300 minutos, foi observado maior quantidade de xilose, 17,7 g L<sup>-1</sup>, no experimento com 6% de ácido fosfórico por 300 minutos. Foi verificado também que a concentração de xilose crescia de acordo com a concentração de ácido e o tempo de tratamento. Sob o mesmo período de tratamento e a mesma concentração do ácido, foram obtidos 1,60 g L<sup>-1</sup> de glicose e 2,1 g L<sup>-1</sup> de arabinose e, com relação aos compostos inibidores de microrganismos, foram quantificados 3,61 g L<sup>-1</sup> de ácido acético e 0,35 g L<sup>-1</sup> de furfurool.

Também foram realizados experimentos comparando pré-tratamento de bagaço por oxidação em água (suprimento de 12 bares de oxigênio, temperatura de 195°C e tempo de 15 minutos) em diferentes pH (10; 6,1 e 3). Ao analisar por cromatografia o hidrolisado alcalino (o qual apresentou a menor formação de bioprodutos inibidores da fermentação), foi observada a presença de dois tipos de açúcares: glicose (29,6 g L<sup>-1</sup>) e xilose (7,8 g L<sup>-1</sup>) (MARTÍN et al.; 2006).

Sendelius (2005) realizou experimentos com pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, primeiramente, com temperaturas de 180, 190 e 205°C (por 5 ou 10 minutos) e, posteriormente, impregnado com o gás dióxido sulfúrico a 2% ou ácido sulfúrico diluído (0,25 g de ácido por 100 g de bagaço seco). Após realizar hidrólise com enzimas comerciais, verificou-se que a amostra pré-tratada a 190°C por 5 minutos, impregnada com 2% de SO<sub>2</sub> e hidrolisada apresentou a maior produção de glicose (96,3%); enquanto a amostra pré-tratada a 180°C por 5 minutos, impregnada com 2% de SO<sub>2</sub> e hidrolisada apresentou a maior produção de xilose (66,6%).

Chandel et al. (2006) ao realizar a hidrólise do bagaço a 140°C por 30 minutos com diferentes concentrações do ácido clorídrico (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5%), verificaram que na concentração de 2,5% foi quantificado a maior produção de açúcares totais (30,29 g L<sup>-1</sup>), xilose (21,5 g L<sup>-1</sup>), arabinose (2,95 g L<sup>-1</sup>) e glicose (5,84 g L<sup>-1</sup>). No entanto também foi a concentração de ácido em que ocorreu a maior produção de compostos inibidores da fermentação como furanos (1,89 g L<sup>-1</sup>), compostos fenólicos (2,75 g L<sup>-1</sup>) e ácido acético (5,45 g L<sup>-1</sup>).

Chong et al. (2004) ao realizar a caracterização do hidrolisado proveniente de bagaço de cana-de-açúcar tratado com concentrações de ácido nítrico de 2, 4 e 6%; nas temperaturas de 100, 122 e 128°C verificaram a presença dos açúcares xilose, glicose e arabinose. Nas melhores condições de tratamento (122°C, ácido nítrico a 6% e 33 minutos) foram obtidas as seguintes concentrações de açúcares: xilose (18,6 g L<sup>-1</sup>), arabinose (2,04 g L<sup>-1</sup>) e glicose (2,87 g L<sup>-1</sup>).

Corredor et al. (2006) desenvolveram uma combinação de processos para fibras de sorgo (degradação do amido – pré-tratamento com água quente – hidrólise enzimática) visando obter uma produção máxima de 75% de açúcares totais. No pré-tratamento utilizaram temperaturas de 130°C por 20 minutos e na hidrólise enzimática a temperatura foi de 50°C por 60 horas. Com esse processo foi possível obter uma produção de 79% de hexoses e 63% de pentoses.

## **2.11 Etanol e meio ambiente**

De acordo com Chandel et al. (2007) o dióxido de carbono liberado durante a queima do etanol acaba sendo reutilizado pelas plantas para a síntese de celulose no processo de fotossíntese; devido a isso pode-se dizer que o etanol representa um ciclo de dióxido de carbono fechado. As vantagens de se utilizar o etanol como fonte de energia são: para a produção de etanol utilizam-se fontes energéticas renováveis, não ocorrendo emissões para a atmosfera do gás dióxido de carbono e, conseqüentemente, tornando o etanol uma fonte de energia benéfica para o ambiente; a emissão de gases tóxicos provenientes do etanol é menor em relação às fontes de energia advindas do petróleo; etanol derivado de biomassa é o único combustível líquido que não contribui para o efeito estufa.

Com o aumento da demanda global de energia proveniente de combustíveis fósseis, verificou-se um aumento tanto nos problemas de saúde humana, como na emissão de gases prejudiciais ao efeito estufa. Devido a isso, a utilização do etanol advindo de biomassa como fonte de energia é uma das alternativas na redução do efeito estufa no planeta, pois o etanol contém 35% de oxigênio, o qual favorece a completa combustão e reduz a emissão de partículas que expõe em risco a saúde humana (CHANDEL et al., 2007).

Em estudos realizados com a combustão de combustíveis misturados (diesel + etanol) foi demonstrado que a adição simultânea de etanol no diesel diminui o número de cetonas, aumenta o valor de aquecimento, aumenta as frações aromáticas, aumenta a viscosidade, e modifica

temperaturas de destilação. O bioetanol pode promover reduções na ordem de 20-30% dos precursores da camada de ozônio e reduzir os gases prejudiciais a saúde humana nas estações de metro dos grandes centros urbanos. A mistura do etanol no diesel é responsável pela redução de 41% na matéria particulada e de 5% na emissão do NOx. Contudo, o uso do etanol também provoca danos ao meio ambiente como uma maior emissão de aldeídos (principalmente acetaldeído) quando comparado com a gasolina; porém os danos causados a saúde humana pelos aldeídos são bem menores em relação aos formaldeídos emitidos pelos motores a gasolina (CHANDEL et al., 2007).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Enzimas comerciais**

Para a realização dos experimentos foram utilizadas enzimas purificadas, comerciais, provenientes da empresa “AB enzymes”. As enzimas e os microrganismos dos quais foram extraídos encontram-se detalhados na Tabela 2.

De acordo com as especificações fornecidas pela empresa, todas as enzimas apresentam uma faixa de pH, temperatura e tempo de tratamento em que sua atividade é otimizada. Com o intuito de facilitar o procedimento durante o experimento, as mesmas foram ajustadas em dois pH diferentes (4,5 e 7,0), a temperatura de 60°C e um tempo de tratamento de 50 minutos, (Tabela 2).

Tabela 2 - Enzimas comerciais utilizadas, microrganismos de origem e pH ótimo de atividade

<b>Enzima Comercial</b>	<b>Microrganismo de origem</b>	<b>pH</b>
Ecoston HPL1800	Linhagem geneticamente modificada de <i>Trichoderma reesei</i> .	4,5
Ecoston P4500		4,5
Ecoston P1250		4,5
Rohament CL3708	Linhagem de <i>Trichoderma reesei</i> .	4,5
Ecoston NP400	Linhagem geneticamente	7,0
Ecoston C9	modificada de um fungo não	7,0
Ecoston C10	patogênico.	7,0

### 3.2 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade celulolítica total das enzimas, utilizou-se a metodologia de determinação de açúcares totais, por ácido dinitrosalicílico (DNS), em papel de filtro de acordo com o protocolo de Adney e Baker (1996).

Em tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de tampão citrato e 0,5 mL da enzima diluída. No tempo zero adicionou-se uma tira de papel Whatman nº. 1 (1 x 6 cm) em cada tudo, tomando o cuidado para que o papel estivesse totalmente submerso na solução. Os frascos foram colocados em banho-maria a 60°C por 50 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se 3 mL de reagente DNS, os tubos foram misturados e colocados em água fervente no banho-maria por 5 minutos. Quando os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e, quando a polpa já estava assentada, foi realizada uma diluição na proporção de 0,2 mL da reação para 2,5 mL de água destilada; os tubos foram misturados e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Femto-432) a 540 nanômetros.

As amostras que representam o Branco e a Curva padrão também foram ajustadas à temperatura de 60°C e tempo de tratamento de 50 minutos, porém o pH foi de 4,8, como recomenda o protocolo analítico de atividade enzimática em papel de filtro. O mesmo procedimento citado acima foi adotado para determinar as leituras da curva padrão (Figura 1). Com o auxílio da curva padrão, determinou-se o teor de açúcares liberados ( $\text{mg } 0,5 \text{ mL}^{-1}$ ) de cada

enzima diluída.

Foram então selecionadas duas diluições de cada enzima, uma liberando acima e outra abaixo de 2 mg de açúcar por 0,5 mL (de acordo com as especificações do protocolo). Ao identificar as diluições necessárias para cada enzima, foi construído um gráfico de glicose liberada (mg de açúcares por 0,5 mL de solução) x diluição da enzima ( $\text{g mL}^{-1}$ ) permitindo, assim, estimar a diluição da enzima que libera 2 mg de açúcar por 0,5 mL de solução para então poder realizar os cálculos de determinação de atividade enzimática, em papel de filtro de acordo com as equações (1) e (2) (ADNEY; BAKER, 1996).

$$\frac{(2 \text{ mg}/0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol})}{(0,5 \text{ mL de enzima diluída} \times 50 \text{ minutos})} = 0,44 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \quad (1)$$

$$\frac{0,44}{\text{Concentração da enzima que libera 2 mg de açúcar}} = \text{FPU mL}^{-1} \quad (2)$$

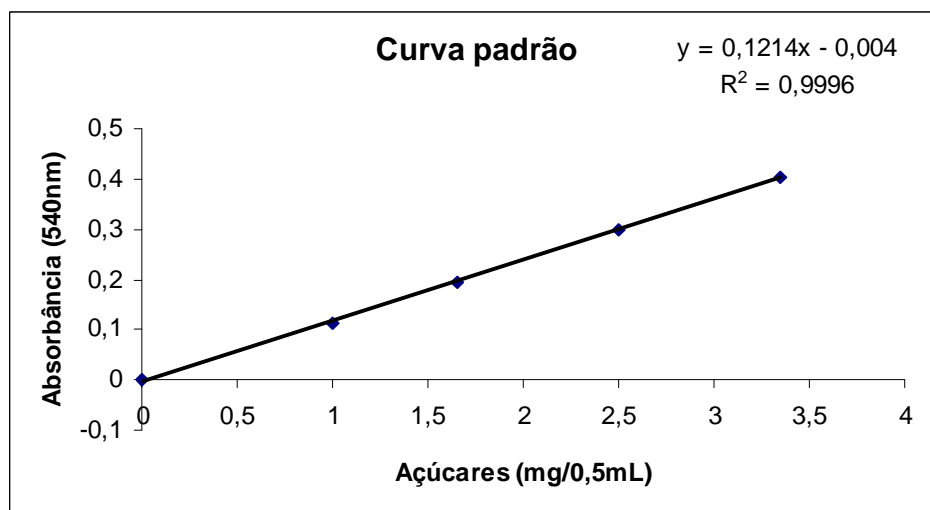


Figura 1 - Quantidade de açúcares liberados de acordo com as absorvâncias obtidas a partir da solução padrão de glicose 1%

### 3.3 Reagentes e soluções

**Reagente DNS:** Dissolver 10 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico e 16 g de NaOH em água destilada; acrescentar 300 g de sódio-potássio tartarato em pequenas porções e sob agitação; completar o volume para 1 litro e filtrar se necessário. Armazenar a solução em vidro escuro em temperatura ambiente.

**Tampão citrato:** preparar soluções 0,05 M de ácido cítrico e 0,05 M de citrato de sódio; ajustar o pH da solução de citrato de sódio com a solução de ácido cítrico. Armazenar a solução em temperatura ambiente.

### 3.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi fornecido pela usina Cosan (Unidade Costa Pinto) durante a safra 2006/2007; o mesmo foi seco ao ar livre, na sombra e estocado em saco plástico até o uso. Visando facilitar o acesso das enzimas celulolíticas às frações de celulose e hemicelulose do bagaço, foi realizado um pré-tratamento do mesmo.

O bagaço foi peneirado e a fração entre 5,6 mm (tyler 14) e 1,19 mm (tyler 3,5) foi utilizada na condução dos experimentos.

Foram pesados 3 g de bagaço seco em frascos Erlenmeyer e adicionados solução de 0,5% de ácido sulfúrico, para o tratamento ácido; solução de 3% de hidróxido de cálcio, para o tratamento alcalino, e água destilada, para o tratamento tido como controle, na proporção de 1:5 (peso/volume). O material foi homogeneizado e colocado em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após o término do pré-tratamento o bagaço teve seu pH ajustado para 4,5, visando otimizar a ação das enzimas selecionadas para a posterior hidrólise enzimática do material.

### 3.5 Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose

Com o intuito de verificar a eficiência da hidrólise do material, foram determinados os teores de lignina, celulose e hemicelulose presentes nas seguintes amostras:

- Bagaço seco *in natura* (controle);

- Bagaço seco pré-tratado com 0,5% de solução de ácido sulfúrico e neutralizado a pH 4,5;
- Bagaço seco pré-tratado com 3% de solução de hidróxido de cálcio e neutralizado a pH 4,5;

As análises foram realizadas no Instituto de Zootecnia, localizado na cidade de Nova Odessa, São Paulo, de acordo com as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963).

### **3.6 Sacarificação enzimática**

Para realizar a hidrólise enzimática do material pré-tratado, foram adicionado 75 mL de tampão citrato (0,05 M), 1,125 mL do antibiótico Actidiona (100 ppm) e 37,5 mL de enzima diluída (cada enzima apresentando uma concentração diferente). Os frascos foram incubados em mesa com agitação lateral e temperatura controlada a 40°C por 65 horas. Ao término da reação, as amostras foram filtradas a vácuo e, posteriormente, fervidas em banho-maria por 30 minutos, visando inativar a ação das enzimas. Antes de iniciar a determinação de açúcares totais, as amostras foram filtradas novamente em membranas de 0,22 micrometros. Após isso, alíquotas das amostras foram estocadas em tubos eppendorf no freezer a -20°C para, posteriormente, serem realizadas as análises de açúcares por cromatografia líquida (HPAEC).

### **3.7 Determinação de açúcares totais (DNS)**

Ao término da sacarificação enzimática, realizou-se a determinação de açúcares totais pela metodologia de DNS de acordo com Adney e Baker (1996), como descrito no item 3.2. Os resultados obtidos, em três repetições, foram analisados pelo programa estatístico SAS.



### **3.8 Determinação e identificação de açúcares por cromatografia líquida**

As amostras sacarificadas como descritas no item 3.6 foram congeladas em tubos de Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) foram realizadas no aparelho da marca Dionex, modelo BioLC pertencente a empresa Fermentec Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica Ltda., situada em Piracicaba - São Paulo. Para essa análise foi utilizada a coluna de troca aniônica Dionex modelo PA-1 e uma solução de hidróxido de sódio 20 mM isenta de carbonato. Em relação a detecção amperométrica dos carboidratos, foram utilizados os parâmetros recomendados pelo fabricante para este tipo de determinação. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SAS.

## **4 RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **4.1 Determinação da atividade celulolítica total**

As concentrações de enzimas que promoveram a liberação de açúcares totais acima e abaixo de  $2\text{ mg } 0,5\text{ mL}^{-1}$  foram avaliadas, em três repetições, pelo método DNS e os valores das repetições se encontram no Anexo A. As duas diluições da concentração de enzimas foram realizadas para, posteriormente, identificar a concentração que libera aproximadamente  $2\text{ mg } 0,5\text{ mL}^{-1}$  de açúcares totais.

Dentre as enzimas analisadas, foi possível ajustar as especificações do protocolo de análise para seis delas (HPL1800, CL3708, P1250, P4500, C9 e C10). Para a enzima NP400 não foi possível encontrar uma diluição maior, visando a liberação de açúcares em torno de  $2\text{ mg } 0,5\text{ mL}^{-1}$  pois esta mostrou ser insolúvel nestas condições (Tabela 3).

Através dos valores presentes na Tabela 3 realizou-se a interpolação dos dados, para cada enzima, em gráfico de glicose liberada (mg de açúcares por 0,5 mL de solução) por diluição da enzima ( $\text{g mL}^{-1}$ ) permitindo, assim, estimar a concentração da enzima que libera 2 mg de açúcar por 0,5 mL de solução. Os gráficos encontram-se no Anexo B.

Com o auxílio das equações (1) e (2), citadas no item 3.2, verificou-se que a atividade das enzimas HPL1800, CL3708, P1250, P4500, C9 e C10 foram, respectivamente, 92,5; 52,24; 185; 444; 8,54 e 11,68 FPU mL<sup>-1</sup> (Tabela 3). As enzimas que apresentaram maiores atividades (HPL1800, CL3708, P1250 e P4500) foram utilizadas, posteriormente, nos experimentos de hidrólise enzimática no bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 3 - Concentração das enzimas e concentração média de açúcares totais liberados nas duas diluições de cada enzima visando obter a concentração necessária para a liberação de, aproximadamente, 2 mg de açúcares por 0,5 mL de solução

Enzimas	Concentração das enzimas (g mL <sup>-1</sup> )	Concentração média dos açúcares (mg 0,5mL <sup>-1</sup> )
HPL1800	0,005	2,08 ±0,14*
	0,0022	1,27 ±0,11*
CL3708	0,01	2,31 ±0,07*
	0,007	1,73 ±0,05*
P1250	0,003	2,31 ±0,19*
	0,0015	1,59 ±0,06*
P4500	0,0016	2,53 ±0,06*
	0,001	1,95 ±0,08*
C9	0,07	2,32 ±0,08*
	0,025	1,53 ±0,02*
C10	0,045	2,21 ±0,13*
	0,023	1,59 ±0,11*

\* ±Desvio Padrão

Tabela 4 - Concentração das enzimas necessária para a liberação de 2 mg 0,5mL<sup>-1</sup> de açúcares totais e atividade de cada enzima (FPU)

<b>Enzimas</b>	<b>Concentração da enzima (g mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade (FPU mL<sup>-1</sup>)</b>
HPL1800	0,0048	92,5
CL3708	0,0085	52,24
P1250	0,0024	185
P4500	0,0010	444
C9	0,0520	8,54
C10	0,0380	11,68

FPU = Filter Paper Unit

#### 4.2 Análise dos teores de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar

Com o intuito de verificar os teores de celulose, lignina e hemicelulose foram realizadas análises de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e não pré-tratadas com soluções alcalinas e ácidas comparadas com o controle não tratado. Os resultados apontam que o pré-tratamento do bagaço com ácido sulfúrico 0,5%, e autoclave a 121°C por 30 minutos ocasionou uma diminuição de 12 vezes no teor da fração hemicelulose, enquanto que os valores das frações de lignina e celulose aumentaram 1,7 e 1,3 vezes, respectivamente, em relação à amostra considerada como controle (bagaço *in natura*) (Tabela 5). Essa elevação ocorreu porque ao promover o rompimento das fibras a lignina e a celulose, que se localizavam na parte interna do bagaço, acabaram por ser liberadas. De acordo com a literatura, a alteração no valor da fração de hemicelulose ocorre por o tratamento ácido promover a ruptura das fibras de hemicelulose, gerando outros tipos de açúcares como xilose e arabinose em maiores quantidades. (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

No pré-tratamento do bagaço com o hidróxido de cálcio 3% e autoclave a 121°C por 30 minutos ocorreu uma redução de 2,14 vezes no teor da fração hemicelulose. A porcentagem de lignina permaneceu praticamente a mesma em relação ao bagaço *in natura*, e o teor de celulose

apresentou um aumento de 0,95 (Tabela 5). Apesar de não ter ocorrido redução no teor de lignina o pré-tratamento é necessário quando se trabalha com materiais lignocelulósicos, pois, além de facilitar o acesso das enzimas às fibras de celulose, promovem modificações na cristalinidade das mesmas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Tabela 5 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar sem e com pré-tratamento, alcalino ou ácido em porcentagem da matéria seca

<b>Amostras</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>
Bagaço sem pré-tratamento	54,55	10,44	26,75
Bagaço + Ca(OH) <sub>2</sub>	62,38	9,96	12,50
Bagaço + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	69,77	17,61	2,24

### 4.3 Determinação de açúcares no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por DNS

Nos testes de hidrólise enzimática do bagaço, foram utilizadas apenas as quatro enzimas que apresentaram maior atividade celulolítica total (HPL1800, CL3708, P1250 e P4500).

A quantificação de açúcares totais foi determinada pela metodologia do DNS em três repetições (Anexo C e D). Ao analisar apenas a ação de cada enzima verificaram-se valores, em mg de açúcares por mL de hidrolisado, entre: 14,55 e 19,95 no tratamento alcalino; 7,38 e 10,60 no tratamento ácido; e 3,95 e 4,65 no tratamento com água, considerado como controle (Tabela 6 e Figura 2). Por meio desses valores é verificado que a ação isolada das enzimas é maior no pré-tratamento básico, sendo da ordem de 3,6 - 4,3 e 1,9 - 2,0 vezes em relação às suas atuações nos pré-tratamentos controle e ácido, respectivamente.

Esses mesmos resultados foram analisados pelo programa estatístico SAS e foi verificado que as enzimas não diferem entre si ao nível de 5% de significância. Também foi observado nesse experimento, que as enzimas agem diferentemente entre os três pré-tratamentos ao nível de 5% de significância, sobressaindo uma maior ação no tratamento com hidróxido de cálcio a 3% (121°C por 30 minutos). Observa-se que apenas as enzimas não são suficientes para uma

hidrólise completa.

Apesar de não haver diferença estatística entre as quatro enzimas, a enzima P4500 foi a mais eficiente no processo de conversão da celulose e hemicelulose em açúcares, pois necessitou de uma menor concentração ( $0,0010 \text{ g mL}^{-1}$ ) para atingir valores estatisticamente idênticos as demais enzimas. Já a enzima CL3708 apresentou uma menor eficiência no processo de sacarificação do bagaço, pois necessitou de uma maior concentração ( $0,0085 \text{ g mL}^{-1}$ ) para atingir os mesmos valores de açúcares totais. Pode ser observado, também, que a enzima que apresenta maior atividade não necessariamente é a que promove uma maior liberação de açúcares, pois as quatro enzimas apresentaram atividades celulolíticas bem distintas entre si e todas promoveram uma mesma liberação de açúcares totais.

Tabela 6 - Concentrações e atividades das enzimas; concentração média de açúcares e desvio padrão, liberados de acordo com o pré-tratamento ácido ou básico, seguido de autoclave  $121^\circ\text{C}$  por 30 minutos

Enzimas	Concentração $\text{g mL}^{-1}$	Atividade (FPU $\text{mL}^{-1}$ )	Pré- -tratamentos	Concentração média dos açúcares ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
HPL1800	0,0048	92,5	Ácido	$7,85 \pm 1,90$
			Base	$14,58 \pm 1,73$
			Controle	$3,95 \pm 0,44$
CL3708	0,0085	52,24	Ácido	$10,60 \pm 6,68$
			Base	$14,55 \pm 0,76$
			Controle	$4,46 \pm 0,28$
P1250	0,0024	185	Ácido	$8,21 \pm 1,08$
			Base	$19,03 \pm 2,33$
			Controle	$4,33 \pm 0,45$
P4500	0,0010	444	Ácido	$7,38 \pm 1,38$
			Base	$19,95 \pm 1,33$
			Controle	$4,65 \pm 1,19$

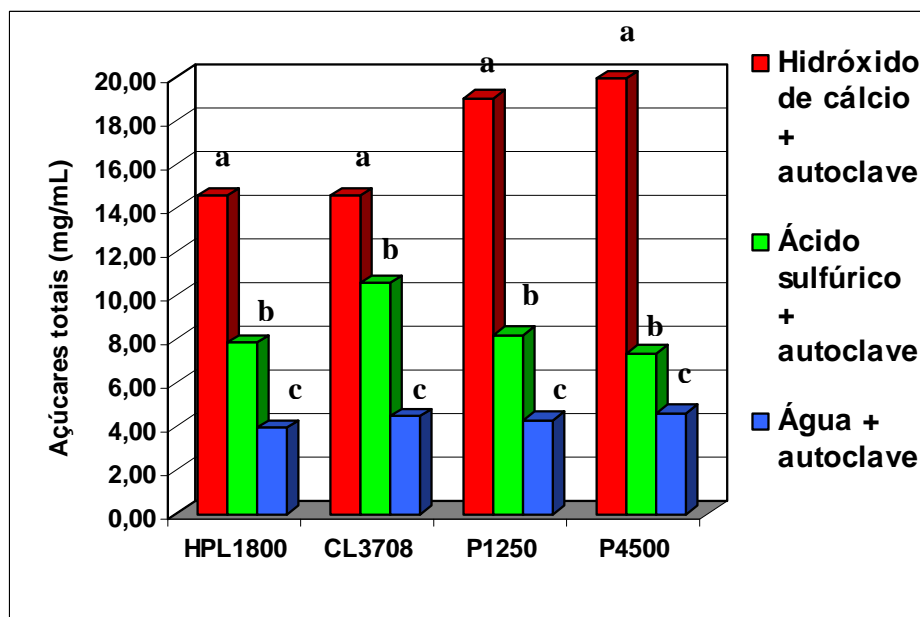


Figura 2 - Ação de diferentes enzimas sobre os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância)

No entanto, ao analisar a ação conjunta das quatro enzimas com os três pré-tratamentos, verificam-se valores, em mg de açúcares por mL de hidrolisado, entre: 25,88 e 29,11 no tratamento ácido; 13,81 e 19,22 no tratamento alcalino; e 3,95 e 4,65 no controle (Tabela 7 e Figura 3). Por meio desses valores verifica-se que a atuação conjunta das enzimas com pré-tratamento é superior no conjunto enzimas e pré-tratamento ácido na ordem de 6,3 - 6,5 e 1,5 - 1,9 vezes em relação aos conjuntos enzimas e pré-tratamento controle e enzimas e pré-tratamento básico, respectivamente.

Os dados também foram analisados pelo programa SAS podendo ser observado que os pré-tratamentos diferem entre si ao nível de 5% de significância, sobressaindo uma maior ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico 0,5% (121°C por 30 minutos) dentre as enzimas utilizadas. Verificou-se, também, que não ocorre diferença estatística, ao nível de 5% de significância, entre as enzimas dentro dos pré-tratamentos utilizados.

Tabela 7 - Concentrações e atividades das enzimas; concentração média de açúcares e desvio padrão, liberados de acordo com a ação conjunta das enzimas e pré-tratamento ácido ou básico, seguido de autoclave 121°C por 30 minutos

Enzimas	Concentração (g mL <sup>-1</sup> )	Atividade (FPU mL <sup>-1</sup> )	Pré-tratamentos	Concentração média dos açúcares (mg mL <sup>-1</sup> )
HPL1800	0,0048	92,5	Ácido	26,35 ±1,62
			Base	13,84 ±1,82
			Controle	3,95 ±0,44
CL3708	0,0085	52,24	Ácido	29,11 ±6,19
			Base	13,81 ±0,72
			Controle	4,46 ±0,28
P1250	0,0024	185	Ácido	26,71 ±1,07
			Base	18,29 ±2,30
			Controle	4,33 ±0,45
P4500	0,0010	444	Ácido	25,88 ±1,76
			Base	19,22 ±1,40
			Controle	4,65 ±1,19

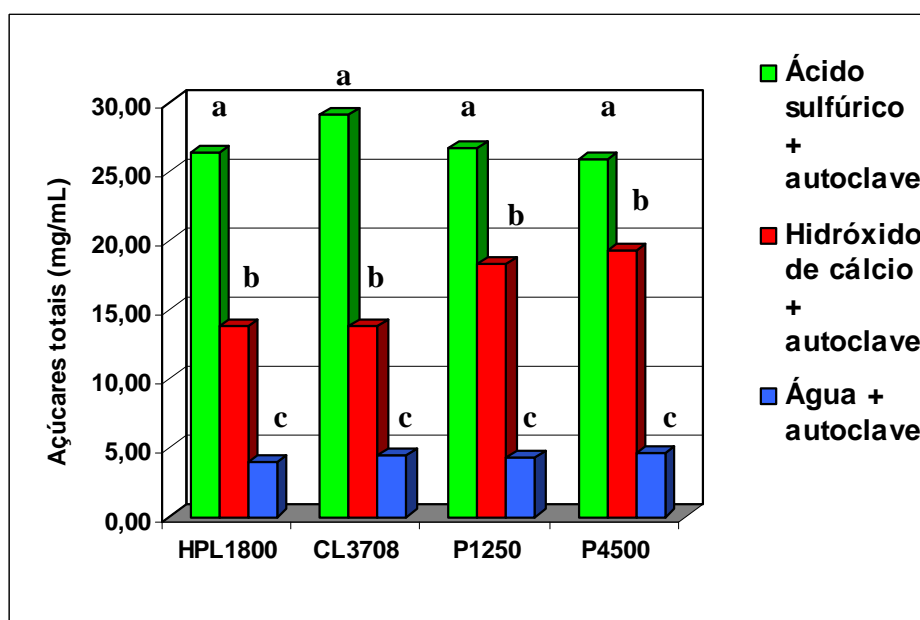


Figura 3 - Ação conjunta das enzimas e dos diferentes pré-tratamentos sobre o bagaço de cana-de-açúcar (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância)

#### 4.4 Determinação e identificação de açúcares no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por HPAEC

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida (HPAEC - PAD) em três repetições (Anexo E), visando não só comparar os resultados obtidos pela quantificação de açúcares totais por DNS como, também, identificar os tipos de açúcares presentes.

Com o auxílio da cromatografia líquida verificou-se que a quantidade de açúcares totais liberados na amostra que apenas recebeu o pré-tratamento ácido (branco ácido) foi de 4,19 mg de açúcar mL<sup>-1</sup> de hidrolisado, enquanto que nas amostras tratadas com enzima e ácido os valores de açúcares totais se encontram entre 5,743 e 6,527 mg mL<sup>-1</sup>. Para o tratamento alcalino o valor da amostra considerada como branco (tratada apenas com base) foi de 0,023 mg de açúcar mL<sup>-1</sup> de hidrolisado, enquanto que nas amostras tratadas com enzima e base os valores de açúcares totais se encontram entre 2,103 e 4,363 mg mL<sup>-1</sup>. Esses resultados demonstram a eficiência do pré-tratamento com ácido sulfúrico, temperatura e posterior hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares, sendo de 2,7 – 1,5 vezes superior em relação ao conjunto pré-tratamento alcalino e enzimas (Tabela 8 e Figura 4).

Os dados foram analisados pelo programa estatístico (SAS) com relação a produção de açúcares totais, e foi observado que os pré-tratamentos diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, sobressaindo o pré-tratamento ácido. Ao aplicar o teste de Tukey entre as enzimas, observou-se que as enzimas P1250 e P4500 não diferem estatisticamente entre si; porém ambas são diferentes, ao nível de 5% de significância, das enzimas HPL1800 e CL3708. As enzimas HPL1800 e CL3708 não diferem estatisticamente entre si. Apesar de o teste ter indicado uma melhor ação das enzimas P1250 e P4500, a última continua sendo a mais eficiente no processo devido a necessidade de uma menor concentração para atingir valores praticamente idênticos em relação às outras enzimas.

Devido o teste F ter sido significativo ao analisar a interação pré-tratamentos e enzimas, realizou-se uma análise de comparação múltipla entre os dois fatores. Através dos resultados é possível verificar que dentro do tratamento (base + enzima) sobressaiu tanto o conjunto pré-tratado com álcali e a enzima P1250, quanto o álcali e a enzima P4500. Nenhum dado significativo foi verificado no conjunto pré-tratamento ácido e enzimas.

Através da análise por cromatografia líquida foi possível comprovar que apenas com o



pré-tratamento já é possível determinar pequenas quantidades de açúcares, predominando a xilose ( $3,507 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e, posteriormente, arabinose ( $0,330 \text{ mg mL}^{-1}$ ), glicose ( $0,270 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e galactose ( $0,083 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no pré-tratamento ácido. No caso do pré-tratamento alcalino, predominou glicose ( $0,013 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e xilose ( $0,010 \text{ mg mL}^{-1}$ ); no entanto, não foram quantificados a presença de arabinose e galactose. Ao comparar os valores do branco ácido e branco base com a amostra pré-tratada com água a  $121^\circ\text{C}$  por 30 minutos, considerada como branco, observa-se que o valor de açúcares totais produzidos é idêntico ao do branco base ( $0,023 \text{ mg de açúcar mL}^{-1}$ ), diferenciando-se apenas pela presença do açúcar galactose.

Na identificação dos açúcares presentes nas amostras verificou-se a predominância das pentoses (açúcares compostos por cinco carbonos) xilose e arabinose, e das hexoses (açúcares compostos por seis carbonos) glicose e galactose tanto no tratamento ácido, como no alcalino. Os valores de pentoses obtidas no tratamento ácido com enzimas estiveram entre  $3,950 - 4,623 \text{ mg mL}^{-1}$ ; enquanto que no tratamento alcalino com enzimas esses valores variaram entre  $0,437 - 2,410 \text{ mg mL}^{-1}$ . No caso das hexoses essas variações foram de  $1,793 - 1,903 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $1,210 - 1,953 \text{ mg mL}^{-1}$  nos tratamentos ácido com enzimas e alcalino com enzimas, respectivamente (Tabela 8 e Figura 4).

Tabela 8 - Média e desvio padrão dos açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose; hexoses (C6); pentoses (C5) e açúcares totais presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar determinado por cromatografia líquida

Amostras	Média (mg mL <sup>-1</sup> )				Açúcares C6 mg mL <sup>-1</sup>	Açúcares C5 mg mL <sup>-1</sup>	Açúcares totais mg mL <sup>-1</sup>
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose			
HPL1800 (ácido)	0,327 ± 0,025	0,093 ±0,006	1,620 ±0,171	4,073 ±0,142	1,713	4,400	6,113
CL3708 (ácido)	0,337 ±0,031	0,087 ±0,006	1,707 ±0,140	3,613 ±0,057	1,793	3,950	5,743
P1250 (ácido)	0,333 ±0,038	0,060 ±0,052	1,843 ±0,098	4,290 ±0,185	1,903	4,623	6,527
P4500 (ácido)	0,307 ±0,040	0,090 ±0,017	1,747 ±0,195	4,050 ±0,344	1,837	4,357	6,193
Branco Ácido	0,330 ±0,017	0,083 ±0,006	0,270 ±0,026	3,507 ±0,117	0,353	3,837	4,190
HPL1800 (base)	0,190 ±0,044	0,000	1,210 ±0,338	1,103 ±0,021	1,210	1,293	2,503
CL3708 (base)	0,230 ±0,017	0,000	1,667 ±0,103	0,207 ±0,035	1,667	0,437	2,103
P1250 (base)	0,267 ±0,025	0,000	1,850 ±0,240	2,013 ±0,167	1,850	2,280	4,130
P4500 (base)	0,267 ±0,038	0,000	1,953 ±0,139	2,143 ±0,125	1,953	2,410	4,363
Branco Base	0,000	0,000	0,013 ±0,023	0,010 ±0,017	0,013	0,010	0,023
Branco	0,000	0,010 ±0,017	0,010 ±0,017	0,003 ±0,006	0,020	0,003	0,023

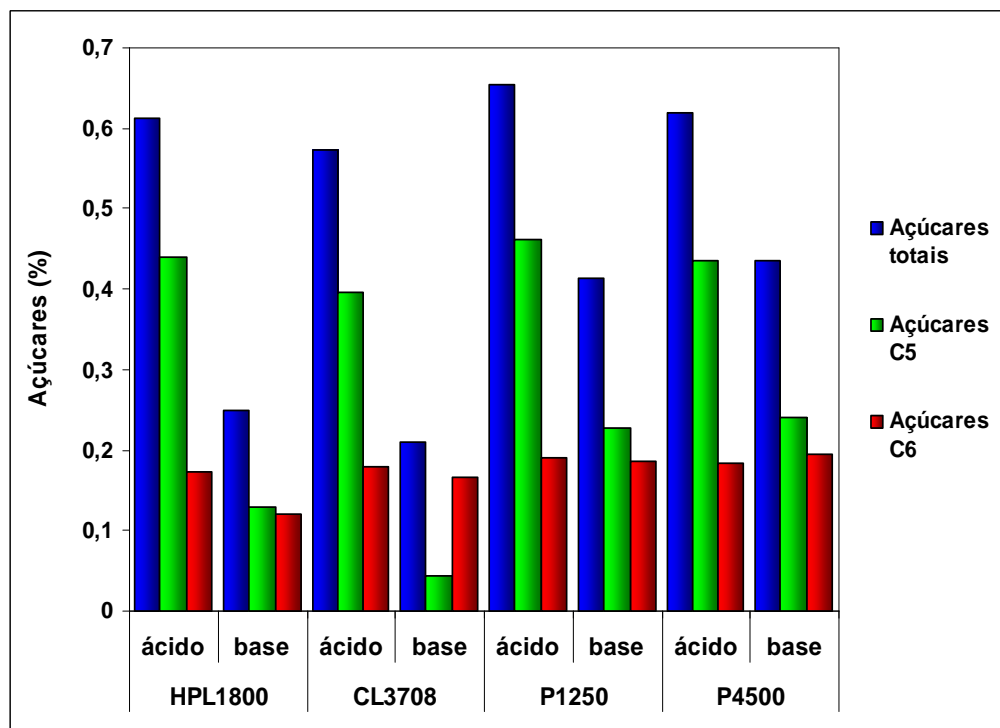


Figura 4 - Porcentagem de açúcares totais, pentoses e hexoses presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em cada tratamento com ácido, base e enzima

Verificou-se que o tratamento ácido com enzimas contribuiu para uma maior formação de pentoses (C5), provenientes da degradação da fração hemicelulose do bagaço, em relação ao tratamento alcalino com enzimas. Já as hexoses (C6), glicose e galactose, apresentaram valores próximos entre si tanto no tratamento ácido com enzimas como no alcalino com enzimas (Tabela 8).

Como pode ser observado pela Figura 4, dentre os açúcares totais quantificados em todos os hidrolisados, houve predomínio de pentoses (arabinose e xilose). Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* não conseguem fermentar esses dois tipos de açúcares e, no entanto, seria necessário utilizar outros tipos de microrganismos ou, então, empregar técnicas de transformações genéticas visando encontrar linhagens capazes de fermentarem xilose e arabinose para a obtenção de etanol.

Através da quantificação de hexoses e pentoses, obtidas por HPAEC, foi possível realizar uma avaliação para cada açúcar. No tratamento ácido com enzima (considerados a melhor forma de tratamento) é possível obter por Kg de bagaço seco de 64 a 71 g de açúcares C6 e 148 a 173 g

de açúcares C5, aproximadamente. Já no tratamento alcalino com enzima é possível obter de 45 a 73 g de açúcares C6, e 16 a 90 g de açúcares C5, aproximadamente, (Figura 5). De acordo com estudos, é esperada a obtenção de cerca de 40 a 50 g de glicose por Kg de bagaço, quando se utiliza enzimas celulolíticas para a hidrólise parcial da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar (AMORIM, 2005).

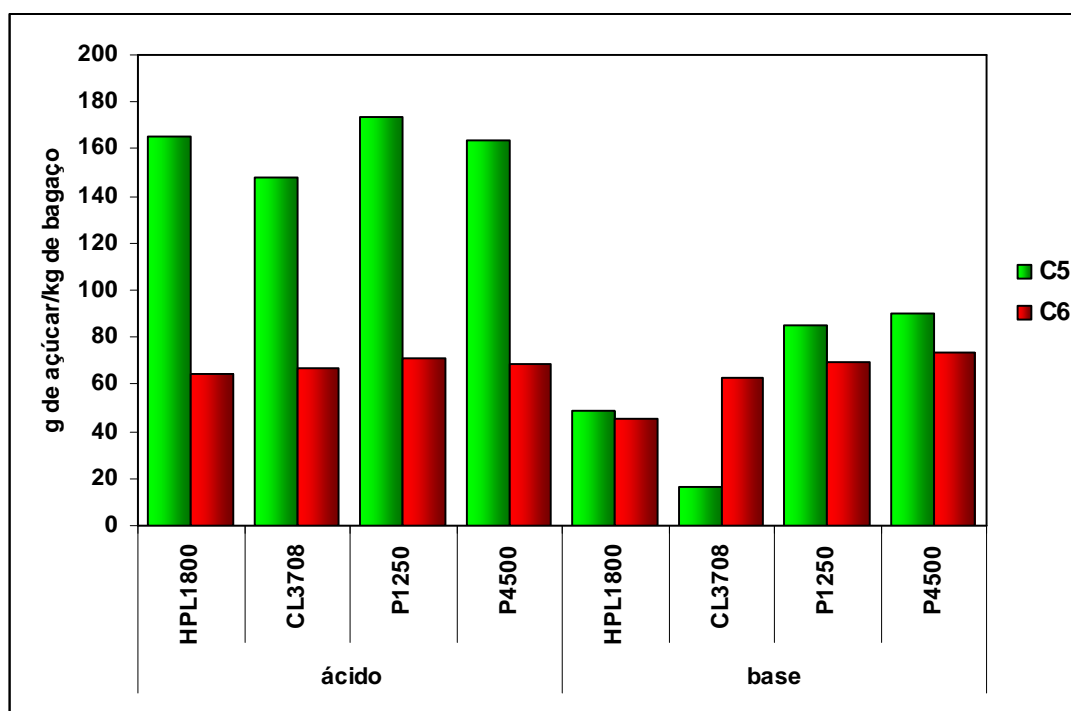


Figura 5 - Pentoses e hexoses ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos diferentes tratamentos com ácido, base e enzimas no bagaço

#### 4.5 Comparação da quantificação de açúcares totais pelas metodologias HPAEC e DNS

Ao comparar as duas metodologias de quantificação de açúcares observa-se que as médias obtidas pela metodologia por DNS apresentam valores maiores (da ordem de 4,1 a 6,6 vezes) em relação a metodologia por HPAEC – PAD (Figura 6). Observa-se que a metodologia de quantificação por cromatografia líquida (HPAEC – PAD) apresenta melhor exatidão quando comparada com a metodologia por DNS, pois a glicose resultante do processo de hidrólise é quantificada separadamente dos outros carboidratos, e também porque o detector amperométrico foi programado de forma a determinar especificamente carboidratos. Para comparar as duas metodologias de forma mais precisa seria necessário estar tratando o hidrolisado visando a retirada de compostos que possam estar sendo reduzidos (sem serem açúcares) e, conseqüentemente, interferindo na metodologia colorimétrica. Rivers et al. (1983) relatam que subprodutos do processo de pré-tratamento do bagaço, como 5-hidroximetilfurfurol e furfurol, são capazes de fornecerem grupos redutores reativos e, conseqüentemente, interferirem na coloração do hidrolisado. Outros interferentes que podem ser encontrados no hidrolisado são aldeídos de baixo peso molecular que também fornecem grupos redutores reativos causando erros quantitativos significativos.

Materiais lignocelulolíticos hidrolisados por substâncias químicas líquidas são mais complexos de serem analisados quando comparados com materiais celulósicos purificados, devido a presença de taninos e tintas liberadas como conseqüência da hidrólise resultando, assim, em interferentes na metodologia colorimétrica (RIVERS et al., 1983).

Schwald et al. (1988) relatam que os métodos colorimétricos, utilizados na quantificação de açúcares redutores, mesmo sendo rápidos e convenientes, não são capazes de determinar a composição ou o grau de polimerização dos açúcares formados durante o curso da reação enzimática. Na maioria das vezes, os produtos resultantes da reação são estimados em equivalentes de glicose; no entanto os coeficientes de absorção da glicose, celobiose e dextrinas com elevado grau de polimerização não são idênticos quando os valores são determinados na base do mesmo peso. Esse fato também pode causar erros quantitativos significativos na metodologia por DNS.

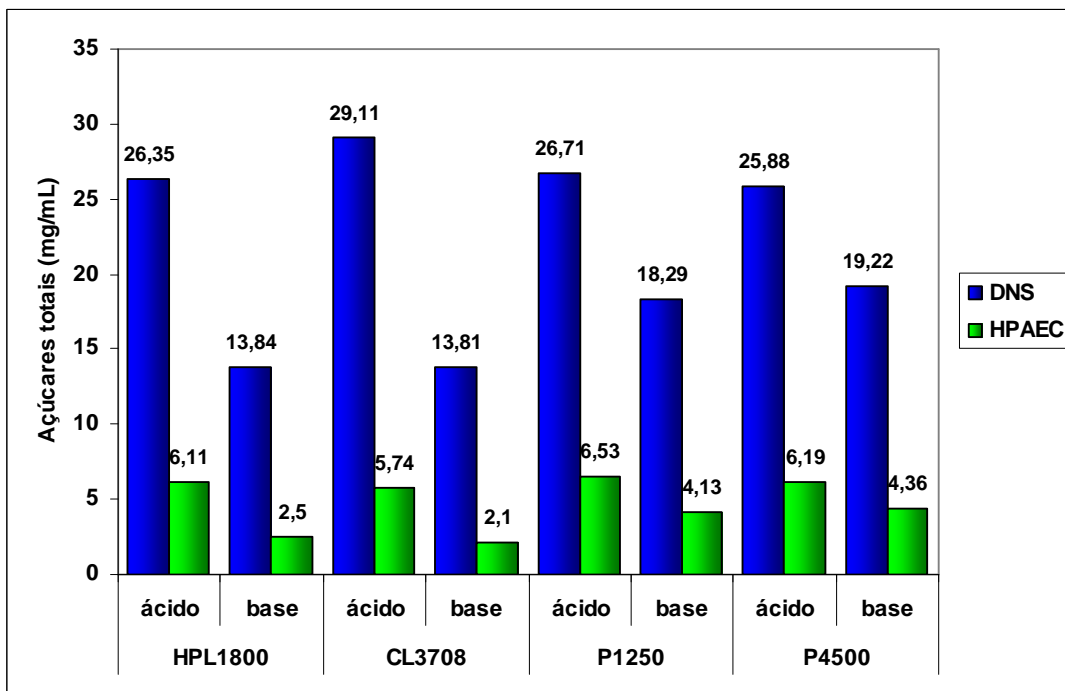


Figura 6 - Comparação das metodologias DNS e HPAEC na avaliação de açúcares liberados (mg mL<sup>-1</sup>)

## 5 CONCLUSÃO

- Os resultados permitem concluir que as enzimas HPL1800, CL3708, P1250 e P4500 são viáveis para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Apesar de não haver diferença estatística entre as quatro enzimas, a enzima Ecostone P4500 foi a mais eficiente no processo de conversão da celulose e hemicelulose em açúcares, pois necessitou de uma menor diluição ( $0,0010 \text{ g mL}^{-1}$ ) para atingir valores estatisticamente idênticos as demais enzimas.
- A enzima que apresenta maior atividade não necessariamente é a que promove uma maior liberação de açúcares, pois as quatro enzimas apresentaram atividades celulolíticas bem distintas e, mesmo assim, todas promoveram mesma liberação de açúcares totais.
- A atuação conjunta do pré-tratamento com ácido sulfúrico e enzimas (de acordo com a metodologia do DNS) é em torno de 1,5 a 1,9 vezes superiores em relação ao conjunto enzimas e pré-tratamento com hidróxido de cálcio; e 6,3 a 6,5 vezes maiores quando comparado com o conjunto enzimas e pré-tratamento controle. Verifica-se, assim, a importância do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar antes da sacarificação enzimática.
- O pré-tratamento do bagaço com ácido sulfúrico 0,5% e autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos contribui para uma maior eficiência do processo de hidrólise pelas enzimas.
- Dentre os açúcares totais quantificados por HPAEC no hidrolisado, houve predomínio de pentoses (arabinose e xilose). No tratamento com ácido e enzimas (considerados a melhor forma de tratamento) é possível obter, em Kg de bagaço seco, de: 64 a 71 g de açúcares C6 e 148 a 173 g de açúcares C5.

## REFERÊNCIAS

ABD-EL-NASSER, N.H.; HELMY, S. M.; EL GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 55, n. 7, p. 249-255, 1997.

ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of cellulose activities**: chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure, 1996. Disponível em: <http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/research/LAP-006.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2008.

AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R.A.; SILVA, H.; LAPIERRE, C.; CEASE, K.R.; IBACH, E.; RABAD, A.R.; MUGA, P. Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. **Applied and Environmental Microbiology**, Saint Paul, v. 56, p. 65-74, 1990.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

ANGELO, R.S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO J.L. de (Org.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 8, p. 263-288.

AMORIM, H.V. de (Org.). **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPÓSITO, E.; \_\_\_\_\_. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 5, p. 173-214.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 104, n. 1238, 2002.



BAUDEL, H.M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE: HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, PROJETO PROGRAMA DE PESQUISAS EM POLÍTICAS PÚBLICAS. 3; 2006, Campinas. **Palestra...** Campinas: UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2008.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, p. 90-104, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento. **Cana-de-açúcar: safra 2007/2008**. Brasília, 2007. (Terceiro Levantamento).

CHAHAL, D.S. Production of *Trichoderma reesei* cellulase system with high hydrolytic potential by solid-state fermentation. In: LEATHAM, G.F.; HIMMEL, M.E. (Ed.). **Enzymes in biomass conversion**. Washington, ed. 1991, p. 111-122. (Acs Symposium Series, n. 460).

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 10, p. 1947 – 1950, 2006.

CHANDEL, A.K.; ES, C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M.L.; RAO, L.V.; RAVINDRAS, P. Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Nairobi, v. 2, p. 14-32, 2007.

CHONG, A.R.; RAMÍREZ, A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 61, p. 143-152, 2004.

CORREDOR, D.Y.; BEAN, S.R.; WANG, D.; Pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum fiber. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 84, p. 61 – 66, 2006.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 111-146, 1992.

DA SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 77, p. 109-111, 1994.

DUARTE, A.; BATISTA, A.C.; LEANDRO, J.; MACHADO, P. **Organismos geneticamente modificados: aplicações industriais**. Lisboa: Faculdade de Ciência e Tecnologia; Universidade Nova de Lisboa, 2003. 53 p. (Aplicações da Engenharia Genética).

DUNNILL, P. The current status of enzyme technology. In: DUNNILL, P.; WISEMAN, A.; BLAKEBROUGH, N. (Ed.). **Enzymic and non- enzymic catalysis**. Chichester: Ellis Horwood, 1980. p. 28-53.

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied in Biotechnology and Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 257-266, 1993.

FERNANDES, J.N. Enquadramento legal e institucional dos microrganismos e organismos geneticamente modificados (MGM/OGM) em Portugal e na União Européia. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 70, p. 33 – 37, 2001.

FERNANDES-SALOMÃO; T. M.; AMORIM, A. C. R.; CHAVES-ALVES, V. M.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*.; **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 1518, 1996.

FERRAZ, A.; DURÁN, N.; Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 6, p. 265-270, 1995.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; DURÁN, M. Softwood biodegradation by ascomycete *Chrysonila sitophila* (TFB 27441 strain). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 89-91, 1991.

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

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPÓSITO E.; AZEVEDO, J.L. de (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, cap. 6, p. 215-244.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Enzyme technology**. New York : Open University Press: Taylor & Francis, New York, 185 p., 1987, (Biotechnology Series).

GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**., v. 52, p. 4172-4177, 2004. Disponível em: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jafcau/2004/52/i13/abs/jf035456p.html>. Acesso em: 20 jun. 2008

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: United States Department of Agriculture, 1970. 379 p. (Agriculture Handbook).

GONG, C.S.; TSAO, G.T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Process**, New York, v. 3, p. 111-139, 1975.

GONG, C.S.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of *Trichoderma reesei*. **Advances in Chemistry**, Washington, v. 181, p. 261 – 287, 1979.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, New York, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TCW-4M4CMSD-1&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=282f07e637b9e6d2d0a9d1e90e7719ed](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCW-4M4CMSD-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=282f07e637b9e6d2d0a9d1e90e7719ed). Acesso em: 20 jun. 2008.

HOLLAND, I.B.; MacKMAN, N.; NICAUD, J-M. Secretion of proteins from bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 4, p. 427-431, 1986. Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v4/n5/abs/nbt0586-427.html>. Acesso em: 20 jun. 2008.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R.A.; AKHTAR M. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: Wiley Publishers, 1998. p. 273-308.

KOBLITZ, M.G.B.; PASTORE, G.M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 1991. 839 p.

LEMONS, M.A.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, M.R.M.; MOTA M.; GAMA, F.M. The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 35-40, 2003.

LEWIS, C.; KRISTIANSEN, B. Chemicals manufacture via biotechnology – the prospects for Western Europe. **Chemistry and Industry**, London, p. 571-576, 1985.

LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1216-1223, 1987. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203844>. Acesso em: 20 jun. 2008.

MANDELS, M. Microbial sources of cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, 5, p. 81-105, 1975.

MANDELS, M.; PARRISH, F.W.; REESE, E.T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, n. 2, p. 400-408, 1962. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=277742>. Acesso em: 20 jun. 2008.

MARIS, A.J.A. van; ABBOTT, D.A.; BELLISSIMI, E.; BRINK, J. van den; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; DIJKEN, J.P. van; PRONK, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, New York, v. 90, n. 4, 2006.

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

MARTÍN, C.; GONZÁLEZ, Y.; FERNÁNDEZ, T.; THOMSEN, A.B. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 81, p. 1669-1677, 2006.

MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 139 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 59, n. 5, 1998.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

OLIVEIRA, M. de; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial: novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 122, 2006. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?ed=155&lg=>. Acesso em: 18 dez. 2006.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄIGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 65-74, 1991. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6THB-4B540GN-2&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=6da30657b6b342be53dbfa792edbc5db](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6THB-4B540GN-2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6da30657b6b342be53dbfa792edbc5db). Acesso em: 20 jun. 2008.

PESSOA JÚNIOR., A.; MANCILHA, I.M. de; SATO, S. Evaluation of sugar hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 360-363, 1997.

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

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

RODRÍGUEZ, J.; FERRAZ A.; NOGUEIRA, R.P.; FREER, J.; ESPOSITO; DURÁN, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 62, p. 233-242, 1997.

SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J.N. Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, p. 398-403, 1988.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. 74p, Thesis (M. S.) - Lund University, Sweden, 2005.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Impr. Univ. UFV, 1998, 166p.

SILVA, D.M.; DILLON, A.J.P. Produção de celulases em fermentação semisólida por uma linhagem de *Trichoderma sp.* In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 1988, **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. 54 p.

SMITH J.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B. **The filamentous fungi** – fungal technology. London: Edward Arnold, v. 4, 1983, 416 p.

STEVENS, B.J.H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **Journal of General Microbiology**, London v. 100, p. 381-393, 1977.

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

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agriculture Chemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 829-35, 1963.

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

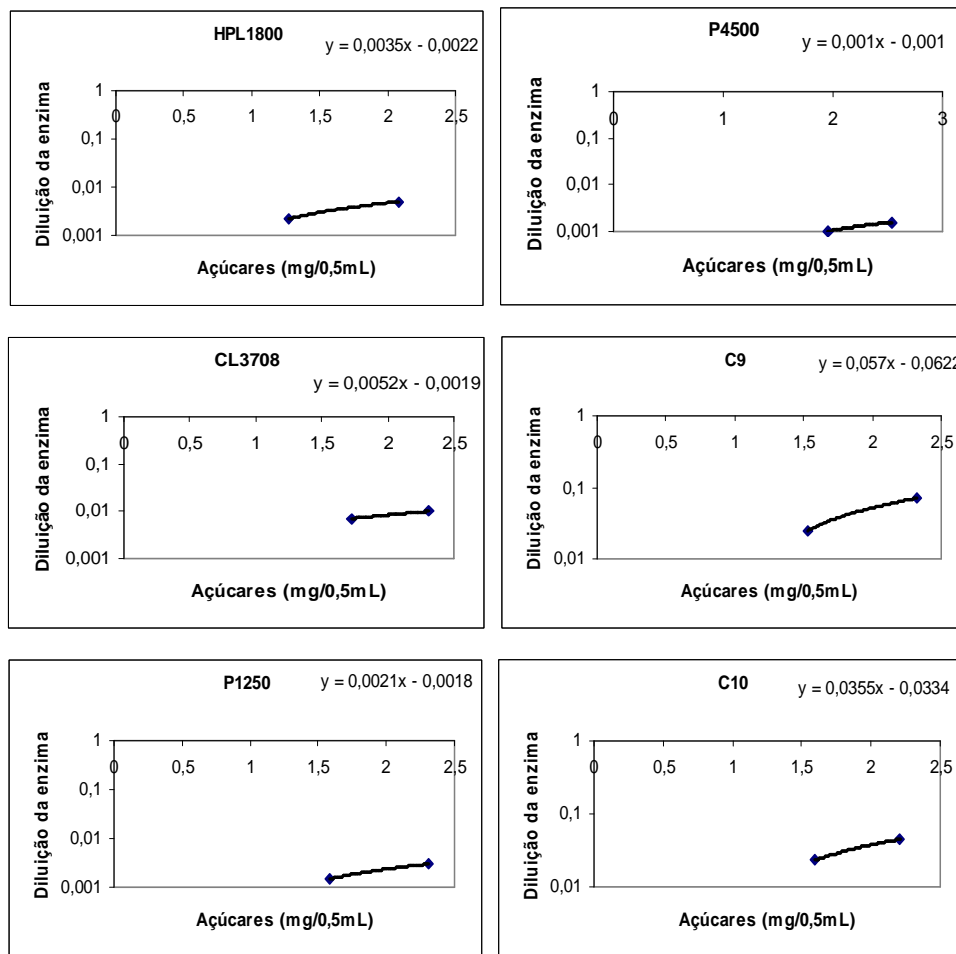
ZHANG, Y.P.; LYND, L.R. Toward an Aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 7, 2004.

## **ANEXOS**



ANEXO A - Concentração de enzimas ( $\text{g mL}^{-1}$ ), em duas diluições; repetições das absorvâncias e açúcares liberados ( $\text{mg } 0,5\text{mL}^{-1}$ ) de cada diluição; média de açúcares e desvio padrão ( $\text{mg } 0,5\text{mL}$ ) das duas diluições de cada enzima

Enzimas	Diluição ( $\text{g mL}^{-1}$ )	Repetições	Leituras	Açúcar ( $\text{mg } 0,5\text{mL}^{-1}$ )	Média
HPL1800	1 <sup>a</sup> (0,005)	1 <sup>a</sup>	0,264	2,21	2,08 $\pm$ 0,14
		2 <sup>a</sup>	0,252	2,11	
		3 <sup>a</sup>	0,230	1,93	
	2 <sup>a</sup> (0,0022)	1 <sup>a</sup>	0,136	1,15	1,27 $\pm$ 0,11
		2 <sup>a</sup>	0,162	1,37	
		3 <sup>a</sup>	0,154	1,30	
CL3708	1 <sup>a</sup> (0,01)	1 <sup>a</sup>	0,268	2,24	2,31 $\pm$ 0,07
		2 <sup>a</sup>	0,278	2,32	
		3 <sup>a</sup>	0,285	2,38	
	2 <sup>a</sup> (0,007)	1 <sup>a</sup>	0,201	1,69	1,73 $\pm$ 0,05
		2 <sup>a</sup>	0,203	1,71	
		3 <sup>a</sup>	0,213	1,79	
P1250	1 <sup>a</sup> (0,003)	1 <sup>a</sup>	0,267	2,23	2,31 $\pm$ 0,19
		2 <sup>a</sup>	0,302	2,52	
		3 <sup>a</sup>	0,259	2,17	
	2 <sup>a</sup> (0,0015)	1 <sup>a</sup>	0,181	1,52	1,59 $\pm$ 0,06
		2 <sup>a</sup>	0,193	1,62	
		3 <sup>a</sup>	0,194	1,63	
P4500	1 <sup>a</sup> (0,0016)	1 <sup>a</sup>	0,295	2,46	2,53 $\pm$ 0,06
		2 <sup>a</sup>	0,310	2,59	
		3 <sup>a</sup>	0,303	2,53	
	2 <sup>a</sup> (0,001)	1 <sup>a</sup>	0,244	2,04	1,95 $\pm$ 0,08
		2 <sup>a</sup>	0,229	1,92	
		3 <sup>a</sup>	0,226	1,89	
C9	1 <sup>a</sup> (0,07)	1 <sup>a</sup>	0,275	2,30	2,32 $\pm$ 0,08
		2 <sup>a</sup>	0,289	2,41	
		3 <sup>a</sup>	0,270	2,26	
	2 <sup>a</sup> (0,025)	1 <sup>a</sup>	0,183	1,54	1,53 $\pm$ 0,02
		2 <sup>a</sup>	0,179	1,51	
		3 <sup>a</sup>	0,184	1,55	
C10	1 <sup>a</sup> (0,045)	1 <sup>a</sup>	0,249	2,08	2,21 $\pm$ 0,13
		2 <sup>a</sup>	0,280	2,34	
		3 <sup>a</sup>	0,264	2,21	
	2 <sup>a</sup> (0,023)	1 <sup>a</sup>	0,176	1,48	1,59 $\pm$ 0,11
		2 <sup>a</sup>	0,188	1,58	
		3 <sup>a</sup>	0,203	1,71	



ANEXO B - Interpolação das duas diluições da concentração de cada enzima ( $\text{g mL}^{-1}$ ) para obter a concentração necessária visando a liberação de, aproximadamente, 2 mg de açúcares por 0,5 mL de solução

ANEXO C - Concentração da enzima e avaliação dos açúcares redutores (em três repetições) considerando apenas a ação das enzimas, em diferentes pré-tratamentos (ácido ou básico), seguido de autoclave 121°C por 30 minutos

Enzimas	Concentração g mL <sup>-1</sup>	Pré- -tratamentos	Açúcares totais (mg mL <sup>-1</sup> )		
			1 <sup>a</sup> Repetição	2 <sup>a</sup> Repetição	3 <sup>a</sup> Repetição
HPL1800	0,0048	Ácido	6,33	9,98	7,24
		Base	15,74	15,40	12,59
		Controle	3,54	4,42	3,88
CL3708	0,0085	Ácido	5,64	7,96	18,21
		Base	14,45	13,84	15,36
		Controle	4,39	4,77	4,23
P1250	0,0024	Ácido	7,64	9,45	7,54
		Base	17,47	21,70	17,90
		Controle	4,70	4,46	3,82
P4500	0,0010	Ácido	7,80	8,50	5,84
		Base	20,54	20,88	18,43
		Controle	5,02	5,60	3,32

ANEXO D - Concentração da enzima e avaliação dos açúcares redutores (em três repetições) considerando a ação conjunta dos pré-tratamentos (ácido ou base) com enzimas, seguido de autoclave 121°C por 30 minutos

Enzimas	Concentração g mL <sup>-1</sup>	Pré- -tratamentos	Açúcares totais (mg mL <sup>-1</sup> )		
			1 <sup>a</sup> Repetição	2 <sup>a</sup> Repetição	3 <sup>a</sup> Repetição
HPL1800	0,0048	Ácido	25,58	28,21	25,26
		Base	15,13	14,64	11,76
		Controle	3,54	4,42	3,88
CL3708	0,0085	Ácido	24,91	26,19	36,23
		Base	13,83	13,08	14,53
		Controle	4,39	4,77	4,23
P1250	0,0024	Ácido	26,90	27,68	25,56
		Base	16,86	20,94	17,07
		Controle	4,70	4,46	3,82
P4500	0,001	Ácido	27,06	26,73	23,86
		Base	19,92	20,12	17,60
		Controle	5,02	5,60	3,32

ANEXO E - Açúcares presentes no hidrolisado de bagaço quantificado (mg mL<sup>-1</sup>) em HPAEC  
(três repetições)

Amostras	Repetição	Arabinose mg mL <sup>-1</sup>	Galactose mg mL <sup>-1</sup>	Glicose mg mL <sup>-1</sup>	Xilose mg mL <sup>-1</sup>
HPL1800 (ácido)	1 <sup>a</sup>	0,3	0,10	1,44	4,1
	2 <sup>a</sup>	0,33	0,09	1,78	4,2
	3 <sup>a</sup>	0,35	0,09	1,64	3,92
CL3708 (ácido)	1 <sup>a</sup>	0,31	0,09	1,56	3,63
	2 <sup>a</sup>	0,37	0,09	1,72	3,55
	3 <sup>a</sup>	0,33	0,08	1,84	3,66
P1250 (ácido)	1 <sup>a</sup>	0,29	0,09	1,73	4,11
	2 <sup>a</sup>	0,35	0,09	1,9	4,28
	3 <sup>a</sup>	0,36	0,00	1,9	4,48
P4500 (ácido)	1 <sup>a</sup>	0,3	0,08	1,75	4,14
	2 <sup>a</sup>	0,35	0,11	1,94	4,34
	3 <sup>a</sup>	0,27	0,08	1,55	3,67
Branco Ácido	1 <sup>a</sup>	0,31	0,08	0,3	3,64
	2 <sup>a</sup>	0,34	0,08	0,25	3,42
	3 <sup>a</sup>	0,34	0,09	0,26	3,46
HPL1800 (base)	1 <sup>a</sup>	0,24	0,00	1,52	1,08
	2 <sup>a</sup>	0,17	0,00	1,26	1,11
	3 <sup>a</sup>	0,16	0,00	0,85	1,12
CL3708 (base)	1 <sup>a</sup>	0,25	0,00	1,64	0,24
	2 <sup>a</sup>	0,22	0,00	1,58	0,17
	3 <sup>a</sup>	0,22	0,00	1,78	0,21
P1250 (base)	1 <sup>a</sup>	0,29	0,00	1,61	1,88
	2 <sup>a</sup>	0,27	0,00	2,09	2,2
	3 <sup>a</sup>	0,24	0,00	1,85	1,96
P4500 (base)	1 <sup>a</sup>	0,31	0,00	2,07	2,27
	2 <sup>a</sup>	0,25	0,00	1,99	2,14
	3 <sup>a</sup>	0,24	0,00	1,8	2,02
Branco base	1 <sup>a</sup>	0	0,00	0,04	0,03
	2 <sup>a</sup>	0	0,00	0	0
	3 <sup>a</sup>	0	0,00	0	0
Branco	1 <sup>a</sup>	0	0,00	0	0
	2 <sup>a</sup>	0	0,00	0	0
	3 <sup>a</sup>	0	0,03	0,03	0,01

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)