UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Melissa Cristina do Espírito Santo

Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-
açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise
enzimática

São Carlos

2015

Melissa Cristina do Espirito Santo

Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof Dr Eduardo Ribeiro de Azevêdo
Co-orientador: Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Espirito Santo, Melissa
Otimização de estratégias de pré-tratamento de
bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de
segunda geração via hidrólise enzimática / Melissa
Espirito Santo; orientador Eduardo Ribeiro Azevêdo -
versão corrigida -- São Carlos, 2015.
110 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Bietanol. 2. Caracterização. 3. Bagaço de cana-
de-açúcar. 4. Hidrólise enzimática. 5. Pré-tratamento.
I. Azevêdo, Eduardo Ribeiro, orient. II. Título.

Dedico esta dissertação ao concedor da minha vida, Jeová Deus, aos guias da minha trajetória, meus pais, João e Elaine e as compartilhadoras das minhas felicidades, minhas irmãs, Milena (*in memoriam*) e Mariane.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Jeová Deus, por me proporcionar a oportunidade de obter o verdadeiro conhecimento e entesourar a sabedoria prática, agradeço também pela vida e tudo ao seu redor.

Aos meus pais, João e Elaine, pela instrução no caminho da integridade, ao carinho, amor e paciência diária. Às minhas irmãs, Milena *in memoriam* e Mariane, por toda atenção, companheirismo e amizade. Aos meus amigos, Andrea Nogueira, Evandro José Mulinari, Marcelo Pereira, Patrícia Corradini, Felipe Silva, Nathalia Prado, Jonathan e Francielle Moraes pelo companheirismo, amizade e prontidão.

Aos meus primos Flávia, Fábio, Fabiano, Paulo César, Silvana e respectivas famílias, por estarem presentes nos momentos mais difíceis da minha vida, buscando sorrisos nos momentos tristes.

Ao Prof Dr Igor Polikarpov pela confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do grupo de Biotecnologia Molecular, Andre Godoy, Amanda Bernardes, Renata, Vanessa, Caio, Bruno, Marina e César pelos momentos de alegria, descontração e disponibilidade em ajudar o desenvolvimento do projeto. Aos técnicos Maria Auxiliadora, João Possato, Josimar e Livia por toda atenção, paciência e prontidão.

Ao Prof Dr Eduardo Azevedo pela ajuda e disponibilidade no meu ingresso ao mestrado. À Profa Dra Camila Rezende, ao Prof Dr George Jackson, ao Prof Dr Antônio Aprígio, ao Prof Dr Francisco Guimarães, aos doutorando Lísias e Oigres pela disposição e colaboração durante o desenvolver deste trabalho.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura e suporte financeiro.

Aos funcionários da pós-graduação, informática, biblioteca, gráfica e secretaria aos serviços prestados.

Aos funcionários da limpeza, segurança, jardinagem pela manutenção da estrutura e proporcionar a todos um bom ambiente de trabalho.

Ao CNPEM pela infraestrutura utilizada.

À CAPES pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas que indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Se alguém pensa que tem adquirido conhecimento de algo,
ele ainda não conhece como devia conhecer.”

1 Coríntios 8:2

Resumo

ESPIRITO SANTO, M.C. **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Atualmente, o aumento da preocupação com a sustentabilidade ambiental, alinhado às perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo, tem direcionado às buscas por fontes renováveis de energia. O emprego de resíduos agroindustriais, principalmente de usinas sucroalcooleiras destaca-se como sendo uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração. Dentre as metodologias aplicadas para disponibilização dos açúcares fermentescíveis está a hidrólise enzimática. Ainda, para facilitar esta etapa e torná-la mais acessível, submete-se, previamente, o material lignocelulósico a um pré-tratamento, com o objetivo de contribuir com a susceptibilidade da celulose a ataques enzimáticos. No entanto, devido à complexidade das estruturas lignocelulósicas, os processos de hidrólise e pré-tratamento precisam se tornar mais eficientes e economicamente viáveis. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar e caracterizar os pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve (etanol 50%), isoladamente, e estes combinados em diferentes condições, assim como a influência destes procedimentos na estrutura e composição da biomassa, bem como na hidrólise enzimática. Os resultados demonstraram que os pré-tratamentos hidrotérmicos a 160 °C nas condições analisadas foram pouco efetivos na melhora do acesso enzimático durante a etapa de hidrólise, pois atuaram de maneira branda na parede celular, pouco solubilizando a hemicelulose e lignina, conforme as análises físicas comprovaram. Os tratamentos combinados hidrotérmico 30 min e 60 min a 160 °C seguidos pelo organossolve por 150 min apresentaram semelhança morfológica e alta solubilização da lignina e hemicelulose, justificando os valores de hidrólise. Nossos resultados abrem perspectivas de novos estudos que visam a otimização dos pré-tratamentos hidrotérmicos e organossolve, além da compreensão das alterações composicionais e morfológicas que levam à melhoria da hidrólise enzimática na biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: Bioetanol. Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrólise enzimática

Abstract

ESPIRITO SANTO, M.C. **Sugarcane bagasse pretreatment optimization strategies for the production of second generation ethanol via enzymatic hydrolysis**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The concerns with environmental sustainability and perspectives of petroleum reserves depletion motivated exploration of new and sustainable energy sources. In this context, renewable energies start to receive significant attention in the world's energy matrix, with biofuels playing a special role. The use of agro-industrial residues, mainly from the sugarcane industry, stands out as a viable alternative for the production of second-generation ethanol. The enzymatic hydrolysis of the biomass has a number of advantages for polysaccharides depolymerization, such as high substrate specificity, low environmental impact and lack of corrosion issues. To further facilitate this procedure and to make biomass more accessible, the lignocellulosic material has to be previously submitted to a pretreatment in order to increase the cellulose accessibility and susceptibility to the enzymatic action. This process aims at the disorganization of the chemical structure of the lignocellulosic matter, facilitating the further steps of hydrolysis and fermentation. Due to the complexity of the lignocelluloses structures, their pretreatment and hydrolysis processes have to become more efficient and economically viable to be efficiently applied at an industrial scale. Therefore, the objective of this work is to evaluate the hydrothermal and organosolv (50% ethanol) pretreatments, separately and combined in different conditions, and the influence of these procedures on the structure and composition of the biomass and on the efficiency of enzymatic hydrolyses. Our results demonstrated that the hydrothermal pretreatments at 160°C within the analyzed reaction conditions had minor effects on improving the enzymatic efficiency, being not harsh enough to introduce significant modifications of the cell wall composition and structure, as demonstrated by our physical and chemical analyses. The combined hydrothermal treatments lasting 30 min and 60 min at 160°C followed by the organosolv step for 150 min resulted in significant morphological changes and high lignin and hemicelluloses solubilization, resulting in an efficient enzymatic hydrolysis. Our results open perspectives of further studies aimed at optimization of hydrothermal and organosolv pretreatments and comprehension of compositional

and morphological changes which lead to improved enzymatic hydrolysis of the lignocelulosic biomass.

Keywords: Bioethanol. Sugarcane bagasse. Enzymatic hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Arranjo típico da parede celular vegetal.....	27
Figura 2.2 -	Estrutura cristalina e amorfa da celulose.....	28
Figura 2.3 -	Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose.....	29
Figura 2.4 -	Monômeros precursores da lignina (A); estrutura química da lignina de abeto (<i>Picea abies</i>) proposta por Adler (B).....	31
Figura 2.5 -	Estrutura lignocelulósica após processo de pré-tratamento.....	33
Figura 2.6 -	Esquema simplificado da hidrólise da celulose por sistemas celulolíticos.....	39
Figura 4.1.1 -	Modificação na coloração do bagaço.....	59
Figura 4.1.2 -	Distribuição da lignina total separada entre fração solúvel e insolúvel nos diversos pré-tratamentos aplicados.....	63
Figura 4.2.1 -	Difratograma obtido para amostra de bagaço de cana <i>in natura</i>	64
Figura 4.2.2 -	Relação do índice de cristalinidade e celulose presente nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e <i>in natura</i>	65
Figura 4.3.1 -	Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra controle (<i>in natura</i>) e para a amostra sem os extrativos.....	67
Figura 4.3.2 -	Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra hidrotermicamente pré-tratadas em diferentes tempos	68
Figura 4.3.3 -	Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas com organossolve.....	69
Figura 4.3.4 -	Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas hidrotermicamente durante 30 minutos combinado com organossolve em diferentes tempos.....	70
Figura 4.3.5 -	Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas hidrotermicamente durante 60 minutos e com organossolve em diferentes tempos.....	70
Figura 4.3.6 -	Relação do índice de cristalinidade e celulose presente nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e <i>in natura</i> por RMN e difração de raios x.....	71
Figura 4.3.7 -	Relação do índice de cristalinidade nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e <i>in natura</i> com o IC do Avicel por RMN e difração de raios x.....	72
Figura 4.4.1 -	Imagens da superfície de amostras de bagaço <i>in natura</i> obtidas por FESEM: (a) aspecto geral da amostra mostrando fibras e também resíduos; (b) ampliação sobre um resíduo e (c) ampliação na superfície de uma fibra.....	73
Figura 4.4.2 -	Imagens da superfície de amostras de bagaço antes e após pré-tratamentos obtidas por FESEM: (a-c) bagaço <i>in natura</i> ; (d-f) bagaço tratado com organossolve por 50 min e (g-i) com tratamento hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 150 min.....	74

Figura 4.4.3 -	Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos em diferentes condições obtidas por FESEM: (a-c) hidrotérmico por 0 min, (d-f) hidrotérmico por 60 min; (g-i) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 50 min; (j-l) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 150 min.....	76
Figura 4.4.4 -	Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos organossolve em diferentes tempos obtidas por FESEM: (a-c) Organossolve 50 minutos, (d-f) Organossolve 150 min.....	78
Figura 4.4.5 -	Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos em diferentes condições experimentais obtidas por FESEM (a) hidrotérmico por 30 min seguido de organossolve por 150 min, (b) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 50 min e (c) organossolve por 150 minutos.....	79
Figura 4.5.1 -	Imagem de microscopia confocal no modo de intensidade para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (a); Detalhe ampliado da estrutura fibrilar o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (b).....	80
Figura 4.5.2 -	Imagens de microscopia confocal para o pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C em diferentes tempos de reação (A) <i>in natura</i> ; (B) 0 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 60 min	82
Figura 4.5.3 -	Imagem de um corte confocal após sofrer a classificação espectral de uma fibra isolada, decorrido o tratamento hidrotérmico por 30 min a 160 °C.....	84
Figura 4.5.4 -	Imagens de tempo de vida fluorescência para o tratamento hidrotérmico a 160 °C (B), 30 (C), 45 (D) e 60 min (E) comparados com a amostra referência (A).....	85
Figura 4.5.5 -	Principais mudanças no tempo de vida das imagens FLIM.....	87
Figura 4.5.6 -	Imagens de microscopia confocal para as amostras tratadas com organossolve em diferentes tempos, 50 (B), 100 (C) e 150 min (D) em comparação com a amostra <i>in natura</i> (A).....	88
Figura 4.5.7 -	Imagem de um corte confocal de fibras isoladas da amostra pré-tratada por organossolve por 100 min a 190 °C.....	89
Figura 4.5.8 -	Distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM.....	90
Figura 4.5.9 -	Imagens de microscopia confocal dos efeitos dos tratamentos combinados iniciados com hidrotérmico por 30 min seguidos por organossolve por 50 min (B), 100 min (C) e 150 min (D) em comparação com a <i>in natura</i> (A).....	92
Figura 4.5.10 -	Imagem espectral (A) e imagem FLIM correspondente (B) da amostra pré-tratada com hidrotérmico por 30 min seguido de organossolve por 150 min. (C) Distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM para todas as amostras de tratadas hidrotérmicamente por 30 min combinado com organossolve a 50, 100 e 150 min.....	93
Figura 4.5.11 -	Imagens de microscopia confocal dos efeitos dos tratamentos combinados iniciados com hidrotérmico por 60 min seguidos por organossolve por 50 min (B), 100 min (C) e 150 min (D) em comparação com a <i>in natura</i> (A).....	95
Figura 4.6.1 -	Eficiência de hidrólise enzimática nas amostras pré-tratadas após 12, 24, 48 e 72 h de hidrólise, expressa como o rendimento da hidrólise parcial, por conversão da celulose presente em cada amostra em glicose.....	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivo específico	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Cana-de-açúcar	21
2.2 A cana-de-açúcar no Brasil e a produção de etanol	23
2.3 Biomassa Lignocelulósica	24
2.4 Composição química e morfológica do bagaço de cana-de-açúcar.....	26
2.4.1 Celulose	27
2.4.2 Hemicelulose.....	28
2.4.3 Lignina.....	29
2.4.4 Outros componentes	31
2.5 Pré-tratamentos empregados na biomassa	32
2.5.1 Pré-tratamento Hidrotérmico.....	35
2.5.2 Pré-tratamento Organossolve.....	36
2.6 Hidrólise Enzimática da Biomassa.....	37
2.7 Análises Físicas	41
2.7.1 Difração de Raios X	41
2.7.2 Ressonância Magnética Nuclear	42
2.7.3 Microscopia Confocal	43
2.7.3.1 Imagem Espectral	43
2.7.3.2 Excitação por dois fótons.....	43
2.7.3.3 Microscopia de Imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM).....	44
3 MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
3.1 Biomassa	47
3.2 Preparação da biomassa	47
3.3 Pré-tratamento	47
3.4 Extração dos carboidratos solúveis e extrativos.....	48
3.5 Caracterização química da biomassa <i>in natura</i> sem extrativos e amostras pré-tratadas	50

3.5.1	Preparação das amostras	50
3.5.2	Hidrólise ácida concentrada:	50
3.5.3	Determinação da lignina	51
3.5.3.1	Insolúvel	51
3.5.3.2	Solúvel	51
3.5.3.3	Lignina total:	52
3.5.4	Cinzas totais	52
3.5.5	Análise de furfural	53
3.5.6	Análise dos carboidratos, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos	53
3.6	Enzimas	54
3.7	Hidrólise enzimática	54
3.8	Difração de raios X	55
3.9	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	56
3.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
3.11	Microscopia Confocal	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Composição química	59
4.2.	Difração de Raios X	63
4.3	Ressonância Magnética Nuclear	65
4.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	72
4. 5	Microscopia Confocal de varredura	79
4. 6	Hidrólise enzimática	95
5	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de mitigação das emissões dos gases do efeito estufa, a busca por uma matriz energética mais diversificada com o objetivo de suprir a demanda crescente por energia, aliados as oscilações do preço do petróleo e o declínio de suas reservas demonstram a importância da busca por diferentes formas de energias renováveis. Nesse âmbito, as energias alternativas começam a ganhar atenção dentro da matriz energética mundial e o uso de biomassa na produção de energia, como uma fonte renovável, é considerado bastante promissor. (1) Concomitantemente o setor de bioenergia está diante do desafio de comprovar e garantir sua sustentabilidade. (2)

O desenvolvimento do setor agrícola brasileiro contribui para a ocorrência de inúmeros resíduos de biomassas e estudos que visem o aproveitamento dessas potenciais fontes na produção de energia são necessários.

O Brasil é o líder mundial em tecnologia da produção de etanol de cana-de-açúcar e o maior produtor desta monocultura. Todavia, a geração de etanol, assim como a produção de açúcar no país, ocorre convencionalmente a partir da moenda de cana-de-açúcar, o que proporciona grande disponibilidade e baixo custo destes resíduos lignocelulósicos de interesse na produção do etanol de segunda geração.

Com um conceito análogo as refinarias de petróleo, que produzem além dos combustíveis diversos derivados aplicáveis em múltiplas áreas, as biorrefinarias referem-se ao uso integral da biomassa para a produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais, com a mínima geração de resíduos, tendo por finalidade encontrar uma produção industrial mais sustentável. (3)

Estas biorrefinarias estão cada vez mais em foco no mercado de bioenergia e com grandes perspectivas da crescente implementação no Brasil relacionadas à cultura da cana. Isto implica na viabilização dos processos de etanol de segunda geração, que aproveitaria os resíduos de uma primeira geração, podendo assim integrar todo o processo e maximizar o valor agregado da biomassa.

A parede celular vegetal é a maior fonte de carboidratos do planeta.(4) Adicionalmente, o etanol provindo da cana-de-açúcar é um biocombustível renovável, capaz de reduzir as emissões de gases do efeito estufa quando em substituição a outras fontes, como a gasolina. No entanto, o processo de obtenção de bioetanol a partir de biomassa ainda apresenta inúmeros desafios.

Para a produção de etanol de segunda geração faz-se necessário uma eficiente liberação de monômeros de glicose provindos da celulose e subsequente conversão dos mesmos por leveduras e potencialmente por outros microrganismos em etanol. Entretanto, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta (2) que dificulta o processo de hidrólise, sendo necessário submeter essas biomassas a um pré-tratamento que visa disponibilizar a celulose, tornando-a mais susceptível à hidrólise. Para este fim, há diversos métodos existentes, que atuam de formas distintas na matéria-prima e, assim, influenciam a estrutura da biomassa de maneiras diferentes.

A matriz lignina-carboidrato da parede celular vegetal, que protege a celulose, pode sofrer ruptura com o uso de solvente orgânico, capaz de modificar a estrutura da lignina e, conseqüentemente, facilitar a sua solubilização. Além disso, tratamentos mais brandos, como por exemplo, baseados no uso da água a altas temperaturas, também estão sendo alvos de estudos, principalmente por não gerarem altas taxas de produtos inibidores de fermentação que poderiam afetar o rendimento do processo global.

A etapa de pré-tratamento é considerada uma das mais caras, representando cerca de um terço do custo global do processo.(5) Posteriormente a ela, os açúcares fermentescíveis são disponibilizados através de processos de hidrólise química ou enzimática, esta última com maior especificidade, menor impacto ambiental e livre de corrosão. Segundo Knauf e Moniruzzaman (6) a conversão enzimática de materiais lignocelulósicos, é uma rota alternativa promissora e de grande interesse industrial para o aumento da produtividade do etanol de forma sustentável.

O conhecimento da composição química e o entendimento de como o pré-tratamento está agindo na biomassa é de extrema importância para a compreensão de suas propriedades e para aumento da eficiência de hidrólise enzimática na produção de etanol celulósico. Neste contexto, diversas técnicas físico-químicas podem ser aplicadas, para analisar alterações na parede celular decorrentes do pré-tratamento aplicado, caracterizando então o processo.

A utilização de técnicas físico-químicas proporciona o estabelecimento de relações entre estrutura microscópica e propriedades macroscópicas, de modo a desenvolver conhecimento das alterações químicas envolvidas decorrentes de cada pré-tratamento estudado. Metodologias ópticas como a microscopia de fluorescência confocal e a microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência (7-9) foram

desenvolvidas nas últimas décadas e permitem a observação da degradação e distribuição da lignina na biomassa. Ainda, técnicas de ressonância magnética nuclear e difração de raios x permitem analisar a organização destas estruturas. Portanto o conjunto desses e outras técnicas possibilitam ampliar o entendimento do processo de pré-tratamento ocorrido e sua influência no rendimento de hidrólise enzimática.

Diante do cenário exposto, o presente trabalho dedica-se ao estudo da caracterização físico-química de bagaço de cana-de-açúcar para melhor entendimento do processo envolvido na viabilização da produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo contribuir no entendimento dos efeitos gerados na parede celular da biomassa decorrentes do uso de duas diferentes metodologias de pré-tratamento: hidrotérmico e organossolve. Podendo estes ser aplicáveis em escala industrial para a produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática. Foi analisado as influências destes pré-tratamentos na estrutura e composição do bagaço de cana-de-açúcar, bem como na etapa de hidrólise enzimática, a fim de melhor compreender os mecanismos físico-químicos envolvidos na conversão da biomassa.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✚ Estudo e comparação dos pré-tratamentos escolhidos. Foi analisada a variável tempo de reação para o pré-tratamento hidrotérmico, organossolve e a combinação desses. A eficiência desta foi comparada através da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar e por meio do rendimento glicosídico do processo de hidrólise enzimática.
- ✚ Determinação da cristalinidade. Esta medida foi realizada por difração de raios x, para verificar a relação entre a eficiência hidrolítica e a cristalinidade

da amostra, além de demonstrar o efeito do pré-tratamento nesta região da celulose.

- ✚ Detecção de alterações morfológicas na estrutura do bagaço de cana-de-açúcar decorrentes dos pré-tratamentos impostos. Esta etapa foi realizada com o uso de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal.
- ✚ Caracterização de alterações estruturais na distribuição química do bagaço. Para esta análise foi feito o uso da ressonância magnética nuclear de estados sólido (ssRMN).
- ✚ Determinação da digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em função dos pré-tratamentos utilizados. Para esta medida, foi realizada a hidrólise enzimática e o cálculo de sua eficiência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

Originária das florestas tropicais do Sudeste Asiático e da Nova Guiné, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma monocotiledônea, pertencente a família das *Poaceae*, mais conhecida como gramíneas. Ela foi amplamente cultivada na Índia Antiga, onde há aproximadamente 2.340 anos, escribas do exército invasor de Alexandre “O Grande” contribuíram para a sua expansão por notar que os habitantes “mascavam uma cana maravilhosa, que produzia uma espécie de mel sem a ajuda das abelhas”. (14)

Com o aumento da exploração e do desenvolvimento mundial durante o século XV, a produção de cana-de-açúcar se espalhou rapidamente, chegando ao Brasil no início do século XVI pelos portugueses. Poucas plantas tiveram tanta influência mundial quanto esta, apresentando períodos em que a produção de açúcar foi a maior e mais lucrativa indústria do mundo. (14)

A família das *Poaceae* é uma das maiores famílias das angiospermas, e provavelmente a de maior importância para o homem. Dentre as suas características, o crescimento do caule ocorre em colmos, que apresentam alto teor de fibras e concentram os açúcares, sendo a sacarose o carboidrato primordial. (14) Ainda pelo colmo ocorre a reprodução assexuada. (15)

A estrutura da cana-de-açúcar é formada por três partes principais: a epiderme, que recobre finamente o talo, protege e atua como impermeabilizante; o córtex, ou a casca, composta de fibras lignificadas, caracterizada pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras, servindo de proteção ao talo contra efeitos mecânicos externos, além de fornecer sustentação à planta; e o tecido parenquimatoso, ou medula, que constitui a parte interior do talo, de caráter não fibroso, composto por células e com a principal função de armazenar os açúcares. (16) Existem ainda no interior do parênquima, feixes de fibras e vasos com a função de conduzir nutrientes e outras substâncias produzidas pela planta. (17)

Adepta a regiões tropicais e subtropicais, milhões de pessoas, de Cuba à Índia e do Brasil à África, plantam e colhem cana-de-açúcar. Hoje há milhares de variedades de cana e mais de 80 países contribuem para uma colheita anual de cerca de um bilhão de toneladas. (14) O processo de mecanização do corte da

cana-de-açúcar está progredindo, no entanto, na maior parte do mundo, o plantio é uma operação muito trabalhosa. Cortam-se caules maduros de cana-de-açúcar em pedaços de cerca de 40 centímetros e esses são plantados em sulcos separados por intervalos de cerca de 1,5 metro. De cada pedaço nasce um tufo de 8 a 12 caules de cana, que amadurecem entre 12 e 16 meses depois. Os caules e a folhagem densa da cana atingem até 4 metros de altura. (14)

A colheita da cana-de-açúcar pode ser realizada manualmente ou por intermédio de colheitadeiras, que estão substituindo muitos trabalhadores, por aumentar a capacidade diária desta etapa em sessenta vezes. (14) Uma vez cortada, a rapidez no manuseio da cana é essencial, porque o açúcar nas plantas colhidas se deteriora rapidamente.

O processo que pode anteceder a etapa da colheita é a queimada da cana-de-açúcar, realizada para ajudar na remoção de folhas indesejadas e outros materiais que dificultariam a colheita e o trabalho na usina. Durante esta prática, geralmente a palha da cana-de-açúcar é queimada. Todavia, conforme algumas pesquisas, a queima da palha leva para a atmosfera gases tóxicos e material particulado, que contribuem para a poluição ambiental. Frente a este problema, recentemente, o decreto nº 47.700, regulamentou a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar. (18) Alguns chamam este método, que elimina a queima, de colheita da cana verde. Além de melhorar a qualidade do açúcar, ele deixa uma camada protetora de palha no solo, o que, por sua vez, ajuda a combater a erosão e as ervas daninhas. (14) No entanto, mais da metade da palha gerada na colheita deve ser retirada do campo para que não haja formação do chamado colchão de palha, que promove, em longo prazo a infertilidade do solo. (19)

No interior de uma usina, grandes moedores e cilindros esmagam a cana, extraíndo das fibras o conteúdo primordial, o caldo, que será utilizado para produção de produtos com maior valor agregado, principalmente o açúcar e o etanol. A geração de resíduos, ou subprodutos, será diretamente proporcional ao aumento da produção, já que durante o processamento da cana, para obtenção de açúcar e álcool, são gerados materiais como a palha, o bagaço, a vinhaça e águas residuárias.

2.2 A cana-de-açúcar no Brasil e a produção de etanol

Em toda a história, a economia brasileira baseia-se no setor agrícola, tendo como destaque a produção da cana-de-açúcar, destinada tanto para a produção de etanol, quanto para a produção de açúcar.

O Brasil é o país com maior experiência na produção de etanol através da cana-de-açúcar, sendo o principal exportador (20) e o maior produtor desta monocultura. (21) Em 2012 aproximadamente 44% de toda a energia utilizada no país proveio de fontes renováveis, sendo 15,7% oriundas da biomassa da cana-de-açúcar, o que demonstra a importante participação do setor sucroenergético neste quadro. (22)

Conforme dados da União da Indústria de Cana-de-açúcar,(23) até o presente momento, a produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2013/2014 superou 587,906 milhões de toneladas, das quais 61,43% provêm do Estado de São Paulo. Ainda segundo esta fonte, houve um aumento de 6,57% de litros de etanol e um decréscimo de 10,12% de quilogramas de açúcar por tonelada de cana-de-açúcar, comparado a safra 2012/2013, denotando que a safra deste ano está mais alcooleira.

O etanol, também conhecido como álcool etílico (C_2H_5OH), é produzido desde os tempos remotos através da fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais, como cereais e cana-de-açúcar. O mesmo ainda pode ter origem sintética, obtido de fontes como eteno, derivado do petróleo. (3) Atualmente, o etanol é o principal biocombustível utilizado no mundo e o seu uso é ambientalmente favorável, pois ele contém 35% de oxigênio, o qual favorece a completa combustão e reduz a emissão de partículas poluidoras. (24) A baixa pressão de vapor do etanol (cerca de um quarto da gasolina) somada à sua baixa reatividade fotoquímica reduz os danos causados à camada de ozônio.

O bioetanol ainda possui a vantagem ambiental de reduzir as emissões de dos gases do efeito estufa, visto que o carbono liberado no ambiente participa do ciclo do carbono, no qual sua combustão apenas desprende o dióxido de carbono que ora fora retirado do ambiente durante o crescimento da planta. Em suma, a queima de um litro de etanol adiciona pouco carbono à atmosfera, e o montante desprendido no processo é praticamente igual ao absorvido pelas plantas na produção do próximo litro (25).

Dentre as fontes de produção de etanol a partir de carboidratos, destacam-se: os dissacarídeos, especificamente a sacarose, encontrados em vegetais tais como a cana-de-açúcar; por meio de duas fontes de polissacarídeos, como o amido, podendo ser proveniente do milho, ou pela celulose, provenientes de biomassa lignocelulósica, como os resíduos de indústrias sucroalcooleiras, tais como o bagaço da cana-de-açúcar. (26)

No processamento industrial da cana para produção de etanol no país, é realizada a separação do caldo, rico em sacarose, do material lignocelulósico, bagaço. Este subproduto, atualmente aproveitado como alimento para o rebanho ou, principalmente, como combustível nas caldeiras de geração de vapor nas próprias usinas sucroalcooleiras, tende a ter um melhor aproveitamento, devido a crescente eficiência no setor na geração de energia. (27-28)

Neste aspecto e, considerando ainda a legislação que restringe gradativamente a queima da palha no campo, a disponibilização dessas biomassas, bagaço e palha, para a geração de etanol é de baixo custo e de fácil acesso. Este biocombustível passa a ser mais sustentável, pois aproveita os resíduos de uma primeira geração de etanol ou geração de açúcar para uma segunda geração de etanol, cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento. Estima-se que com o domínio dessa tecnologia será possível aproveitar pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área de terra e de uma matéria-prima praticamente sem valor. (29) Portanto, a conversão dessa biomassa excedente poderia aumentar o potencial econômico da cana.

Ainda, a implantação da tecnologia de produção de etanol secundário através do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil é economicamente favorável, porque o processo de produção pode ser anexado às unidades produtoras de açúcar e etanol, o que implica em menores investimentos na infraestrutura e logística.

2.3 Biomassa Lignocelulósica

A definição de biomassa pode ser aceita como todo recurso renovável, provindo de matéria orgânica de origem animal ou vegetal, que pode ser transformado em energia mecânica, térmica ou elétrica (30).

Em termos gerais, as matérias-primas utilizadas para a produção de etanol no mundo envolvem pouco ganho energético e ambiental, além de serem voltadas para

diversos mercados, como alimentos ou outros insumos, que são melhores remunerados. Ainda, a agroindústria produz inúmeras fontes de biomassa, tratadas como rejeitos industriais, mas que poderiam ser melhores aproveitadas.

A demanda por etanol tem crescido continuamente com o aumento da exportação desse combustível e o aumento da frota de veículos *flex fuel*. No entanto, a cana-de-açúcar produzida não será suficiente para suprir tal aumento gradativo de volume de etanol através da fermentação tradicional, havendo um déficit, sendo necessário buscar meios alternativos, como fonte de matérias-primas alternativas para a produção do etanol. (31) Em decorrência destes fatores, atualmente, buscam-se processos biotecnológicos que permitam, por intermédio de resíduos lignocelulósicos, a produção de biocombustíveis.

A biomassa lignocelulósica disponível para a geração de etanol inclui gramíneas, resíduos agrícolas, resíduos da silvicultura, como as lascas de madeira, resíduos industriais como o lodo de papel e jornais recicláveis. No mundo são produzidos em média $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas de substratos lignocelulósicos. (32) Somente no Brasil as usinas de cana-de-açúcar geram aproximadamente 135 – 140 kg de bagaço de cana seco, e a produção anual deste material é estimada em 186 milhões de toneladas. (33-34) Considerando o bagaço e a palha, apenas um terço da biomassa contida na planta é aproveitado para produção de etanol ou açúcar. (4, 35-36)

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera e participam com, aproximadamente, 50% da biosfera terrestre. A estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma sua parede celular, estrutura fibrosa que confere uma maior rigidez à planta, protegendo-a contra choques osmóticos e mecânicos. A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por polímeros de carboidratos, celulose e hemicelulose, lignina e uma menor parcela de outros elementos, tais como extrativos, cinzas e etc. A proporção de cada um destes materiais varia conforme a espécie da planta e a sazonalidade da colheita. A celulose e a hemicelulose, que tipicamente representam dois terços da biomassa seca, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados para formar açúcares fermentescíveis e eventualmente produzir o etanol.

Estimasse que em cada 1 milhão de toneladas de biomassa seca gerada, 227 milhões de litros de etanol poderiam ser produzidos, considerando o uso apenas da parte celulósica. (34)

2.4 Composição química e morfológica do bagaço de cana-de-açúcar

Através da organização da lignina, celulose e hemicelulose, formam-se principalmente três diferentes camadas na parede celular, a lamela média, a parede celular primária e a parede celular secundária (S1, S2 e S3). A lamela média é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido vegetal. Durante o desenvolvimento da célula, forma-se então a parede primária e continua a ser depositada ao longo do crescimento e expansão celular. Na etapa final, com redução da síntese de pectina e um aumento da síntese de lignina, hemicelulose e celulose, ocorre a transição da parede primária para a parede secundária (S1, S2 e S3), esta como a principal responsável pela resistência mecânica da parede celular. (37-39)

A deposição da lignina acontece no decorrer do espessamento da parede celular secundária, iniciada na região da parede celular primária, estendendo-se em dois sentidos, em direção a lamela média, para o exterior, e em direção ao interior, onde desenvolve-se a parede secundária.(40) A lignina depositada estabelece ligações cruzadas com a matriz de carboidratos, celulose e hemicelulose. A cadeia de celulose organiza-se num arranjo cristalino por meio de ligações de hidrogênio, promovendo rigidez na parede, devido a estrutura linear de suas cadeias compactadas em microfibrilas. Já a hemicelulose, forma uma rede fibrosa na parede, por proporcionar ligação entre a celulose, sendo fixadas pela lignina (Figura 2.1). Enquanto a lignina atua para manter os corpos coesos, funcionando como agente impermeabilizante e como uma barreira contra microrganismos, também se comporta como um obstáculo para o acesso enzimático e promoção da hidrólise da celulose. Para a obtenção da fração monossacarídica e a sua conversão por fermentação alcoólica em etanol, é necessária a separação destes constituintes.

Figura 2.1 - Arranjo típico da parede celular vegetal

Fonte: MURPHI; MCCARTHY (41)

2.4.1 Celulose

A celulose é o mais abundante polímero disponível na natureza, representando cerca de 40% da biomassa vegetal seca. Este polímero pertence a função química dos carboidratos, mais corretamente a dos glicídeos, sendo constantemente renovado através do processo de fotossíntese, com uma biossíntese anual estimada em 1011 toneladas.(42)

A celulose é um polímero linear de celobiose, dissacarídeo formado por unidades de anidroglicose, conectadas por ligação $\beta(1-4)$ glicosídicas, resultando numa macromoléculas de alta massa molar (Figura 2.2). As cadeias de celulose possuem terminações diferentes em sua cadeia, apresentando uma terminação redutora, na qual o carbono C1 é apresentado em uma estrutura hemiacetal, e outra terminação não redutora, na qual o carbono C4 possui sua hidroxila original. (43-44)

As cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio na estrutura cristalina, onde estas poderão apresentar uma elevada ordem na orientação da ligação ou ser menos organizadas, o que irá definir sua forma, sendo respectivamente uma estrutura cristalina, ou paracristalina (amorfa). (45) A formação de estruturas organizadas e de estruturas com baixo nível de organização é dependente da disposição dos carbonos secundários. Os grupos hidroxilas nos carbonos C2 e C3 estão dispostos na estrutura de cadeira de modo equatorial, que possibilita a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares,

entre unidades de anidroglicose adjacentes, e intermoleculares, entre cadeias de celulose diferentes, permitindo tanto a formação de estruturas com alto nível organizacional, quanto as de baixo. (43-44)

As regiões de elevada cristalinidade são pouco acessíveis por solventes e reagentes, já as amorfas são mais susceptíveis. A cristalinidade da estrutura da parede pode ser estudada por técnicas físicas como a difração de raios X.

Figura 2.2 - Estrutura cristalina e amorfa da celulose

Fonte: Adaptada de QUIROZ-CASTAÑEDA; MALLO (46)

2.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose, que corresponde de 20 – 30% da composição da biomassa, apresenta-se como uma cadeia curta de vários açúcares, altamente ramificada, ligadas a celulose e lignina. Diferentemente da celulose, os açúcares presentes na hemicelulose são diversos, têm-se as unidades de pentoses, monossacarídeos com cinco átomos de carbono (xilose e arabinose) e as hexoses, monossacarídeos com

seis átomos de carbono (galactose, glucose e manose), alterando as propriedades das macromoléculas formadas pelos mesmos (Figura 2.3). No bagaço de cana, a xilose é o monômero predominante. (47) Ainda em gramíneas há majoritariamente heteroxilanas acetiladas, classificadas com 4-O-metil-glucuronoxilanas.(48) A estrutura hemicelulósica, diferentemente da celulose, é bastante amorfa, sendo altamente ramificada, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais amenas. (49)

Figura 2.3 – Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose. Em destaque alguns dos principais monômeros constituintes da hemicelulose.

Fonte: Adaptado de BIOENERGY (50)

A remoção da hemicelulose da parede celular tem sido associada ao aumento substancial da hidrólise da celulose, isto porque sua retirada facilita o contato físico enzimático à superfície da celulose. As hemiceluloses são ligadas a celulosas e a lignina, promovendo a interação entre esses componentes. A associação entre as hemiceluloses e a celulose, pode ser explicada devido a similaridade química e estrutural por meio da formação de ligações de hidrogênio existente entre os grupos, já entre a hemicelulose e a lignina ocorre devido ao caráter amorfo de ambos, assim a massa molar menor das hemiceluloses permitiria a posterior deposição de lignina (51-52).

2.4.3 Lignina

A lignina está presente em toda biomassa lignocelulósica e representa de 10 – 30% de sua composição. Apenas alguns poucos microrganismos conseguem degradá-la, formando compostos com um alto valor agregado, como ácidos orgânicos, fenóis e vanilina. (53) É uma macromolécula complexa formada por unidades de fenilpropano (Figura 2.5). Seus monômeros, o álcool cumarílico (precursor das unidades p-hidroxifenílicas), coniferílico (precursor das unidades guaiacil) e sinapílico (precursor das unidades de siringilo) encontram-se ligados entre si por dois tipos de ligações, sendo em sua maioria as ligações éter através do oxigênio do grupo hidroxila do anel fenólico e ligações diretas carbono-carbono (C-C), ditas de condensação. (54)

Além de conferir a resistência mecânica dos vegetais, a lignina atua no transporte de água e nutrientes por tornar a parede celular hidrofóbica. A porcentagem de lignina é variável em cada matéria-prima vegetal e se diferenciam principalmente no conteúdo de grupos metoxilas, ou seja, na proporção entre as unidades básicas que são polimerizadas em cada biomassa. As ligninas de coníferas são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico e são frequentemente denominadas de ligninas guaiacilas, já as ligninas das folhosas contêm resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico e são denominadas de ligninas guaiacil-siringilas. Entretanto, as ligninas derivadas de gramíneas contêm os três precursores básicos. Consequentemente, as ligninas das folhosas possuem alta quantidade de grupos metoxílicos, são menos condensadas e mais suscetíveis à conversão química do que as ligninas derivadas das coníferas. (55)

Figura 2.4 - Monômeros precursores da lignina (A); estrutura química da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (B)

Fonte: Adaptada de FENGEL; WEGENER (56)

2.4.4 Outros componentes

Os compostos químicos solúveis podem ser extraídos por diversos solventes e não fazem parte da parede celular, sendo facilmente removidos da biomassa.

Nestes compostos há uma diversidade de metabólitos secundários, principalmente terpenos, óleos, compostos fenólicos e fitoesteróis, além de carboidratos de baixa massa molar e alcaloides. Todos esses compostos caracterizam a biomassa, por atribuir cor, cheiro e outras propriedades a elas. Esses extrativos que podem ser removidos utilizando-se um ou mais solventes neutros, conforme a afinidade do composto pelo eluente e isto influenciará a composição e rendimento da extração.

Ainda na biomassa vegetal, são encontrados compostos inorgânicos, chamados de cinzas, constituídos de carbonatos, oxalatos e silicatos, que permanecem depois de queimar o substrato em altas temperaturas. (57)

2.5 Pré-tratamentos empregados na biomassa

Uma das principais etapas envolvida na transformação da biomassa lignocelulósica em etanol é a etapa de sacarificação dos polímeros de celulose e hemicelulose, que tem como principal obstáculo a estrutura íntegra de lignina e hemicelulose envolvendo as fibras de celulose. Dessa forma, a natureza e o homem se encarregam de encontrar soluções para o problema, criando uma série de formas de desestruturar tais compostos e torná-los acessíveis ao processo de transformação. Um conjunto de procedimentos vem sendo desenvolvidos para tornar possível o acesso dos microrganismos e enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos constituintes desses materiais. A esses procedimentos dá-se o nome de pré-tratamentos.

O processo biotecnológico para produção de bioetanol, utilizando lignocelulose como substrato, passa por basicamente quatro etapas ordenadas pela desestruturação da parede celular, para liberar a celulose e hemicelulose do complexo com a lignina, seguido pelo processo de hidrólise dos carboidratos fermentescíveis. Posteriormente, ocorre a etapa de fermentação alcoólica e o processo é finalizado pela destilação. (34)

O pré-tratamento da biomassa contribui para facilitar a hidrólise enzimática e pode atuar por reduzir a cristalinidade da amostra e aumentar a porosidade do material (Figura 2.7). Isso proporciona um aumento do rendimento da hidrólise enzimática por facilitar o acesso das enzimas ao substrato e conseqüentemente um aumento da quantidade de açúcares fermentescíveis. (12) Portanto, esta etapa

define o rendimento e o custo do qual os carboidratos de celulose e hemicelulose podem ser convertidos a etanol. (58)

A matéria pode ser submetida, primeiramente, ao tratamento mecânico, desorganizando o material e deixando-o mais acessível aos tratamentos posteriores, seja ele de natureza química, física ou biológica. Nesta etapa, a biomassa é lavada, lacerada, desfibrada e moída. (59)

Figura 2.5 - Estrutura lignocelulósica após processo de pré-tratamento

Fonte: Adaptada de HSU (60)

Os pré-tratamentos físicos incluem o aquecimento, ciclos de congelamento e descongelamento, uso de micro-ondas e emissão de radiação, com o objetivo de reduzir a dimensão e a cristalinidade do material. (61-62) O tratamento com micro-ondas promove efeitos térmicos gerados em ambientes aquosos. A radiação de micro-ondas gera um calor interno no bagaço da cana, resultante de vibrações das ligações polares na biomassa e do ambiente aquoso ao redor. (62) A radiação ultravioleta e outras formas de radiação têm sido empregada para degradar e remover a lignina. (63)

Os pré-tratamentos químicos envolvem a adição de compostos orgânicos ou inorgânicos, assim como nos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular. Os mesmos podem utilizar ácidos, bases ou solventes orgânicos (64). No processo, ocorre fracionamento pelo uso do solvente e se baseiam na dissolução diferencial dos componentes da lignocelulose, por meio do rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose. (65)

A utilização de ácidos promove, principalmente, a hidrólise da camada de hemicelulose, enquanto que o pré-tratamento alcalino, atua por remover parte da camada de lignina. (10, 13) Mais especificamente o uso de um álcali provoca a degradação do éster e das cadeias glicosídicas, resultando na alteração estrutural da lignina, inchaço da celulose, descristalização parcial de celulose, e parcial da hemicelulose. (64) Os reagentes mais utilizados no Brasil são os ácidos sulfúricos e o hidróxido de sódio. Ainda neste pré-tratamento, é necessário corrigir o pH para torná-lo favorável as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação. (45)

Existem também pré-tratamentos a base de solventes orgânicos, como o etanol, metanol, acetona, etileno e metanol, a fim de solubilizar a lignina e fornecer celulose tratada para a etapa de hidrólise, podendo ainda estar em combinação com ácidos. (66) Pré-tratamentos oxidativos também se inserem nesta classificação, eles utilizam oxidantes como o peróxido de hidrogênio para remover a lignina e a hemicelulose, mas geram produtos inibidores. (67)

O pré-tratamento biológico resulta em parcial deslignificação por meio de microrganismos, para degradar a lignina. Durante o processo, esses microrganismos secretam enzimas extracelulares como as peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa, sendo realizado em condições suaves de reação, de baixo consumo energético e ambientalmente favorável. (45)

Há ainda a combinação entre diferentes tipos de pré-tratamentos, chamados de combinados. No Brasil, as principais pesquisas são voltadas para tecnologias de pré-tratamentos que envolvem processos físico-químicos das biomassas. Dentre os diversos aplicados há a expansão da fibra de amônia (AFEX), o qual é realizado na presença de amônia em altas temperaturas e pressão, que conseqüentemente gera a ruptura física das fibras. (68)

Outro método também aplicado é o da explosão de CO₂, utilizado como um fluido supercrítico e em solução aquosa forma ácido carbônico. (69) As propriedades do CO₂ supercrítico são largamente conhecidas como, seu alto poder de difusão e sua baixa viscosidade. (70) Por esse motivo, é capaz de penetrar na estrutura do material lignocelulósico diminuindo sua cristalinidade. (64) Tais características representam vantagens sobre os solventes convencionais, além de poder ser operado a temperaturas mais baixas em relação aos tratamentos térmicos. (70)

Dentre os exemplos desses processos físico-químicos, ainda podemos citar a explosão a vapor, na qual submete o material lignocelulósico triturado ao vapor de água saturado à alta pressão e alta temperatura, sendo de 160 a 240 °C por até 20 minutos. Em seguida, a pressão é retirada bruscamente, causando a ruptura das ligações da lignina, hemicelulose e celulose. (63) As moléculas de vapor d'água, à pressão e temperatura elevadas, penetram na estrutura da biomassa e, no momento da explosão, ou descompressão, estas se expandem, fazendo com que as ligações químicas, que mantêm os componentes macromoleculares da biomassa fortemente unidos, se quebrem (71).

No pré-tratamento físico-químico ainda há o processo hidrotérmico, que é similar ao da explosão a vapor, porém ele faz uso da água quente pressurizada ao invés do vapor, aumentando a solubilização do material. (72)

Novas metodologias envolvem líquidos iônicos, que atuam por romper as interações não-covalentes entre as celulosas, hemicelulosas e lignina, pela formação de ligações de hidrogênio entre os íons não-hidratados com os prótons do grupo hidroxila.(73) Outras fazem uso do ozônio, que por atuar como um agente oxidante é eficiente na deslignificação.(74) Além do emprego de peróxidos para a deslignificação, que associados a hidróxido, como o de sódio, atua efetivamente solubilizando também a hemicelulose.(42) Ainda há estudos utilizando sulfitos, com o objetivo de superar a recalcitrância da lignina (SPORL), mais aplicado em resíduos da indústria madeireira. (75-76) Esta última técnica despolimeriza a celulose, remove completamente a hemicelulose e impede a condensação excessiva da lignina através de controle do pH e da temperatura. A aplicação de sulfito, para adequar a hidrólise do substrato pré-tratado, pode ser utilizada em larga escala sem necessitar de alta tecnologia. (75)

Para a escolha correta do pré-tratamento a ser empregado, é necessária a avaliação de certos parâmetros, a fim de se obter uma alta eficiência sem custos elevados. Neste contexto, é importante verificar se o pré-tratamento proporcionou materiais altamente digestíveis para a hidrólise enzimática, com a mínima degradação dos açúcares e formação de produtos inibidores da fermentação. Idealmente, a dispensa de moagem previa ao pré-tratamento pode resultar em custo moderado dos reatores e de qualquer material a ser empregado, baixa produção de resíduos e mínima necessidade de aquecimento e energia. (77)

2.5.1 Pré-tratamento Hidrotérmico

Para o emprego do pré-tratamento em escala industrial, busca-se a aplicação de reagentes de fácil acesso, sem custos elevados e que não promova riscos ambientais quando descartados, como no caso da utilização da água. O pré-tratamento que a utiliza, é o hidrotérmico, o qual consiste em sua aplicação a altas temperaturas, a fim de se provocar mudanças estruturais na biomassa, facilitando assim o acesso das enzimas ao substrato, durante o processo de hidrólise.

A hemicelulose é o componente macromolecular da parede celular, dos materiais lignocelulósicos, mais sensível termicamente, sendo ela então primeiramente a ser solubilizada, principalmente se os parâmetros destes processos não forem muito agressivos. (78-79) A água sob elevada temperatura e pressão tem seu pKa afetado, de modo que o pH se altera de 7 (25°C) para 5 (200 °C) o que promove um caráter ácido e a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses. Este fato também pode ser explicado devido a desacetilação parcial da fração hemicelulósica liberar o ácido acético no meio, que poderá atuar como catalisador na despolimerização da hemicelulose. (80) Entretanto, apenas o pré-tratamento hidrotérmico não é suficiente para a remoção eficaz da lignina, pois ocorre a recondensação dos componentes solúveis da lignina durante a reação, precisando muitas vezes de um tratamento subsequente.(73) Os parâmetros operacionais como a temperatura e o tempo de residência, influenciam na qualidade do material tratado e na formação de subprodutos.

O processo hidrotérmico pode ser visto como vantajoso, a partir do ponto de vista em que não há aditivos, tais como catalisadores ácidos. Além disso, os sistemas de reatores não são caros devido à natureza de baixa corrosividade para esta técnica de pré-tratamento. (64)

2.5.2 Pré-tratamento Organossolve

O pré-tratamento organossolve é realizado com a utilização de solventes orgânicos em altas temperaturas a fim de solubilizar a lignina. Os processos em geral utilizam os solventes orgânicos em água, em diferentes proporções. Neste processo a água atua como nucleófilo nos centros ativados da lignina, enquanto o

solvente solubiliza os fragmentos de lignina produzidos. (81-82) O rompimento das ligações da lignina ocorre por meio de reações de hidrólise, ou em alguns casos, de solvólise. (81-82) A habilidade de um solvente em dissolver a lignina é dependente da densidade de energia coesiva e da capacidade do solvente em fazer ligação de hidrogênio. (83-84)

Estruturalmente, a lignina é um polímero heterogêneo cujas unidades básicas estão ligadas por ligações C-C e aril-éter, com aril-glicerol e beta-ariléter como formas predominantes. (85) O pré-tratamento dissolve a lignina por clivar ligações tipo alfa-aril éter e arilglicerol-beta-aril éter (beta-O-4) na macromolécula de lignina, provocando uma mudança na estrutura da lignina, incluindo aumento do número de seus grupos fenólicos e metoxil e diminuição de sua massa molecular. (86)

Em 1938 foi realizado um trabalho por Neilson e colaboradores,(87) envolvendo pré-tratamento organossolve, sendo o etanol o solvente orgânico aplicado a fim de se promover a deslignificação em cavacos de choupo, seguido de hidrólise. A eficiência desta hidrólise dobrou quando comparada à realizada com a amostra sem o pré-tratamento.

Alguns estudos sugerem o uso de catalisadores ácidos para quebrar as ligações das hemiceluloses e obter um rendimento maior de xilose, que podem ser fermentadas para a produção de etanol. Todavia, em temperaturas acima de 185 °C a deslignificação tende a ser satisfatória sem necessitar do acréscimo de ácidos. (88) A lignina extraída neste processo é de alta qualidade e pureza, livre de enxofre, e com potencial de comércio de alto valor após ser recuperada. (89-90)

Solventes orgânicos com baixa massa molar e baixo ponto de ebulição são os mais vantajosos para aplicação industrial, pois a remoção dos mesmos no sistema fica facilitada. O etanol é um exemplo, pois além de possuir baixo custo, apresenta condições operacionais favoráveis, podendo ser reciclado o que reduz assim os custos do processo. (74)

2.6 Hidrólise Enzimática da Biomassa

A conversão da celulose e hemicelulose em etanol é possível, mas os processos disponíveis no momento ainda são caros e complexos. Para a clivagem desses carboidratos, faz-se uso da etapa de hidrólise ácida (processo químico) ou enzimática (processo biotecnológico), pela ação de enzimas produzidas por

microrganismos (catalisadores orgânicos, como as denominadas celulases), para liberar monômeros de açúcares e, depois, por fermentação, produzir o etanol propriamente dito.

O Brasil possui uma imensa biodiversidade que se acredita compreender cerca de 10 a 20% de todas as espécies conhecidas na Terra e inúmeros grupos de pesquisa nacionais estão se dedicando ao isolamento e à identificação de organismos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas. (34) Apesar do alto custo da utilização de enzimas, as vantagens do processo enzimático são inúmeras. A sua alta eficiência comparado ao processo de hidrólise ácida em condições ideais; o processo de produção controlado; a inexistência de problemas de corrosão, não necessitando de materiais de alto custo; e a demanda de energia relativamente baixa para a realização do processo são algumas das vantagens da hidrólise enzimática (91).

As enzimas são designadas com base na sua especificidade por substratos, de acordo com as diretrizes da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). As celulases estão agrupadas como hidrolases de glicosídeos (codificação - EC 3.2.1.x, onde x varia com o tipo de celulose avaliada. (92)

Componentes dos sistemas celulolíticos foram primeiramente classificados com base no seu modo catalítico de ação e, mais recentemente estão baseados em suas propriedades estruturais. (92) As celulases são enzimas de massas moleculares relativamente elevadas, capazes de hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídica da celulose. Este rompimento gera produtos como, por exemplo, glicose, celobiose e alguns oligossacarídeos.

As celulases se diferenciam de outras hidrolases de glicosídeos, por hidrolisar ligações β -1,4 entre os resíduos glicosil.(93) O rompimento enzimático dessas ligações β -1,4 glicosídicas da celulose ocorre por um mecanismo de hidrólise ácida, que utiliza um doador de prótons e um nucleófilo ou base. Os produtos da hidrólise podem resultar, tanto na inversão ou retenção (mecanismo de substituição dupla) da configuração anomérica do carbono-1 na extremidade redutora.(94-95)

Na realidade a clivagem da celulose ocorre por complexos celulolíticos, compostos por endoglucanases ou 1-4- β -D-glucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) ou exoglucanases e β -glicosidases (β G), sendo a sua ação necessária para que a celulose cristalina possa ser transformada em glicose.(32) Estas enzimas agem diferentemente em sítios específicos da fibra de celulose.(96) No processo de

hidrólise enzimática da celulose, é necessária a adsorção da enzima à superfície do substrato, com a formação de um complexo enzima-substrato (celulose) (Figura 2.6). Esta adsorção promove, não somente um contato físico entre estes componentes, mas em muitos casos pode desempenhar um importante papel na eficiência da hidrólise da fibra de celulose. (97)

O complexo celulósico age sinergicamente na sacarificação da celulose.(98) As endoglucanases são enzimas que iniciam o processo hidrolítico, por meio da catálise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose, atuando aleatoriamente sobre regiões amorfas. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Como consequência, ocorre uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose. (99)

As exoglucanases são definidas pela IUBMB como catalisadoras da hidrólise dos terminais não redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com grau de polimerização maior que 3 em celobiose, porém há relatos na literatura do ataque de terminais redutores por essa enzima.(100 -101). Portanto estas enzimas podem ser classificadas como do tipo I (CBHI), que hidrolisam as extremidades redutoras e do tipo II, que hidrolisam os terminais não redutores, liberando tanto glicose como celulose. As exoglucanases atuam na hidrólise primária da fibra celulósica por promover uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais, tornando amorfas as regiões cristalinas dos polímeros e consequentemente deixando-as mais expostas.(101) Elas também podem atuar na celulose microcristalina. (102)

A completa hidrólise é realizada pela ação das β -glicosidases, que convertem celobiose em glicose e oligossacarídeos solúveis com grau de polimerização menor que sete. (103 -109) Estas enzimas catalisam a transferência de grupos glicosil entre nucleófilos de oxigênio. Essa reação de transferência resulta na hidrólise das ligações β -glicosídicas, a partir da extremidade redutora de dissacarídeos e oligossacarídeos de cadeias pequenas. (110)

Em suma, para que a etapa de hidrólise enzimática seja eficiente, requer a utilização de coquetéis enzimáticos constituídos de diferentes proporções de cada uma das enzimas responsáveis pela quebra da celulose, o que deve alterar conforme a biomassa aplicada e seu pré-tratamento.

Figura 2.6 - Esquema simplificado da hidrólise da celulose por sistemas celulolíticos

Fonte: Adaptada de RATANAKHANOKCHAI (111)

Várias empresas biotecnológicas possuem preparados enzimáticos, muitos destes baseados no uso de enzimas extracelulares, produzidas principalmente pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, mas também outros fungos. Por exemplo, a empresa Genecor, possui um coquetel enzimático de uma cepa geneticamente modificada de *Trichoderma reesei* denominado de Accellerase 1500, um complexo enzimático que atua na conversão de celulose a glicose. Comparado a outros complexos industriais, este coquetel possui altos níveis de beta-glicosidase, que contribui para uma quase completa conversão de celobiose a glicose e, consequentemente, aumenta o rendimento a etanol. (112)

2.7 Análises Físicas

Alterações na composição química ou morfológica na biomassa causadas pelos pré-tratamentos são de grande importância no estudo da produção de etanol de segunda geração. (10) A arquitetura da parede celular da planta, antes e após o efeito do pré-tratamento empregado, pode ser estudada por meio de diversas técnicas físicas, auxiliando na compreensão da ação de cada processo e na caracterização da biomassa.

2.7.1 Difração de raios x

Max Von Laue sugeriu, em 1912, que radiação na faixa dos raios x poderiam ser difratada por cristais, pois percebeu que os respectivos comprimentos de onda eram compatíveis com as separações entre os planos da rede do cristal. Isto foi confirmado por Walter Friedrich e Paul Knipping e atualmente é uma poderosa técnica para determinação estrutural. Todavia a técnica de difração de raios x também pode ser aplicada para determinação de algum cristalino presente numa amostra em forma de pó. Isto foi desenvolvido por Peter Debye e Paul Scherrer que utilizaram a radiação monocromática em uma amostra reduzida a pó, concluindo que algum cristalino vai estar orientado de modo a ocorrer a difração. Nos difratômetros de pó modernos as intensidades são monitoradas eletronicamente enquanto o detector gira em torno da amostra num plano contendo o raio incidente. (113)

A molécula de celulose presente nos materiais lignocelulósicos apresenta uma região cristalina que pode ser detectada por esta análise. Relacionando esta região com as regiões não cristalinas, obtêm-se o índice de cristalinidade da celulose, pois quando a estrutura é ordenada, possuindo certa regularidade, como no caso dos cristalitos, as interferências são acentuadas, podendo-se distinguir essas estruturas das desordenadas. (114) Este fator é muitas vezes dito como uma importante medida para verificar se o pré-tratamento afetou a região cristalina e como isto influenciará no processo de hidrólise enzimática subsequente.(73)

Conforme alguns trabalhos, o índice de cristalinidade pode diminuir devido à redução da recalcitrância, ou seja, da organização cristalina da celulose presente no material lignocelulósico, facilitando a etapa de hidrólise enzimática.(115) Desta

maneira esta técnica contribui para o entendimento da atuação do tratamento e seu resultado no processo.

2.7.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica, que como todas as outras é baseada na interação da radiação magnética com a matéria, sendo uma técnica não-destrutiva, utilizada para observar a reorientação do spin nuclear sob a aplicação de um campo magnético. (116)

As aplicações de RMN para caracterização do estado sólido dependem do comportamento das interações internas de spin. Esta interação interna de spin é associada com o acoplamento do spin nuclear, por exemplo, campos magnéticos originados por movimentos orbitais dos elétrons induzidos por um campo magnético estático (interação de deslocamento químico) e interação de spins nucleares através de seus momentos de dipolo magnético (interação dipolar). (116)

Para sólidos orgânicos onde os núcleos mais importantes hidrogênio, carbono, fósforo e nitrogênio têm spin $\frac{1}{2}$, as duas interações de spin nuclear que dominam o espectro de RMN são as interações de deslocamento químico e a interação dipolar magnética entre núcleos de mesma espécie ou diferentes. (116)

A interação de deslocamento químico é definida pelas características da nuvem eletrônica ao redor do núcleo. Portanto, é extremamente local e muito sensível a variações na constituição química e na estrutura local das moléculas, já que tanto mudança no caráter como na orientação das ligações químicas afetam a estrutura eletrônica ao redor do núcleo. (116)

A técnica de RMN pode ser empregada no processo de caracterização de materiais lignocelulósicos, por detectar, a nível molecular e atômico, mudanças estruturais. (117) Isto pode ocorrer por intermédio da atribuição dos deslocamentos químicos, com base nos dados da literatura, demonstrando a mudança estrutural ocorrida.

2.7.3 Microscopia Confocal

Metodologias ópticas como a microscopia de fluorescência confocal e a microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM – fluorescence

lifetime imaging microscopy) permitem a observação da degradação ou distribuição da lignina na biomassa. (7)

A microscopia confocal consiste na obtenção de imagens de fluorescência de um plano focal da amostra, eliminando a influência da luz emitida a partir de centenas de nanômetros acima e abaixo do foco, sendo possível a obtenção de imagens no interior do plano, desde que sua espessura seja fina o suficiente para penetrar a luz. (118)

Materiais lignocelulósicos têm sua fluorescência atribuída a molécula de lignina e foi proposto como sendo uma transferência não radioativa de energia de cromóforos excitados pela estrutura dos tipos álcool cinamil, naturalmente presente na molécula. (118 - 119)

A partir desta análise é possível correlacionar as propriedades de emissão da lignina com a sua distribuição, arranjo molecular e concentração local na matriz celulósica do bagaço, sendo assim possível caracterizar o bagaço com espectros de fluorescência. (118) Isto ocorre porque a lignina pode ser afetada na estrutura da parede celular por sofrer polimerização devido a fatores como tipo de solvente, temperatura, pH e força iônica. (120 - 121)

2.7.3.1 Imagem espectral

Uma imagem clássica de microscopia confocal transmite a intensidade para cada pixel analisado, enquanto uma medida em espectrofotômetro mostra o espectro geral. A combinação destas análises refere-se a imagem espectral, proporcionando um espectro para cada pixel. (122)

Para uma determinada faixa espectral, cada canal da fotomultiplicadora detecta a fluorescência em um determinado comprimento de onda. Se a faixa de detecção cobrir todo o espectro de emissão e o intervalo entre os comprimentos de onda correspondentes aos canais for suficientemente pequeno, a superposição das imagens registradas pelos diferentes canais resulta na imagem de todo o espectro de emissão da amostra, ou seja a imagem da cor real da fluorescência. Plotando-se a intensidade do pixel em função do comprimento de onda obtém-se o perfil de intensidade de emissão de um fluoróforo localizado neste pico. (122)

2.7.3.2 Excitação por dois fótons

A excitação por um fóton na microscopia pode ocasionar fotodegradação de parte da amostra por excitar regiões acima e abaixo do plano focal por cones de luz convergindo para o foco e divergindo dele, além de tornar a excitação pouco eficiente devido a absorção. (123) Todavia, isto pode ser resolvido com excitação por dois fótons. A probabilidade de dois fótons excitarem o mesmo local simultaneamente é proporcional ao quadrado da intensidade, que é inversamente proporcional a área. Portanto a probabilidade de excitação por dois fótons é máxima no plano focal e diminui fora da região do foco. (124)

2.7.3.3 Microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM)

A microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM) permite a obtenção de imagens baseando-se na diferença das taxas de decaimento exponencial da fluorescência de uma amostra fluorescente. A técnica não tem por função quantificar a luz emitida, mas sim o tempo de vida do estado excitado das moléculas fluorescentes. (125) As imagens obtidas têm como base, a aplicação de múltiplas cores com marcadores fluorescentes para a observação da distribuição celular das moléculas. Cada marcador apresenta um tempo específico de duração para a emissão da fluorescência no seu estado excitado, sendo geralmente representado em imagens FLIM em conceito de cores. A cada pixel da imagem é atribuída uma cor correspondente ao tempo de decaimento da fluorescência. (122)

2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na compreensão da morfologia, bem como sua composição química, a microscopia é uma poderosa abordagem, principalmente na arquitetura molecular da parede celular. (126)

A principal técnica utilizada para a caracterização das estruturas com nanopartículas auto-organizadas foi a microscopia eletrônica de varredura, por permitir a observação de amostras sob magnificação variável, desde aumentos muito pequenos com imagens panorâmicas até grandes aumentos e com grande campo de observação, possibilitando obter facilmente imagens representativas da amostra. (127)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica bem estabelecida para a obtenção de imagens superficiais de sólidos orgânicos e inorgânicos. As imagens obtidas são formadas a partir da interação de um feixe de elétrons focalizado sobre a amostra que varre a sua superfície ponto a ponto, o que contribui para caracterização da biomassa, principalmente na avaliação das mudanças estruturais na superfície da amostra. (128)

A preparação de amostras é relativamente fácil, uma vez que elas não precisam ter transparência eletrônica. Amostras eletricamente isolante são recobertas com películas muito finas de materiais condutores, como a grafite, o ouro ou uma liga de ouro-paládio (129).

Esta técnica apresenta uma resolução da ordem de 2 a 5 nm, que é muito superior à obtida em microscópios óticos, de 0,5 μm . (128) Além disso, as imagens têm aparência tridimensional, o que facilita a interpretação dos dados, resultado da alta profundidade de campo e dos efeitos de contraste produzidos pelos elétrons. (130)

3 MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Biomassa

O material lignocelulósico analisado foi o bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente cedido pela empresa Cosan Group-Raizen (Usina da Serra/ Ibaté-SP) da variedade do talhão RB86-7515, safra 2013/05, sem queima prévia e recolhido do último terno de facas. Estas amostras foram lavadas em água na temperatura de 50 °C, para a remoção das impurezas contidas na superfície das mesmas. Imediatamente após a lavagem, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 60 ° C por 24 h e armazenadas em recipientes plásticos na temperatura e umidade ambientes.

3.2 Preparação da biomassa

Com o intuito de se obter um material mais homogêneo e com maior superfície de contato durante o tratamento físico-químico, as amostras passaram por um pré-tratamento mecânico, através do uso de moinho de facas.

O material moído foi selecionado por peneira de 20 *mesh*.

Com o auxílio da balança analítica de infravermelho (Shimadzu - Moisture balance MOC 120H, Quioto, Japão), 1 g de biomassa foi adicionada no prato de pesagem da mesma a 105 °C até o peso ficar constante, a fim de determinar a umidade do material. Esta etapa se repetiu sucessivamente antes de cada pré-tratamento ser aplicado.

3.3 Pré-tratamento

Com o objetivo de facilitar a etapa de hidrólise enzimática e, consequentemente, a máxima liberação de glicose para a obtenção futura do bioetanol, diferentes pré-tratamentos foram aplicados no bagaço de cana-de-açúcar. Os mesmos iniciaram-se nas dependências do Laboratório de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), sob coordenação do Prof. Dr. Antônio Aprígio da Silva Curvelo. Foi realizado o tratamento hidrotérmico

por intermédio da autoclave eletrônica (Regmed – modelo AU/E-20, com capacidade para 20 L) na temperatura de 160 °C (7 - 8 atm de pressão).

Amostras de aproximadamente 100,0 g de bagaço, massa seca, foram tratadas com 1.200 mL de água, ocorrendo variação no tempo reacional, sendo utilizado 4 intervalos neste mesmo procedimento. O reator levou 30 min para atingir a temperatura de 160 °C, a partir da estabilização desta, foi cronometrado o tempo de reação. O tempo de 0 min corresponde ao momento em que o reator atingiu a temperatura escolhida, seguido dos tempos de 30 min, 45 min e 60 min, decorrentes do período de reação. Ao final desta, o vapor gerado foi liberado gradualmente até a reação atingir a temperatura de 100 °C, sendo o reator então descarregado.

O outro processo de tratamento empregado foi o organossolve, no qual aplicou-se uma solução de etanol 50%. Ele foi conduzido em reatores fabricados pela oficina do Instituto de Química de São Carlos, imersos em banho de glicerina a 190 °C (Marconi), tendo o tempo reacional como variável nos intervalos de 50 min, 100 min e 150 min. Foram medidas 10,0 g de bagaço, massa seca, para reagir com 110 mL de solução, acarretando uma relação sólido/líquido de 1:11.

Adicionalmente, a combinação destes tratamentos também foi abordada, sendo realizado com parte do material previamente tratado hidrotermicamente nos tempos de 30 min e 60 min, conduzidos para um tratamento subsequente com solvente orgânico, etanol 50%, nas mesmas condições descritas para o tratamento organossolve.

Ao término de cada pré-tratamento, o material resultante foi filtrado em bomba a vácuo e a biomassa passou por diversas lavagens em água, para a retirada de quaisquer resíduos formados durante a reação. Para os tratamentos envolvendo solvente orgânico, as primeiras lavagens foram conduzidas com o solvente e posteriormente com água. Em todos os tratamentos as lavagens foram realizadas até a obtenção do pH neutro. Imediatamente, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C por 72 h e armazenadas em sacos plásticos na temperatura ambiente. Foram medidas as massas restantes, comparando com o valor inicial, a fim de se obter o rendimento do tratamento empregado.

3.4 Extração dos carboidratos solúveis e extrativos

Para a caracterização química de materiais lignocelulósicos *in natura*, a remoção de extrativos é uma etapa fundamental, pois evita que componentes presentes nos extrativos interfiram nas análises subsequentes de caracterização, gerando resultados superestimados.

Neste procedimento foram confeccionados saquinhos de extração, feitos com papel filtro semi-quantitativo, nas proporções de 10 cm de largura e 14 cm de comprimento. Uma massa de 2 g de material moído foi separada em cada envelope de filtro e então o mesmo foi grampeado lateralmente. Estes saquinhos foram inseridos no extrator Soxhlet para extração.

Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionadas bolinhas de vidro e 400 mL do solvente, sendo este conjunto levado a uma manta de aquecimento, acoplando-se neste balão o extrator Soxhlet e o condensador, no qual foram conectadas mangueiras de água. O aparelho Soxhlet possui um sifão que possibilita o refluxo contínuo do solvente, pois o aquecimento recebido pelo balão através da manta térmica provoca a evaporação do solvente que é condensado pelo condensador de bolas refrigerado. Uma vez atingido o nível do sifão, o solvente retorna para o balão, reiniciando o processo e fechando um ciclo.

O primeiro solvente a ser aplicado foi uma solução de cicloexano-etanol na proporção 1:1, sendo cronometrados 8 h de extração após o primeiro ciclo. Em seguida, o solvente foi substituído por água e este foi aplicado 5 ciclos com duração de 8 h cada, até a obtenção da ausência de coloração. Este procedimento foi proposto pelo Prof. Dr. George Jackson do Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

Finalizado os ciclos de reação, as amostras foram retiradas do Soxhlet e filtradas em um cadinho previamente tarado, fazendo-se o mínimo uso de água para a transferência quantitativa da massa para o cadinho. Decorrida esta etapa, o cadinho com a amostra foi colocado na estufa a 100 °C e sua secagem acompanhada a cada 1 hora até massa constante.

Segundo HOUGHTON e colaboradores (131), não há interferência na composição química nesta temperatura de secagem, pois os autores demonstraram que até 100 °C não há diferença significativa na liberação dos açúcares, portanto, a biomassa foi seca sem que acarretasse em alteração na hidrólise enzimática e na composição química da biomassa. A porcentagem de extrativos foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ extrativos} = \frac{(\text{massa bagaço seco} - \text{massa do bagaço livre de extrativos}) \times 100}{\text{Massa do bagaço seco}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Após a remoção dos extrativos as amostras *in natura* foram submetidas à caracterização química do conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina.

3.5 Caracterização química da biomassa *in natura* e amostras pré-tratadas

As amostras de materiais lignocelulósicos, antes e após as diferentes estratégias de pré-tratamento, foram caracterizadas quanto à sua composição química de acordo com os protocolos estabelecidos por Rocha e colaboradores (132) e validada por Gouvea et al.(133) com algumas adaptações realizadas pelo Prof. Dr. George Jackson do CTBE. Este procedimento requer a hidrólise química total com o ácido sulfúrico concentrado e padronizado, o que garante a eficiência do processo.

3.5.1 Preparação das amostras

O material lignocelulósico, bagaço de cana, moído e com o teor de umidade determinado, teve sua massa medida em balança analítica (Shimadzu – modelo AUY 220) para a processo de caracterização química, sendo coletado 2,000 g (+/- 1 mg).

3.5.2 Hidrólise ácida concentrada

Em banho termostatzado (GE-Multi Temp III) a 45 °C, adicionou-se a cada amostra 15 mL de ácido sulfúrico 72%, ambientalizado nesta temperatura e, então, com o auxílio de um bastão de vidro, a amostra foi agitada por 7 min.

Decorrido o tempo de hidrólise, foi adicionado 50 mL de água destilada, de um total de 275 mL. O restante da água, por intermédio de uma pisseta, foi utilizado para lavar e transferir quantitativamente a amostra digerida com ácido no béquer para um erlenmeyer de 500 mL. Em seguida, este foi autoclavado a 121 °C por 30 min.

Após a descompressão da autoclave, os frascos foram resfriados sob temperatura ambiente, filtrados em papel filtro quantitativos para sólidos gelatinosos faixa preta, que possuem a quantidade de cinza pré-determinada (0,00021 g), e foram secos a 105 °C em estufa por 2 h. O erlenmeyer contendo a amostra foi lavado até o preenchimento do balão volumétrico de 500 mL, o qual foi reservado para posteriores análises de açúcares, lignina solúvel e produtos de degradação.

Removido o balão de 500 mL foi posto um frasco de descarte e o papel de filtro foi lavado com aproximadamente 1,5 - 2,0 L de água destilada até pH neutro, evitando a queima do papel na etapa subsequente. Retirado o papel de filtro do funil, transferiu-se para um pesa-filtro e estes foram colocados em estufa a 105 °C para secagem até massa constante.

3.5.3 Determinação da lignina

3.5.3.1 Fração insolúvel em ácido

A fração sólida residual retida no papel de filtro, após ser retirada da estufa a 105 °C e encaminhada para um dessecador, teve sua massa medida, parte esta que corresponde a lignina insolúvel e cinzas. Esta fração foi transferida para cadinhos de porcelana e calcinada em mufla a 800 °C por 2 h. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, foi determinado o valor correspondente as cinzas da lignina. Portanto, o valor real de lignina insolúvel foi determinado pelo desconto do teor de cinzas.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \frac{Ml - Mc}{Mb} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

Ml: massa lignina insolúvel seca (g)

Mc: massa de cinzas (g)

Mb: massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade (g)

3.5.3.2 Fração solúvel em ácido

A quantificação do teor de lignina solúvel deu-se por análise de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível (Perkin Elmer - Lambda 25). Foram colocados 5 mL de amostra após a hidrólise ácida em um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 40 gotas ou aproximadamente 2 mL de NaOH 6,5 mol/L.

A análise ocorre em soluções básicas, porque em pHs alcalino deve-se aumentar a intensidade dos espectros de absorção devido ao fato das moléculas se encontrarem desagregadas, prevalecendo em sua forma monomérica. Neste caso, o livre caminho da luz é menor e passa a ser absorvida pelas moléculas de lignina. (87*) Esta medida considerou a interferência da absorção devido a possível presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

$$C_{lig} = 0,04187\{A_{280nm} - [(C_{Furfural} \times \epsilon_{Furfural}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF})]\} - 0,0003279$$

(Eq. 3)

Onde:

C_{lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado ($g.L^{-1}$);

Absortividade da lignina: 0,04187

coeficiente linear da absortividade da lignina: 0,0003279

A_{280nm} : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;

ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural ($114 L.g^{-1} cm^{-1}$),

$\epsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural ($146,85 L.g^{-1} cm^{-1}$),

C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado ($g.L^{-1}$), determinado previamente;

$C_{Furfural}$: Concentração de furfural no hidrolisado ($g.L^{-1}$), determinado previamente;

3.5.3.3 Lignina total:

$$\% \text{ lignina total} = \% \text{ lignina solúvel} + \% \text{ lignina insolúvel} \quad (\text{Eq. 4})$$

3.5.4 Cinzas totais

Primeiramente, os cadinhos de porcelana foram calcinados a temperatura de 800 °C por 3 horas em uma mufla e posto em um dessecador até temperatura ambiente. Foram medidos 2 g de cada material nos cadinhos previamente calcinados e tarados. Estas amostras foram transferidas para uma mufla, com rampa de aquecimento, programada para 1 h a 200 °C, 1 h a 400 °C e 2 horas a 800 °C. Posteriormente, o cadinho foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e a massa de cinzas foi determinada pela equação abaixo:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa de cinzas obtida}}{\text{massa seca da biomassa inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

3.5.5 Análise de furfural

A determinação da presença de furfural nas amostras, foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra high performance liquid chromatography* – UHPLC, Thermofisher, modelo Ultimate 3000), em uma coluna C18, utilizando-se como solventes o tampão fosfato de sódio (10mM; pH 2,6) e acetonitrila na proporção de 19/1 (tampão/acetonitrila) a uma vazão de 1 ml/min a temperatura de 25 °C. Os compostos foram detectados na presença de um detector UV-visível em 276 nm. Por intermédio do padrão e considerando o fator de correção para o furfural, fez-se a curva de calibração para posterior cálculo das amostras. (134)

3.5.6 Análise dos carboidratos, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos

Os hidrolisados da metodologia de caracterização do material lignocelulósico (item 3.5) e da hidrólise enzimática (item 3.7), ou seja, os açúcares, ácidos orgânicos e hidroximetilfurfural foram analisados pelo método cromatográfico utilizando um cromatógrafo de troca aniônica de alta eficiência acoplada com detecção eletroquímica por amperometria pulsada (*High performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection* – HPAE-PAD) equipado com uma pré-coluna e uma coluna de troca aniônica CarboPac PA1 (Dionex ICS 5000, ThermoFisher). Para as amostras oriundas do processo de caracterização, houve a neutralização do pH das mesmas com uma solução de hidróxido de bário 200

mmol.L⁻¹, centrifugando-as seguidamente, para a separação do sal formado em reação com ácido sulfúrico, decorrente da hidrólise ácida da metodologia aplicada. Como fase móvel foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio 400 mM com fluxo de 1,0 mL. min⁻¹ com gradiente de concentração (16 – 400 mmol/L) por 50 min, visando uma melhor separação dos componentes, utilizando HMF, ramnose, arabinose, galactose, glicose, xilose, ácido glucurônico e celobiose como padrões. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto. Para o cálculo final, foram considerados os fatores de correção aplicados na conversão de açúcares monoméricos em anidromônmeros. (135)

3.6 Enzimas

No procedimento de hidrólise enzimática, foi utilizado o coquetel enzimático Accellerase (Genecor) e β – glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich).

3.7 Hidrólise enzimática

A eficácia de um pré-tratamento pode ser averiguada pelo rendimento glicosídico, assim sendo, a hidrólise enzimática faz-se necessária. Nesta etapa buscou-se adequar a metodologia nas condições ótimas do coquetel enzimático, conforme estudos anteriores. (2)

O material lignocelulósico pré-tratado foi aplicado na hidrólise enzimática na concentração de 4,3% (m.v-1) de substrato em 50 mM de tampão citrato de sódio (pH 5,0) sob agitação de 150 rpm a 50°C.

Com o objetivo de analisar a eficiência dos pré-tratamentos e não a máxima produção de glicose, optou-se por trabalhar com cargas enzimáticas relativamente baixas, sendo a mistura enzimática constituída de 10 Unidades de Papel de Filtro (FPU.g⁻¹ biomassa) Accellerase 1500 (Genencor, Rochester, NY, EUA) e 15 Unidades de β –glicosidase (BGU.g⁻¹ biomassa) de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). A atividade enzimática dessas enzimas foi determinada separadamente, desconsiderando sinergismo.

O teor de glicose liberado após 12, 24, 48 e 72 horas foi analisado pelo método cromatográfico, conforme descrito no item 3.5.6.

A eficiência de hidrólise da celulose (EH) foi determinada pela equação abaixo, como descrita na literatura. (11)

$$EH = \frac{G}{C_{bg} \times C_{cel} \times 1,1} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: EH: eficiência de hidrólise da celulose

G: conteúdo de glicose liberado na hidrólise (g.L⁻¹)

C_{cel}: % de celulose presente na amostra

C_{bg}: concentração inicial de biomassa (g.L⁻¹)

1,1: fator de correção baseado na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise.(11)

3.8 Difração de raios X

Os dados de difração de raios X foram obtidos em difratômetro do modelo Rigaku Rotaflex RU200B (Tóquio, Japão) usando radiação monocromática com anodo rotatório de cobre (1,5418 Å) a 45 kV e 36 mA, e monocromador de grafite no intervalo angular de 5 ° a 65 °, passo angular de 0,05 ° e taxa de varredura de 2 °/min.

O cálculo do índice de cristalinidade (IC) para todas as amostras foi realizado de acordo com o procedimento proposto anteriormente. (136 - 137) O IC é obtido a partir da relação entre a altura do pico da celulose na fase cristalina (I₀₀₂) e a altura do pico na região amorfa (I_{am}) após a subtração do branco (porta-amostra vazio nas mesmas condições) conforme a equação:

$$IC = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

I_c: Índice de cristalinidade (%);

I₀₀₂: Intensidade do pico no plano cristalino (2θ = 22,36°);

I_{am}: Intensidade do pico na fase amorfa (2θ = 18,24°)

Ainda o mesmo foi calculado por amostra comercial, contendo 100% de celulose microcristalina (Avicel PH-101, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) para comparação. O experimento foi conduzido em duplicata.

3.9 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Este procedimento foi realizado em colaboração com o doutorando Oigres Bernadelli, conforme trabalho anterior (10). Foram obtidos espectros de carbono ^{13}C ssNMR, para as biomassas com e sem pré-tratamentos, em um espectrômetro Varian Inova, nas frequências de 100,5 MHz para ^{13}C e 400 MHz para o hidrogênio (^1H). Foi utilizada uma sonda Jackobsen 7 mm de dupla ressonância com sistema pneumático de rotação da amostra em torno do ângulo mágico integrado. Neste sistema a amostra foi rotacionada com a frequência de 4,5 kHz com precisão entorno de 2 Hz. A sequência de pulso utilizada, nomeada apenas como CPMAS TOSS, integra a excitação através de polarização cruzada entre os núcleos de ^1H e ^{13}C com rampa (CP, do inglês: *Ramped cross-polarization*), rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês: *Magic angle spinning*), eliminação das bandas laterais (TOSS, do inglês: *Total Suppression of Spinning Sidebands*) e desacoplamento heteronuclear no canal do ^1H , o que possibilita a obtenção de um espectro de alta resolução de ^{13}C . Foram utilizados em todos os experimentos de SSNMR, tempo de pulso $\pi/2$, com largura de 5 μs (^{13}C) e 5 μs (^1H), tempo de contato do CP de 1 ms, tempo de aquisição de 20 ms e intervalo de repetição entre experimento de 2 s, totalizando aproximadamente 4000 repetições para cada experimento, o que leva a aproximadamente, um tempo de 2,5 horas.

3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise morfológica da parede celular, as amostras moídas e secas foram recobertas com ouro (Au) em um metalizador Balzers SCD 050 utilizando uma corrente de 40 mA durante 60 s.

As imagens foram obtidas e analisadas utilizando microscópio equipado com um canhão de emissão de campo (FEI Quanta 650 FEG, USA), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) em Campinas/SP em colaboração com a Profa. Dra Camila A. Rezende.

As imagens foram capturadas em diferentes áreas das amostras, com análise de magnificação variável, a fim de demonstrar uma melhor representatividade do espaço como um todo.

3.11 Microscopia Confocal

A microscopia confocal foi utilizada como uma técnica de contraste por meio da verredura de uma análise local ponto a ponto, podendo medir por cada ponto da imagem o espectro emitido e o decaimento temporal. Através disso é possível obter informações químicas do arranjo molecular, no caso, da lignina.

Para o preparo das lamínulas, as amostras pré-tratadas e *in natura* moídas foram suspensas em água. Foi utilizado um microscópio confocal Zeiss LSM 780 com objetiva de 20x.

O total de pixels (pontos) por imagem foi de 1024 x 1024. A área de cada pixel está associada a resolução ótica da objetiva (20x) utilizada de resolução lateral de aproximadamente 300 nm. Procurou-se fazer o ajuste focal de maneira a se obter informação da superfície das fibras, pois este critério pode ser igualmente aplicado a todas as outras amostras estudadas.

A excitação por dois fótons da lignina foi feita com um laser pulsado (100 fs, com repetição de 80 MHz) em 800 nm e potência média de 15 mW. A classificação por espectro ocorreu pela seleção de cinco classes espectrais selecionadas, cada uma delas foi associada a uma cor específica atribuída aos pixels correspondentes. Também foi realizada a construção de um histograma que fornece a contribuição de cada classe no conjunto de espectros gerados pela imagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química

O material pré-tratado tanto pelo processo hidrotérmico quanto pelo organossolve apresentaram modificações na sua coloração (Figura 4.1.1), havendo um escurecimento em comparação ao *in natura*. Em altas temperaturas, os grupos acetilas da hemicelulose, são hidrolisados formando ácido acético, responsável pela catálise ácida das ligações do complexo lignina-carboidrato, além do calor poder desencadear a condensação da lignina. (135) Estas reações geram combinações que alteram as propriedades mecânicas e físico-químicas do bagaço de cana *in natura*.

Figura 4.1.1 - Modificação na coloração do bagaço: Amostra *in natura* (A) em comparação com amostra provenientes do pré-tratamento hidrotérmico por 45 min (B) e do organossolve por 50 min (C).

Fonte: Elaborada pela autora

A constituição do bagaço de cana-de-açúcar varia conforme a espécie, sazonalidade, constituição do solo, entre outros fatores, não permitindo valores fixos dos seus componentes, entretanto, os valores encontrados para o bagaço de cana *in natura*, por intermédio do sistema cromatográfico após a caracterização química,

via hidrólise ácida (item 3.5.2) dispostos nas Tabelas 4.1.1 – 4.1.3 estão dentro da faixa da literatura. (138)

Antes de cada análise de determinação da composição química e dos experimentos físico-químicos, como parâmetro importante para determinação de cada componente e medidas em base seca, o teor de umidade foi averiguado e os valores variaram entre 7 - 10%.

A quantificação dos principais constituintes apresentados na Tabela 4.1.1 demonstra que os pré-tratamentos hidrotérmicos a 160 °C pouco afetaram na distribuição da composição química da parede celular do vegetal, sendo que houve uma baixa solubilização da hemicelulose, proporcional ao tempo de reação e, consequentemente, um aumento das outras frações, neste caso da celulose.

O teor de hemiceluloses, ou polioses, estão dispostos nas Tabelas 4.1.1 – 4.1.3 como a soma dos carboidratos e ácido urônicos detectados pelo sistema cromatográfico descrito (item 3.5.6, sendo especificamente a adição de fucose, arabinose, ramnose, xilose, ácido glucurônico, furfural e galactose, considerando seus respectivos fatores de correção). (135) Dentre estes monossacarídeos, a xilose apresentou valores significativos de alteração dentre os pré-tratamentos, sendo ela responsável por quase todo o teor das polioses presente no bagaço de cana-de-açúcar.

O pré-tratamento hidrotérmico nas condições estudadas não afetou a fração de lignina total em comparação ao bagaço de cana *in natura*, conforme a Tabela 4.1.1, sendo necessária para este fim a inserção de uma nova etapa, como a combinação deste tratamento com o processo envolvendo solvente orgânico (etanol 50%).

Tabela 4.1.1 - Composição química dos principais constituintes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento hidrotérmico

Pré-tratamentos	Composição (%)				
	Celulose	Polioses	Lignina	Cinzas	Extrativos
<i>In natura</i>	38,30 ± 0,10	20,10 ± 0,10	29,00 ± 1,00	6,00 ± 0,30	7,00 ± 0,40
Hidrotérmico 0 min	41,50 ± 0,50	18,80 ± 0,03	28,80 ± 1,00	4,50 ± 0,30	
Hidrotérmico 30 min	46,50 ± 0,30	19,30 ± 0,10	27,80 ± 3,00	4,00 ± 1,80	
Hidrotérmico 45 min	50,00 ± 4,00	16,30 ± 0,10	28,30 ± 0,20	5,50 ± 0,10	
Hidrotérmico 60 min	57,00 ± 0,30	16,80 ± 0,20	28,20 ± 0,80	3,70 ± 0,50	

Fonte: Elaborada pela autora

A lignina tratada com soluções alcalinas ou solventes orgânicos a temperatura elevada pode sofrer ruptura nas ligações de éter entre as unidades de fenilpropano, formando grupos fenólicos, responsáveis por sua solubilização. (86) A temperatura é um fator importante neste processo, pois a lignina possui um ponto de transição vítrea (ou de amolecimento), que varia consideravelmente conforme a origem e o método utilizado para o seu isolamento, geralmente variando entre as temperaturas de 135 ~ 190°C, sendo também influenciada pela umidade. Estes parâmetros podem explicar o aumento da solubilização de uma fração da lignina no pré-tratamento organossolve a 190 °C em diferentes intervalos de tempo, sendo mais eficaz, acima de 100 min, conforme a Tabela 4.1.2 demonstra.

Tabela 4.1.2 - Composição química dos principais constituintes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento organossolve

Pré-tratamentos	Composição (%)				
	Celulose	Polioses	Lignina	Cinzas	Extrativos
<i>In natura</i>	38,30 ± 0,10	20,10 ± 0,10	29,00 ± 1,00	6,00 ± 0,30	7,00 ± 0,40
Organossolve 50 min	55,30 ± 8,00	14,90 ± 3,10	21,80 ± 2,00	4,60 ± 0,10	
Organossolve 100 min	65,60 ± 5,90	7,90 ± 0,10	18,50 ± 0,10	5,26 ± 0,02	
Organossolve 150 min	69,30 ± 4,30	9,10 ± 0,03	14,60 ± 0,10	5,70 ± 0,20	

Fonte: Elaborada pela autora

Os pré-tratamentos combinados hidrotérmicos de 30 e 60 min seguido pelo organossolve a 190 °C por 150 min resultaram na maior solubilização da hemicelulose e lignina, elevando o teor de celulose de 38,34 % na amostra *in natura* para 79,19 e 76,40% e diminuindo expressivamente os valores de lignina de 29,17% da amostra *in natura* para 10,89 e 13,04 %, respectivamente, conforme a Tabela 4.1.3. É razoável considerar que a união dos pré-tratamentos aumentaria a eficácia do processo quanto ao aumento da fração da celulose frente aos outros componentes, pois considera duas vias de atuação para solubilização da hemicelulose (poliose) e lignina.

Tabela 4.1.3 - Composição química dos principais constituintes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento combinado hidrotérmico e organossolve

Pré-tratamentos	Composição (%)				
	Celulose	Polioses	Lignina	Cinzas	Extrativos
<i>In natura</i>	38,30 ± 0,10	20,10 ± 0,10	29,00 ± 1,00	6,00 ± 0,30	7,00 ± 0,40
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 50 min	64,80 ± 7,70	9,70 ± 0,10	21,20 ± 0,10	4,20 ± 0,10	
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 100 min	66,30 ± 8,70	10,50 ± 0,10	15,70 ± 0,20	5,60 ± 0,10	
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 150 min	79,20 ± 0,50	5,20 ± 0,01	10,90 ± 0,20	6,00 ± 0,30	
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 50 min	64,40 ± 5,0	10,60 ± 0,06	16,70 ± 0,30	5,20 ± 0,20	
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 100 min	63,70 ± 0,90	6,80 ± 0,09	18,90 ± 0,10	5,00 ± 2,00	
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 150 min	76,40 ± 2,10	7,40 ± 0,05	13,00 ± 0,50	5,34 ± 0,03	

Fonte: Elaborada pela autora

A influência do pré-tratamento especificamente na lignina presente na biomassa, pode melhor ser visualizada pela Figura 4.1.2 a qual demonstra o efeito solúvel e insolúvel da lignina.

Comparando a Tabela 4.1.1 com a Figura 4.1.2 (A) é possível notar que apesar do teor de lignina total possuir valores próximos entre as amostras, a distribuição entre as frações solúveis e insolúveis apresenta um comportamento bem diferente, sendo mais expressivo esta diferença nos tempos de reação acima de 30 min. Isto permite identificar que o pré-tratamento hidrotérmico possivelmente está alterando a conformação da lignina em comparação a amostra *in natura*, pois conforme aumenta o tempo de reação, há um aumento da proporção de lignina insolúvel, sendo de 14,21% para 22,27% nas amostras *in natura* e hidrotérmico 60 min, respectivamente. Para avaliar melhor este parâmetro, análises físicas, com a lignina sendo alvo do estudo, fazem-se necessária.

A Tabela 4.1.2 e a Figura 4.1.2 (B) permitem visualizar que em ambas há uma diminuição gradual do teor de lignina, sendo que as frações de lignina solúvel e insolúvel decrescem gradualmente conforme o tempo de reação do pré-tratamento,

solubilizando-a. Assim também neste pré-tratamento realizado após uma etapa hidrotérmica, como no caso dos pré-tratamentos combinados empregados neste estudo e demonstrados pela Figura 4.1.2 (C) e (D).

Analisando a Figura 4.1.2 (C) é possível notar que o pré-tratamento hidrotérmico por 30 min seguido do uso do organossolve foi mais eficaz na remoção da lignina insolúvel após 100 min de reação da biomassa com o solvente orgânico, enquanto a lignina solúvel teve uma gradual remoção. Já a Figura 4.1.2 (D) demonstra que o pré-tratamento hidrotérmico por 60 min seguido do uso de organossolve por 50 min, apresentou uma queda dos valores de tanto lignina insolúvel, quanto solúvel. Assim como para uma melhor compreensão do efeito do pré-tratamento hidrotérmico, os demais pré-tratamentos avaliados devem ser melhor caracterizados e as algumas técnicas físicas, como a microscopia confocal, colaboram para isto.

Figura 4.1.2 Distribuição da lignina total separada entre fração solúvel e insolúvel nos diversos pré-tratamentos aplicados (A) hidrotérmico; (B) organossolve; (C) hidrotérmico 30 min seguido por organossolve; (D) hidrotérmico 60 min seguido por organossolve.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2. Difração de Raios X

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos em muitos casos aumenta após as etapas de pré-tratamento, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas. (106) A informação específica sobre a cristalinidade da celulose nativa na biomassa, ou seja, a fração da fase cristalina torna-se difícil de ser obtida, visto que a hemicelulose, lignina e as frações amorfas da celulose contribuem em conjunto para o sinal de fase amorfa da amostra. O difratograma na figura 4.2.1 demonstra a altura do pico da celulose na fase cristalina (I_{002}) e a altura do pico na região amorfa (I_a), os quais foram utilizados para o cálculo de índice de cristalinidade de cada amostra.

Figura 4.2.1 - Difratograma obtido para amostra de bagaço de cana *in natura*

Fonte: Elaborada pela autora

O índice de cristalinidade (IC) para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas foram medidos conforme a metodologia 3.9 descrita. Fez-se a partir deste cálculo uma relação com a porcentagem de celulose presente em cada amostra (Figura 4.2.2). A condição de pré-tratamento relacionada ao teor de celulose disponível é apresentada na Tabela 4.1.1. Como amostra padrão a fim de comparação, fez-se também a análise em Avicel, contendo 100% de celulose microcristalina.

Figura 4.2.2 - Relação do índice de cristalinidade e celulose presente nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e *in natura*

Fonte: Elaborada pela autora

Por intermédio da Figura 4.2.2 é possível notar que houve uma relação diretamente proporcional entre as porcentagens de celulose e o índice de cristalinidade (IC) para amostras com o teor de celulose abaixo de 60%. No entanto, houve pequenos desvios (2-3%) em relação a esta linearidade, nesta reta definida de dentro do espaço amostral, porém, considerando os desvios do teor de celulose, eles não são significativos. Em geral, os dados demonstram que a medida que ocorre o aumento do teor de celulose disponível, o IC da amostra também aumenta, mas não especificamente relacionada a celulose cristalina, pois este aumento pode ser justificado pela remoção dos componentes amorfos presentes.

Ainda é possível observar na Figura 4.2.2 que para amostras com o teor de celulose maior do que 60% o IC não possui grande variação, deixando o aspecto linear da relação entre o IC com a fração de celulose presente, pois grande parte da hemicelulose e lignina já foram removidas e possivelmente a celulose cristalina não está sendo influenciada.

4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN é um método alternativo a cromatografia (item 3.5), sem necessitar de preparação específica da amostra, podendo assim ser também confirmatória a análise cromatográfica. Foi então utilizada para verificar a remoção

da hemicelulose e lignina das amostras pré-tratadas. A atribuição dos deslocamentos químicos foi baseada em dados da literatura e na comparação direta com as amostras de bagaço de cana de um artigo anterior. (136 - 137,10) A correspondência de cada pico está descrita na Tabela 4.3.1.

Tabela 4.3.1 Atribuição dos deslocamentos químicos observados por RMN para bagaço de cana-de-açúcar

Pico	Grupo Químico	Deslocamento (ppm)
1	CH ₃ em grupos acetil da hemicelulose	21,5
2	Carbonos metoxil-aril da lignina	56,2
3	C ₆ da celulose amorfa; C ₆ da hemicelulose; carbonos OC _γ H ₂ da lignina	62,5
4	C ₆ da celulose cristalina	64,8
5	C _{2,3,5} da celulose; carbono OC _α H ₂ da lignina	72,5
6	C _{2,3,5} da celulose e hemicelulose	74,4
7	C ₄ da celulose amorfa e hemicelulose; carbonos OC _β H ₂ da lignina	83,5
8	C ₄ da celulose cristalina	87,9
9	Ombro do C ₁ da hemicelulose	101,8
10	C ₁ da celulose	105
11	C ₂ e C ₆ aromáticos do grupo siringil; C ₅ e C ₆ aromáticos do grupo guaiacil	110 – 115
12	C ₂ aromático nos grupos guaiacil	126,6
13	C ₁ e C ₄ aromáticos do grupo siringil	134,5 e 136,9
14	C ₃ e C ₅ aromáticos do grupo siringil; C ₁ e C ₄ aromáticos do grupo guaiacil	148
15	C ₃ e C ₅ aromáticos do grupo siringil	153,5
16	Grupos carboxil da lignina	163 – 180
17	Grupos carboxil da hemicelulose	173,6

Fontes: TEMPLETON *et al.* 2010; WICKHOLM *et al.* 1998 (136 – 137)

A Figura 4.3.1 mostra os espectros CPMASTOSS das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* sem os extrativos. Analisando esta figura percebemos espectros semelhantes, então a mesma discussão pode ser realizada, os picos na região de 50 a 120 ppm são característicos predominantemente de carbonos da celulose, entretanto, com contribuições de sinais da hemicelulose e lignina. Os picos 3 em 62,6 ppm e 7 em 84 ppm são característicos, respectivamente, de carbonos C₆ e C₄ da fração amorfa da celulose, enquanto os picos 4 em 65,0 ppm e 8 em 88,9 ppm são característicos aos carbonos C₆ e C₄ da fração cristalina da celulose. (139 - 141) Os sinais de lignina estão distribuídos ao longo de toda região espectral, porém, têm seus picos identificados como 2, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 exclusivos da lignina. Assim como a lignina, a hemicelulose tem sinais distribuídos ao longo de

toda região espectral, no entanto, os picos dos carbonos da hemicelulose têm contribuições em 1, 3, 6, 7, 9 e 17. (136 - 137, 142, 10) O fato de retirar os extrativos não alterou nada a sua composição como apresentado pela Figura 4.3.1.

Figura 4.3.1- Espectros CPMAS TOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra controle (*in natura*) e para a amostra sem os extrativos

Fonte: Elaborada pela autora

Os espectros das amostras pré-tratadas hidrotérmicamente em diferentes tempos (Figura 4.3.2) mostraram-se muito semelhantes aos espectros obtidos para as amostras controles (*in natura*), sugerindo assim que estes pré-tratamentos não promovem uma remoção eficiente da hemicelulose e lignina, sendo de acordo com trabalhos anteriores. (143)

Figura 4.3.2 - Espectros CPMAS¹³C em bagaço de cana-de-açúcar da amostra hidrotermicamente pré-tratadas em diferentes tempos (0, 30, 45 e 60 minutos).

Fonte: Elaborada pela autora

Contrariamente, as amostras pré-tratadas com solvente orgânico (etanol 50%), no pré-tratamento organossolve com o tempo igual a 50 min, ocorre uma pequena redução nos sinais de hemicelulose, picos 1 e 17, assim como nos picos 2, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 (Figura 4.3.3). Porém, a partir de 100 minutos de pré-tratamento isso se intensifica, acarretando em uma clara redução, quase que por completo, desses sinais. Isto mostra que para o bagaço, o pré-tratamento organossolve a um tempo superior a 100 minutos já é suficiente para uma eficaz remoção tanto da lignina quanto da hemicelulose.

Figura 4.3.3 - Espectros CPMASTOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas com organossolve

Fonte: Elaborada pela autora

Para as amostras pré-tratadas hidrotérmicamente durante 30 ou 60 minutos, seguido por tratamento organossolve em diferentes tempos (Figura 4.3.4 e Figura 4.3.5), o pré-tratamento com o tempo igual a 50 minutos, ou superior, ocorre uma redução nos sinais de hemicelulose, picos 1 e 17, assim como nos picos 2, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 referentes a lignina. Isto mostra que para o bagaço, o pré-tratamento organossolve, a um tempo superior a 50 minutos, concomitantemente com um pré-tratamento hidrotérmico, mostra-se suficiente para uma eficaz remoção tanto da lignina quanto da hemicelulose.

O perfil de remoção de lignina demonstrado pelas Figuras 4.3.3 – 4.3.5 são completamente compatíveis com o previamente obtido por cromatografia, apresentado nas Tabelas do item 4.1.

Figura 4.3.4 - Espectros CPMASTOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas hidrotermicamente durante 30 minutos combinado com organossolve em diferentes tempos

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4.3.5 - Espectros CPMASTOSS em bagaço de cana-de-açúcar da amostra pré-tratadas hidrotermicamente durante 60 minutos e com organossolve em diferentes tempos.

Fonte: Elaborada pela autora

Através dos experimentos de RMN ainda foi estabelecido a cristalinidade presente de cada amostra e estabelecido uma relação com os resultados de difração de raios x para as mesmas (Figura 4.3.6).

Figura 4.3.6 - Relação do índice de cristalinidade e celulose presente nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e *in natura* por RMN e difração de raios x

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme a Figura 4.3.6 é possível notar que os resultados do IC através da técnica de RMN apresentaram uma relação linear do IC com o teor de celulose para o pré-tratamento hidrotérmico, no entanto, amostras com mais de 60% de celulose em seu conteúdo apresentam valores muito próximos do IC. Nestes casos a maioria da hemicelulose e lignina originalmente presentes na amostra *in natura* foi removida e possivelmente a celulose cristalina não está sendo influenciada. A mesma discussão dos resultados de difração de raios x podem aqui ser aplicadas.

A Figura 4.3.6 demonstra que a análise de cristalinidade tanto através da técnica de RMN ou por raios x acarreta um perfil similar no resultados por meio da relação do IC com o teor de celulose. A fim de relacionar estas técnicas, foi realizada uma relação do IC de cada amostra com o IC do padrão Avicel, conforme a Figura 4.3.7, que conforme observado, possuem valores próximos para ambas técnicas, justificando o uso de qualquer uma delas para análise do parâmetro de IC.

Figura 4.3.7 - Relação do índice de cristalinidade nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas e *in natura* com o IC do Avicel por RMN e difração de raios x

Fonte: Elaborada pela autora

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Primeiramente, as imagens de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FESEM) mostram que as amostras de bagaço *in natura* são formadas por fibras e por resíduos (pith), conforme a Figura 4.4.1. Durante os tratamentos, a quantidade de material particulado (pith) é mais facilmente degradada que as fibras. A maioria do material sólido que resiste ao tratamento é constituída por fibras, por isso, as comparações feitas entre as amostras tratadas são realizadas considerando-se as regiões fibrosas. A Figura 4.4.1 (a) mostra um panorama geral da amostra com as fibras indicadas pelas flechas amarelas e os resíduos pelas brancas, (b) mostra uma ampliação na superfície de um resíduo e (c) mostra uma ampliação na fibra.

Figura 4.4.1- Imagens da superfície de amostras de bagaço *in natura* obtidas por FESEM: (a) aspecto geral da amostra mostrando fibras (setas amarelas) e também resíduos (setas brancas); (b) ampliação sobre um resíduo e (c) ampliação na superfície de uma fibra.

Fonte: Elaborada pela autora

Os efeitos da degradação da parede celular após os tratamentos são evidentes quando a sua superfície é comparada à amostra sem tratamento (Figura 4.4.2). Na amostra *in natura* (Figura 4.4.2 a-c), os feixes de fibras não são evidentes e aparecem recobertos por uma camada superficial densa. Com os tratamentos, essa camada superficial é removida, como pode ser observado na Figura 4.4.2 (d-e) para a amostra tratada com organossolve por 50 minutos. Outro efeito do tratamento é a separação dos feixes de fibras do bagaço por efeito da remoção de lignina das amostras. Com a deslignificação, os feixes perdem a adesão entre si e começam a se distanciar, como exemplificado na Figura 4.4.2 (d, e, g). Além disso, o tratamento leva à formação de depósitos de material particulado na superfície, na forma de gotículas, de gotas maiores ou de pedaços de parede celular (Figura 4.4.2 d-i). Em particular, os depósitos na forma de gotas, que aparecem indicados por flechas nas Figuras 4.4.2 (f, h, i), sugerem ser depósitos de lignina, devido a semelhança com a superfície de outras amostras lignocelulósicas pré-tratadas com explosão a vapor, (144) ácido diluído (145 - 146) ou tratamentos organosolve. (147) A formação desses depósitos são atribuídos à retirada de lignina do interior da parede celular e a sua reposição na superfície por adsorção.

Figura 4.4.2 - Imagens da superfície de amostras de bagaço antes e após pré-tratamentos obtidas por FESEM: (a-c) bagaço *in natura*, mostrando feixes de fibras unidos e recobertos por uma camada superficial; (d-f) bagaço tratado com organosolve por 50 min e (g-i) com tratamento hidrotérmico por 60 min seguido de organosolve por 150 min. Nas amostras tratadas, observa-se a retirada da cobertura superficial, a separação de feixes de fibras e deposição de material particulado na superfície (flechas amarelas).

Fonte: Elaborada pela autora

As amostras tratadas com hidrotérmico 0 min apresentam uma morfologia muito semelhante a do bagaço *in natura*, como pode ser observado na Figura 4.4.3 (a-c) com feixes de fibras unidos e uma superfície recoberta por uma camada de material lignocelulósico. Em aumentos maiores (Figura 4.4.3 c), no entanto, observam-se pequenas gotículas distribuídas na superfície, que são efeito do tratamento, mesmo nesta condição branda. Estas gotículas não foram observadas nas amostras *in natura*.

Figura 4.4.3 - Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos em diferentes condições obtidas por FESEM: (a-c) hidrotérmico por 0 min, (d-f) hidrotérmico por 60 min; (g-i) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 50 min; (j-l) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 150 min.

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 4.4.3 (d-f) mostra a superfície de amostras submetidas a tratamento hidrotérmico por 60 minutos. As amostras tratadas com tratamento hidrotérmico apenas, durante 30, 45 ou 60 minutos, apresentam uma morfologia muito semelhante entre si, em que a camada superficial dos feixes de fibras foi removida (Figura 4.4.3 d-e) e estes começam a se separar. A quantidade de material particulado depositado na superfície dessas amostras é bem pequena, indicando que essa é uma característica de tratamentos mais severos. A Figura 4.4.3 (f) mostra a seção transversal do feixe de fibras em uma dessas amostras, onde se pode observar uma fibra na superfície do feixe mais desprendida das demais (indicada pela flecha amarela). As outras fibras, apesar de mostrarem evidências de degradação, encontram-se bastante ligadas entre si. Isso indica que, à medida que o pré-tratamento atua, as fibras mais superficiais vão se desprendendo e o feixe vai se tornando cada vez mais fino.

Ainda na Figura 4.4.3, as amostras submetidas a tratamentos hidrotérmicos por 60 minutos, seguidos de tratamentos organossolve por 50 minutos (g-i) ou 150 minutos (j-l) mostram-se em um estágio de degradação mais avançado que as amostras anteriores. A quantidade de material particulado depositado na superfície é bem maior, tanto na forma de gotas quanto de pedaços de parede celular removidos de outras áreas. No caso da amostra hidrotérmico 60 min combinado com organossolve 150 min, o que se observa em geral é que ela apresenta um desmembramento um pouco maior dos feixes de fibras em relação às outras amostras. Esse efeito pode ser ilustrado pela imagem do feixe de fibras na Figura 4.4.3 (k). Além disso, devido à remoção acentuada de camadas mais externas da amostra, fibras mais finas (fibrilas) de celulose começam a se tornar mais expostas em alguns pontos, como exemplificado na Figura 4.4.3 (l). Uma das fibrilas de celulose está indicada pela flecha amarela nessa imagem, mas muitas outras estão evidentes sobre a fibra central na imagem.

É importante ainda destacar as diferenças morfológicas entre a Hidrotérmico 60 min (Figura 4.4.3 d-f) e a Hidrotérmico 60 min combinado com Organossolve 150 min (Figura 4.4.3 j-l), que destaca a contribuição da etapa de tratamento organossolve para o estado final de degradação da amostra.

Em relação ao efeito da duração do tratamento organossolve, não é possível detectar diferenças significativas quando amostras tratadas com apenas com

organossolve por 50 ou 150 minutos são comparadas. Como mostrado na Figura 4.4.4, as imagens dessas amostras em diferentes aumentos mostram uma morfologia muito semelhante nos dois casos, com uma quantidade similar de resíduos depositados na superfície e uma distinção entre os feixes de fibras vizinhos semelhante.

Figura 4.4.4 - Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos organossolve em diferentes tempos obtidas por FESEM: (a-c) Organossolve 50 minutos, (d-f) Organossolve 150 min.

Fonte: Elaborada pela autora

Em algumas regiões das amostras tratadas, em especial quando tratamentos mais fortes são utilizados, o relevo de fibrilas de celulose torna-se mais nítido, como exemplificado na Figura 4.4.3 (I) para a amostra tratada com hidrotérmico 60 min combinado ao organossolve 150 min. Isso ocorre devido à remoção de camadas lignocelulósicas que recobrem as fibrilas, assim como de material dos seus interstícios. Alguns outros exemplos dessas regiões, obtidas em diferentes amostras são mostrados na Figura 4.4.5. As flechas indicam as regiões onde as fibrilas são nítidas.

Figura 4.4.5 - Imagens da superfície de amostras de bagaço após pré-tratamentos em diferentes condições experimentais obtidas por FESEM: (a) hidrotérmico por 30 min seguido de organossolve por 150 min, (b) hidrotérmico por 60 min seguido de organossolve por 50 min e (c) organossolve por 150 minutos. As imagens mostram fibrilas de celulose que foram expostas na superfície por efeito dos tratamentos e a flechas exemplificam regiões onde elas são mais nítidas.

Fonte: Elaborada pela autora

As diversas imagens obtidas por MEV apresentam muitas especulações de prováveis indícios da lignina, no entanto não comprovam necessariamente representar este componente. Para que isto seja possível, foi empregado a técnica de microscopia confocal de varredura, a qual permite a marcação da lignina, tendo-a como cromóforo emissor.

4. 5 Microscopia Confocal de Varredura

A microscopia confocal de varredura é uma técnica de fluorescência que apresenta um excelente contraste, além de permitir por meio da varredura uma análise local ponto a ponto. Em cada ponto da imagem pode-se medir tanto o espectro emitido quanto o decaimento temporal da fluorescência. Com isso é possível obter informação química do arranjo molecular em estudo. No caso da biomassa, o cromóforo emissor é a lignina que representa a fração de 30 % da parede celular vegetal do bagaço de cana-de-açúcar. Qualquer mudança do arranjo molecular da lignina, aglomeração ou concentração, pode ser facilmente caracterizado pela técnica. Estudo recente em nosso grupo mostrou que o espectro de emissão e o tempo de decaimento da lignina são profundamente modificados pelos processos de pré-tratamentos ácido-base. (118) Além disso, a técnica de excitação por dois fótons demonstrou ser essencial para a obtenção de informação de agregados de lignina. As mudanças espectrais foram utilizadas para mapear

alterações da estrutura da lignina dentro da biomassa por meio de métodos de análise de imagem e classificação espectral, que consiste no agrupamento dos espectros de mesma linha espectral. O objetivo desta seção é verificar as mudanças do arranjo da estrutura molecular da lignina e correlacionar sua concentração em função dos tratamentos empregados neste trabalho.

A Figura 4.5.1 (a) ilustra uma imagem de microscopia confocal no modo de intensidade para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* dando evidência da estrutura fibrilar deste material. O total de pixels (pontos) por imagem é de 1024 x 1024. A área de cada pixel está associada a resolução ótica da objetiva utilizada (20x) de resolução lateral de aproximadamente 300 nm. Nesta imagem procurou-se fazer o ajuste focal de maneira a se obter informação da superfície das fibras, pois este critério pode ser igualmente aplicado a todas as outras amostras estudadas. Imagens obtidas com maior profundidade focal tornam-se difíceis de serem analisadas individualmente em cada amostra. O mesmo arranjo experimental (objetiva, número de pixels, número de pontos por imagem, intensidade do laser, etc) foi fixado para todas as amostras. A excitação por dois fótons da lignina foi feita com laser pulsado (100 fs, com repetição de 80 MHz) em 800 nm e potência média de 15 mW. A Figura 4.5.1 (b) mostra um detalhe ampliado da estrutura fibrilar (4.5.1 a) bem como o perfil de intensidade ao longo da linha em vermelho. A estrutura da parede celular possui fibras com largura da ordem de 10 a 30 μm , sendo as variações da intensidade desta figura correspondentes a concentração de ligninas na parede nos pontos de máximo.

Figura 4.5.1 - (a) Imagem de microscopia confocal no modo de intensidade para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. (b) Detalhe ampliado da estrutura fibrilar o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Fonte: Elaborada pela autora

As análises de microscopia confocal de fibras de bagaço de cana *in natura* e pré-tratadas pelo processo hidrotérmico, organossolve e o combinado destes, serão apresentadas nas imagens que se seguem.

A figura 4.5.2 (A) representa as imagens de microscopia confocal para o pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C em diferentes tempos de reação, por 0 min (B), 30 min (C), 45 min (D) e 60 min e tendo como referência o bagaço de cana *in natura* (A). A coluna a esquerda da figura 4.5.1 representa as imagens no modo espectral. Nestas imagens cada pixel contém a informação de um espectro de emissão da lignina. A combinação de espectros em cada pixel gera cores na imagem que são fieis à região espectral que está sendo emitida, devendo isto ser levado em consideração nas análises. A coluna central mostra as mesmas imagens que foram processadas pelo método de classificação por espectro. Cinco classes espectrais foram selecionadas, cada uma delas foi associada a uma cor específica atribuída aos pixels correspondentes. Na coluna a direita são mostrados os espectros normalizados medidos entre 400 – 700 nm das referidas classes. No detalhe destes gráficos há o histograma que fornece a contribuição de cada classe no conjunto de espectros gerados pela imagem.

Figura 4.5.2 - Imagens de microscopia confocal para o pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C em diferentes tempos de reação (A) in natura; (B) 0 min (C) 30 min (D) 45 min (E) 60 min. O índice 1 em cada uma representa as imagens após a classificação por espectro e o índice 2 demonstra em cada amostra a distribuição espectral.

Fonte: Elaborada pela autora

A amostra não tratada, basicamente emite no azul entre 400 – 500 nm e pouca alteração espectral é observada (Figura 4.5.2 A e Figura 4.5.2 A2). Isto significa que o arranjo molecular e a composição química da lignina são praticamente o mesmo em todo o espaço amostral. Medidas em triplicata mostram o mesmo resultado. A mudança de cor na figura 4.5.2 (A1) reflete estas poucas alterações. O espectro em vermelho apresenta-se largo, porém com pouca contribuição amostral. A amostra tratada durante 0 min, ou seja, após o reator atingir esta temperatura a reação foi interrompida, Figura 4.5.2 (B), não apresenta

mudanças espectrais significativas em relação à amostra *in natura*. Já as amostras tratadas por 30 min (figura 4.5.2 C), 45 min (Figura 4.5.2 D) e 60 min (figura 4.5.2 E) apresentam mudanças significativas, bem como as alterações das contribuições de cada classe dadas pelos histogramas (coluna direta da figura 4.5.2). Basicamente as amostras passam a emitir na região entre o verde e o vermelho (500 – 700 nm). Emissões em baixa energia estão associadas a formação de complexos e agregados moleculares. Isto demonstra uma profunda desconstrução no arranjo estrutural da lignina na parede celular do vegetal, assim como foi observado em estudos recentes realizados em nosso Instituto envolvendo tratamento ácido.(81) Esta semelhança pode ser explicada devido a catálise ácida envolvida no processo hidrotérmico a altas temperaturas, ocorrida pela solubilização da hemicelulose por liberar ácido acético, que irá contribuir para a hidrólise na matriz lignina-carboidrato.

Estas imagens da Figura 4.5.2 estão relacionadas com a Figura 4.1.2 que apresenta a distribuição das frações de lignina solúvel e insolúvel nas biomassas antes e após o pré-tratamento hidrotérmico. Conforme a Tabela 4.1.1 o teor de lignina total na biomassa após o pré-tratamento empregado não alterou, entretanto, este pré-tratamento proporcionou redistribuição na fração de lignina solúvel e insolúvel que podem explicar a mudança espectral gerada nas imagens da Figura 4.5.2.

Pode-se observar nestas imagens que as mudanças espectrais se acentuam com o aumento do tempo de reação. No entanto, conforme também demonstrado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 4.4.3 d-e), as imagens por microscopia confocal das amostras para o tratamento hidrotérmico não apresentaram acúmulo de lignina na parede celular. Porém as imagens com classificação espectral de amostras com maior tempo de tratamento hidrotérmico apresentam com maior nitidez espectros de fluorescência de dois fótons com características de agregação molecular na região da parede (coloração alaranjada - avermelhada nos espectros das Figuras 4.5.2 C1 – E1).

A Figura 4.5.3 representa a imagem de um corte confocal após sofrer a classificação espectral de uma fibra isolada, decorrido o tratamento hidrotérmico por 30 min. É interessante notar as mudanças espectrais na região entre 500 – 700 nm que estão associadas a formação de agregados moleculares da lignina. Acreditamos que o tratamento hidrotérmico nestas condições estudadas não estão associados as

alterações químicas da molécula, como será visto mais adiante quando há a retiradas desses agregados nos processos organossolve, como por exemplo.

Figura 4.5.3 - Imagem de um corte confocal após sofrer a classificação espectral de uma fibra isolada, decorrido o tratamento hidrotérmico por 30 min a 160 °C

Fonte: Elaborada pela autora

Segundo Coletta e colaboradores,(118) agregados de lignina possuem tempos curtos de decaimento da fluorescência. Além disso, existe uma correlação linear entre tempos de decaimento e a concentração de lignina na parede celular, ou seja, o tempo de decaimento decresce com a fração de lignina na biomassa.

A figura 4.5.4 apresenta imagens de tempos de vida da fluorescência (FLIM – Fluorescence Life Time Image) equivalentes as imagens dispostas na figura 4.5.2, tanto as imagens espectrais quanto as imagens de FLIM foram realizadas simultaneamente para cada tratamento hidrotérmico. Cada pixel da imagem FLIM contém a informação local de um decaimento temporal da fluorescência na faixa de tempos acima de 100 ps. A cor na imagem representa um tempo de decaimento específico dado pela escala de cores em destaque em cada figura. A Figura 4.5.4 abaixo resume as principais mudanças no tempo de vida das imagens FLIM.

Figura 4.5.4 - Imagens de tempo de vida da fluorescência para o tratamento hidrotérmico a 0 (B), 30 (C), 45 (D) e 60 min (E) comparados com a amostra referência (A).

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 4.5.5 (A) compara as curvas de decaimento da fluorescência em gráficos semi-log para a amostra *in natura* e as amostras tratadas pelo processo hidrotérmico. Pode-se notar que as curvas de decaimento apresentam dois processos, um decaimento curto (τ_1) para tempos entre 0 – 2 ns e outro longo (τ_2)

para tempos acima de 2 ns para todas as amostras. No entanto, as diferenças nos decaimentos mostram que estes tempos estão sendo alterados com os tratamentos. Estas mudanças podem ser melhor acompanhadas na Figura 4.5.5 (B) que compara as distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM. A distribuição preenchida em cinza representa a amostra referência (*in natura*) e está deslocada para região de tempo de vida longos. O tratamento em 0 min apenas produz um estreitamento desta distribuição, podendo ser relacionado à melhor homogeneização das interações moleculares das ligninas na parede celular. Estas modificações poderão ser estudadas no futuro. As distribuições de tempo de vida médio se deslocam sem alterar a forma da área da distribuição na direção de tempos de vida menores com o aumento do tempo de tratamento hidrotérmico. De acordo com Coletta, (118) isto está associado com o aumento de agregados moleculares quanto maior a concentração de agregados, menor o tempo de vida devido a desconstrução do arranjo original de lignina. Conforme o trabalho de Coletta (118) o tratamento ácido com 1% de H_2SO_4 não retira a lignina, mas produz um rearranjo molecular, produzindo agregados de lignina que em sua maioria foram dissolvidos por outro tratamento sucessivo, como o tratamento básico, com a consequente retirada da lignina da parede celular. O processo hidrotérmico realizado neste trabalho, pode ser considerado equivalente ao tratamento ácido no estudo anterior. (118)

Figura 4.5.5 - Principais mudanças no tempo de vida das imagens FLIM

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 4.5.5 (C) mostra a dependência dos tempos de vida curto τ_1 e longo τ_2 calculados a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da Figura 4.4.5 (A). Ambos os tempos de decaimento diminuem linearmente com o aumento dos tempos de tratamento. Conforme a composição química do bagaço analisada no item 4.1, nestes tratamentos não houve variação significativa das concentrações de lignina na parede celular, o que indica que os deslocamentos observados estão associados à formação de agregados no arranjo de lignina. É natural que o tempo de vida decaia com a formação de agregados moleculares, devido a migração do estado excitado da molécula por processos de transferência de energia do tipo Foerster. (148) Quanto maior o estado agregado, maior é a migração do estado excitado e maior a probabilidade de encontrar um centro não emissor de luz, o que produz um decréscimo no tempo de vida de forma geral. Isto corrobora com o que vimos anteriormente no aparecimento de agregados nas amostras tratadas hidrotermicamente por longos tempos demonstrados no espectro da lignina excitado por dois fótons.

A comparação entre as imagens de microscopia confocal para as amostras tratadas a 190 °C com solvente orgânico (etanol 50%) pode ser observada na Figura 4.5.6. Novamente apresentamos as imagens espectrais (coluna esquerda), as mesmas em que foram feitas as classificações espectrais (coluna central), e as cinco classes espectrais mais representativas de cada imagem (coluna direita). As amostras A, B, C e D desta figura correspondem respectivamente ao bagaço *in natura* usado como referência, e as amostras tratadas por 50, 100 e 150 min. Nestas amostras é possível observar a ação combinada de desconstrução térmica (190 °C) e a solubilização e remoção da lignina de acordo com os dados de composição química (Tabela 4.1.1), o que devem refletir nas medidas espectrais e de tempo de vida.

Figura 4.5.6 - Imagens de microscopia confocal para as amostras tratadas com organossolve em diferentes tempos, 50 (B), 100 (C) e 150 min (D) em comparação com a amostra *in natura* (A). O índice 1 em cada uma representa as imagens após a classificação por espectro e o índice 2 demonstra em cada amostra a distribuição espectral.

Fonte: Elaborada pela autora

As amostras com o tempo de reação de 50 min apresentaram emissão com contribuição espectral predominante no azul para 3 das 5 medidas obtidas, tendo as restantes com predomínio de emissão no verde. Deste modo fica inconclusiva a

caracterização da desconstrução e/ou remoção da lignina para este tratamento específico. Porém, as amostras tratada durante 100 min apresentaram características de formação de agregados (desconstrução) devido a predominância de emissão na região do verde. Já as amostras tratadas por 150 min apresentaram emissão predominante no azul, o que pode indicar a dissolução dos agregados e extração da lignina pela ação do solvente. Diferentemente, as amostras com tratamento hidrotérmico por 60 min (4.5.2 D) apresentam somente a formação de agregados, ou seja, espectros de dois fótons com predominância de emissão no vermelho. Portanto, o retorno da emissão na região no azul neste tratamento organossolve por 150 min é uma evidência para a dissolução e extração da lignina na parede celular.

Figura 4.5.7 - Imagem de um corte confocal de fibras isoladas da amostra pré-tratada por organossolve por 100 min a 190 °C.

Fonte: Elaborada pela autora

A imagem de um corte confocal de fibras isoladas para amostras pré--tratadas organossolve por 100 min a 190 °C são mostradas na Figura 4.5.7. Interessante notar que o interior da parede apresenta características de emissão no azul, com pouca contribuição de agregados. Já na superfície da fibra a contribuição predominante é de agregado de lignina com forte contribuição no vermelho (espectro com linha vermelha). Isto indica que as modificações apresentadas na imagem do bagaço para um conjunto de fibras (Figura 4.5.6 C) corresponde ao acúmulo de lignina nas superfícies dessas fibras, pois optamos por obter imagens superficiais deste material. Porém, isto não descarta a possibilidade de um acúmulo de lignina no volume não medido desse bagaço.

As mudanças nos tempos de decaimento para as amostras tratadas com organossolve podem ser melhor acompanhadas na Figura 4.5.8, que compara as

distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM. A distribuição preenchida em cinza representa a amostra referência (*in natura*) e está deslocada para região de tempo de vida longos. É interessante observar que os tempos de decaimentos são menores para as amostras tratadas com organossolve quando comparado com o material *in natura*. Mas a seta na figura indicada corresponde a posição média da distribuição da amostra tratada hidrotermicamente durante 60 min. O deslocamento dos tempos de vida, principalmente para a amostra tratada por 150 min, indicam que os agregados de lignina foram reduzidos. De acordo com Coletta (118) é esperado um deslocamento espectral para tempos de decaimento mais longos quando a concentração de lignina na parede celular é reduzida, porém, uma concentração de $21,08 \pm 2 \%$, como apresentada na amostra submetida ao tratamento organossolve por 50 min, ainda não é suficiente para produzir esta correlação.

Figura 4.5.8 – Distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM. A distribuição preenchida em cinza representa a amostra referência (*in natura*) e está deslocada para região de tempo de vida longos.

Fonte: Elaborada pela autora

Os efeitos dos tratamentos combinados iniciados com hidrotérmico por 30 min seguidos pelo uso de solvente orgânico (etanol 50%) por 50, 100 e 150 min podem ser observados na Figura 4.5.9 itnes B, C e D respectivamente. A amostra não tratada (*in natura*) é apresentada na Figura 4.5.9 A para efeito de referência.

A amostra tratada a 50 min (Figura 4.5.9 B) apresenta forte acúmulo de lignina distribuído homogeneamente em toda a sua superfície. É interessante notar que nas amostras tratadas por organossolve em tempos iguais ou acima de 100 min, esta lignina acumulada foi em parte retirada e outra formou grandes aglomerados posicionados em pontos isolados da superfície. Estes agregados apresentam emissão com contribuição espectral expressiva no vermelho, conforma é mostrado nas imagens tratadas com classificação espectral (Figura 4.5.9 C1, D1) e nos seus respectivos espectros (Figura 4.5.9 C2, D2).

A análise de composição química para estas amostras comprovou a retirada de partes da fração de lignina, restando apenas 10,89 % para amostradas tratadas pelo processo hidrotérmico 30 min combinado com organossolve 150 min dos 29,17 % iniciais presentes nas amostras *in natura*. Esta pequena fração ainda restante após o tratamento pode estar presente na formação de aglomerados esféricos, demonstrados pelas pontuações vermelhas nas imagens. É possível ainda notar pelas imagens que não há acúmulo de lignina mensurável entre fibras.

Figura 4.5.9 - Imagens de microscopia confocal dos efeitos dos tratamentos combinados iniciados com hidrotérmico por 30 min seguidos por organossolve por 50 min (B), 100 min (C) e 150 min (D) em comparação com a *in natura* (A). O índice 1 em cada uma representa as imagens após a classificação por espectro e o índice 2 demonstra em cada amostra a distribuição espectral.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4.5.10 - Imagem espectral (A) e imagem FLIM correspondente (B) da amostra pré-tratada com hidrotérmico por 30 min seguido de organossolve por 150 min. (C) Distribuições normalizadas de tempo de vida médios calculados para cada pixel da imagem FLIM para todas as amostras de tratadas hidrotermicamente por 30 min combinado com organossolve a 50, 100 e 150 min. A distribuição preenchida em cinza representa a amostra referência (*in natura*) e está deslocada para região de tempo de vida longos.

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 4.5.10 ilustra os efeitos das aglomerações e do tratamento hidrotérmico por 30 min combinado com organossolve a 50, 100 e 150 min. As Figuras 4.5.10 A e B representam respectivamente imagens espectral e FLIM do bagaço tratado por 150 min no solvente orgânico após o tratamento hidrotérmico por 30 min. A emissão predominante no azul (Figura 4.5.10 A) é marcante, o que indica a retirada parcial da lignina da superfície, enquanto que os pontos em vermelho representam os agregados de lignina restantes. Já a imagem FLIM, apresenta tempos de vida longos distribuídos homogeneamente por toda a superfície.

Os pontos com aglomeração de lignina nesta imagem (Figura 4.5.10 item B) apresentam coloração em azul, que representam tempo de vida curto, o que é esperado para todo agregado molecular. O efeito da dissolução dos aglomerados e da retirada de lignina pode ser observado no fato das distribuições estarem próximas da amostra de referência (Figura 4.5.10 C), representada pela distribuição preenchida em cinza.

O processo de tratamento hidrotérmico por 60 min seguido por organossolve a 190 °C por 50, 100 e 150 min pode ser acompanhado na Figura 4.5.11. Existe uma grande tendência de retirada de lignina da superfície do bagaço para as amostras preparadas por 50 e 100 min, devido a forte contribuição de emissão no azul. Já a amostra tratada por 150 min apresenta lignina distribuída pela superfície com forte tendência a formar grandes aglomerados de lignina. Este resultado sugere que a desconstrução da lignina através da formação de agregados dentro da parede celular por meio de tratamentos hidrotérmicos longos pode desfavorecer a dissolução posterior desses agregados pelo solvente orgânico. Deste modo, pode existir um compromisso entre tempo do tratamento hidrotérmico e ação do solvente na dissolução e retirada dos agregados. Estas hipóteses poderão ser tema de investigação futura.

As Figuras 4.4.2 e 4.4.3 de MEV e a Figura 4.1.2 vistas em comparação principalmente com as imagens da Figura 4.5.9 itens C e D e da Figura 4.5.11 nos mesmos itens confirmam as especulações das imagens de MEV e a compreensão do aumento de lignina insolúvel e sua remoção nos tratamentos organossolve, de maneira geral acima de 100 min. Através do uso da microscopia confocal é possível confirmar que as imagens de MEV nestas Figuras acima citadas, realmente demonstravam a disposição da lignina na parede celular vegetal, aglomerando na forma de gotas, como descrito, e muitas vezes sendo parte delas removidas com o uso de solvente orgânico, o que foi comprovado pela Figura 4.1.2, pela Tabela 4.1.3 e pelas imagens espectrais de microscopia confocal. A condensação vista, pode ser explicada como uma reação que os componentes hidrolisados da lignina podem sofrer entre si ou com outros componentes químicos. Ela pode levar a formação de compostos de elevado peso molecular e reverter a hidrólise e solubilização da lignina. Com o intuito de verificar se estes aspectos estudados contribuíram para o acesso enzimático ao substrato, celulose, a hidrólise enzimática foi quantificada neste trabalho.

Figura 4.5.11 - Imagens de microscopia confocal dos efeitos dos tratamentos combinados iniciados com hidrotérmico por 60 min seguidos por organossolve por 50 min (B), 100 min (C) e 150 min (D) em comparação com a *in natura* (A).

Fonte: Elaborada pela autora

4. 6 Hidrólise enzimática

A eficácia de um pré-tratamento é relatada, frequentemente, em termos de rendimento glicosídico, não se restringindo apenas à composição química e características físicas da biomassa tratada. Assim, para verificação das melhores condições de pré-tratamento, foram realizadas hidrólises enzimáticas com as amostras após cada pré-tratamento e a *in natura*, como referência. O rendimento da hidrólise foi calculado com base na porcentagem de celulose presente em cada amostra (Tabela 4.1.1). Seguidamente ainda foram feitos cálculos de conversão total da celulose, considerando as perdas que cada tratamento acarretou (Tabela 4.6.1).

Figura 4.6.1 - Eficiência de hidrólise enzimática nas amostras pré-tratadas após 12, 24, 48 e 72 h de hidrólise, expressa como o rendimento da hidrólise parcial, por conversão da celulose presente em cada amostra em glicose.

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme a Figura 4.6.1 demonstra, a conversão do bagaço *in natura* em glicose é baixa. Isto ocorre devido à recalcitrância do material e o difícil acesso enzimático ao substrato, celulose, envolto na matriz com hemicelulose e lignina. Portanto, o bagaço de cana submetido a um processo de solubilização da lignina tende a apresentar um maior valor de conversão dos polissacarídeos a açúcares fermentescíveis. Isto pôde ser confirmado principalmente nos tratamentos envolvendo solvente orgânico acima de 100 min de reação a 190 °C (Figura 4.6.1) que, conforme os itens 4.1 e 4.3 apresentaram remoção deste componente, elevando significativamente o rendimento de hidrólise enzimática de 21% do bagaço *in natura* para 75% no tratamento combinado hidrotérmico 60 min seguido de organossolve por 150 min. Os resultados para o pré-tratamento combinado hidrotérmico 30 min seguido de organossolve 150 min também foram expressivos dentre as amostras estudadas, proporcionando um rendimento de 72%.

Todavia para verificação do rendimento do processo global para a produção de etanol, é imprescindível o cálculo de conversão total da celulose.

Tabela 4.6.1 – Resultados de eficiência de hidrólise e conversão total de celulose após 72 h

Pré-tratamentos	Hidrólise enzimática (72 h)	
	Eficiência de hidrólise (%)	Conversão total de celulose (%)
<i>In natura</i>	22,0 ± 0,2	22,0 ± 0,2
Hidrotérmico 0 min	32,8 ± 0,4	32,3 ± 0,3
Hidrotérmico 30 min	37,9 ± 4,0	35,9 ± 0,1
Hidrotérmico 45 min	43,0 ± 5,0	41,0 ± 3,0
Hidrotérmico 60 min	37,5 ± 0,6	37,5 ± 0,4
Organossolve 50 min	51,0 ± 16,0	51,0 ± 11,0
Organossolve 100 min	63,0 ± 6,0	63,0 ± 5,0
Organossolve 150 min	69,0 ± 5,0	69,0 ± 3,0
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 50 min	48,0 ± 7,0	48,0 ± 5,0
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 100 min	76,8 ± 12,0	70,0 ± 8,0
Hidrotérmico 30 min + Organossolve 150 min	72,0 ± 5,0	69,1 ± 0,1
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 50 min	47,0 ± 4,0	38,2 ± 2,0
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 100 min	74,0 ± 7,0	54,7 ± 0,1
Hidrotérmico 60 min + Organossolve 150 min	75,0 ± 8,0	60,0 ± 5,0

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme a Tabela 4.6.1 os tratamentos combinados hidrotérmico seguido por organossolve a 100 e 150 min apresentaram os melhores valores de rendimento de hidrólise enzimática. No entanto, esses tratamentos geram muita perda de massa, comprometendo a conversão total da celulose e consequentemente o rendimento global do processo na produção do etanol de segunda geração. Considerando isto e os valores encontrados na eficiência de hidrólise para o tratamento organossolve, que desprende de menor custo e acarreta numa economia da etapa energética destinada ao hidrotérmico, o uso somente do solvente orgânico deve ser considerado, principalmente no tempo igual e acima de 100 min.

5 CONCLUSÕES

O bagaço submetido ao processo hidrotérmico a 160 °C nos diferentes tempos apresentados demonstraram um aumento da conversão enzimática, mesmo não ocorrendo a remoção da lignina conforme as análises de RMN e a Tabela 4.1.1 de composição química. Todavia, a Figura 4.1.2 demonstrou alterações na distribuição das frações solúveis e insolúveis da lignina, sendo este fato melhor estudado pelas análises físicas, através da técnica de MEV e microscopia confocal, que demonstraram uma modificação estrutural, como um rearranjo da lignina, o que podem ter favorecido no processo de hidrólise. Portanto, estas análises permitiram observar diferenças morfológicas entre amostras tratadas em diferentes condições e correlacionar essas diferenças com o teor de açúcares liberados na hidrólise enzimática (eficiência de hidrólise) dessas amostras, mesmo não alterando o teor de lignina total presente nas biomassas.

Os pré-tratamentos com o uso do solvente orgânico (etanol 50%) mostraram-se efetivos em melhorar a acessibilidade da enzima durante a etapa de hidrólise. As análises físicas aplicadas proporcionaram um melhor entendimento da ação destes tratamentos estudados. Isto pôde ser confirmado nos tratamentos organossolve acima de 100 min, isolados ou combinados, que associados aos respectivos valores de composição química e aos resultados de RMN apresentaram remoção da lignina e uma conversão da celulose à glicose mais eficiente.

Os tratamentos combinados por hidrotérmico (30 e 60 min) seguidos de organossolve por 150 min estudados neste trabalho apresentaram morfologias muito semelhantes, o que é condizente com o fato de essas amostras apresentarem resultados de eficiência de hidrólise próximos, $71,9 \pm 4,60\%$ e $75,27 \pm 8,01\%$, respectivamente. Ainda, estes tratamentos demonstraram ação na remoção da lignina da parede celular do vegetal, diminuindo a concentração desta de 16,13 – 18,28% como determinado pela composição química através do processo de caracterização via hidrólise ácida concentrada (item 3.5) e confirmada por análise de RMN. No entanto, devido a alta perda de massa no processo combinado, o uso somente do tratamento organossolve acima de 100 min de reação mostra ser uma boa alternativa de tratamento, pois estes também demonstraram semelhança morfológica com os combinados, remoção de lignina e eficiência de hidrólise de 63,52 % para o organossolve por 100 min e 69,06 % para este tratamento por 150

mim. Entretanto, a conversão total de celulose no uso do tratamento organossolve por 100 e 150 min foi 34,96 % e 36,78 % respectivamente, valores próximos ao encontrado pelo uso combinado de hidrotérmico 30 min e 60 min seguidos por organossolve 150 min (36,84 e 37,01 %), com a vantagem de não se aplicar uma etapa anterior.

Em suma, por intermédio das técnicas físicas aplicadas, foi possível caracterizar as influências dos pré-tratamentos estudados no bagaço de cana-de-açúcar, podendo estender a compreensão dos fenômenos vistos a outros pré-tratamentos que basicamente atuam de maneira similar. Especificamente a microscopia confocal de varredura foi de grande valia para melhor relatar as especulações feitas nas análises de microscopia eletrônica de varredura, em relação a disposição da lignina na biomassa, possibilitando assim ampliar o conhecimento das alterações morfológicas provocadas pelo efeito do pré-tratamento na parede celular vegetal.

REFERÊNCIAS

- 1 MIRZA, U. K.; AHMAD, N.; MAJEED, T. An overview of biomass energy utilization in Pakistan. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 7, p. 1988-96, 2008.
- 2 RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 454p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- 3 PEREIRA JUNIOR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA L. M. M.. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 47p. (Series in Biotechnology, v.2).
- 4 BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n.25, p.5-38, mar.2007.
- 5 LYND, L. R.; ELANDER, R.T.; WYMAN, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.58-59, p. 741 - 761, 1996.
- 6 KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v. 06, n. 1263, p. 147-150, 2004.
- 7 HAFRÉN, J.; OOSTERVELD-HUT, H. M. J. Fluorescence lifetime imaging microscopy study of wood fibers. **Journal of wood science**, v.55, n.3, p. 236-239, 2009.
- 8 SPERANZA, M. et al. Sterols and lignin in Eucalyptus globulus Labill. wood: spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses. **Holzforschung**, v. 63, n. 3, p. 362-370, 2009.
- 9 CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n.3, p. 973-984, 2011.
- 10 REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 54p., 2011.
- 11 MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; MACHADO DE CASTRO, A.; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JR., N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1196 – 1201, 2011.
- 12 MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R. Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- 13 MAZIERO, P.; DE OLIVEIRA NETO, M.; MACHADO, D., BATISTA, T.; CAVALHEIRO, C.C.S.; NEUMANN, M.G.; CRAIEVICH, A.F.; ROCHA, G.J.M.; POLIKARPOV, I.; GONÇALVES, A.R. Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p.61– 69, 2012.
- 14 CANA-DE-AÇÚCAR: a gramínea gigante. Disponível em: <<http://wol.jw.org/pt/wol/d/r5/lp-t/102000570>> Acesso em: 07 jan 2014.
- 15 SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA JUNIOR., N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogos e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. v.2, n. 6, p.23, 2008.

- 16 PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**: an introduction to their industrial utilization. 3th ed. Amsterdam : Elsevier, 1989. 435p.
- 17 TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E. **Atlas del bagazo de la caña de azúcar**. México : Geplacea,. 1990. 143p
- 18 SÃO PAULO (Estado). Lei nº 11.241 de 19 de setembro de 2002. **Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima de palha de cana-de-açúcar e dá providências**.. Disponível em <http://www.imprensaoficial.com.br/PortalIO/DO/GatewayPDF.aspx?link=/2003/executivo%20secao%20i/marco/12/pag_0003_6LR4439NT32MCeFVQCSGP2O42BL.pdf>. Acesso em: 25 de jan 2014.
- 19 CERRI, C. Mudança de estoque de carbono no solo. In: WORKSHOP ON THE IMPACT OF NEW TECHNOLOGIES ON THE SUSTENTABILITY OF THE SUGARCANE, 2, 2009, Campinas. **Anais**, Campinas: CTBE, 2009.
- 20 TRIANA, C. A. R. Energetics of Brazilian ethanol: Comparison between assessment approaches. **Energy Policy**, v. 39, n. 8, p. 4605-4613, 2011.
- 21 FAOSTATS - **Food and agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 10 ago. 2012.
- 22 BRASIL. Ministerio de Minas e Energia. **Balanço energético nacional. ano base 2012**. Brasília: 2013.
- 23 UNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar. Acompanhamento quinzenal, posição até 16/12/2013. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=88>>. Acesso em: 14 jan. 2014.
- 24 CHANDEL, A. K.; CHAN, E. S.; RUSDRAVARAM, R.; NARASU, M. .L.; RAO, L. V.; RAVINDRA, P. A.K. Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, p. 14-32, 2007
- 25 GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v.178, n.3, p. 473-485, 2008.
- 26 MUSSATTO, S.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA., J. P .A.; CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- 27 ZANIN, G. M.; SANTANA, C .C.; BOM, E. .P. S.; GIORDANO, R. C. L.; MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; CARVALHO NETO, C. .C.; MACEDO, I.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian Bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.
- 28 NOVO , L. P.; GURGEL, L. V. A.; MARABEZEI, K.; CURVELO, A. A. S. Deslignification of sugarcane bagasse using glycerol-water mixtures to produce pulps for saccharification. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p.1040 – 1046, 2011.
- 29 TECHNOLOGY REVIEW. **Redesigning life to make ethanol**. Technology Review – an MIT Enterprise. Massachusetts, USA, jul. 2006. Disponível em: <http://www.technologyreview.com./printer_friendly_article.aspx?id=17052>. Acesso em: 22 nov. 2011.
- 30 EMERICK, R.P. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

- 31 ANEEL. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 2008. Disponível em: < <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/Atlas/download.htm> >. Acesso em: 20 maio 2013.
- 32 SINGHANIA R.R.; SUKUMARAN R.K; PATEL A.K; LARROCHE C; PANDEY A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46,n. 7, p. 541-549,2010.
- 33 RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.
- 34 SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARE-LO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820 - 4835, 2010
- 35 GEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Campinas: Nipe/UNICAMP, 2009. 536p.
- 36 INOVAÇÃO UNICAMP. Brasil tem vantagens tecnológicas em etanol, mas está em vias de perdê-la, diz Prêmio Nobel. Presidente da Embrapa concorda. 2005. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/report/news-IIIconferencia2.shtml>>. Acesso em: 20 nov 2011
- 37 FANGEL, J.U.; ULVSKOV, P.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, M. D.; HARHOLT, J.; POPPER, Z. A.; WILLATS, W. G. Cell wall evolution and diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n.152, p. 1-8, 2012
- 38 RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. 6. ed. New York: Worth Publications, 2001. 791 p.
- 39 POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 286 - 292, 2008.
- 40 TAIZ, L. ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In:_____. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339 - 364.
- 41 MURPHI, J.D.; MCCARTHI, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as transport fuel in Irland. **Applied Energy**, v. 82, n. 2, p. 148-166, 2009.
- 42 SUN, J.X.; SUNA, X.F.; ZHAOA, H.; SUNB, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**. v. 84, n.2, p. 331-339, 2004.
- 43 Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie – International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358 – 3393, 2005.
- 44 Gurgel, L.V.A. **Meceração e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II)**. 2007. 180p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.
- 45 HAMELINCK, C. N. et al. Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.
- 46 QUIROZ-CASTAÑEDA, R. S.; FOLCH- MALLO, J. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, A. K., SILVA, S.S. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization**. Croatia: InTech, 2013. cap. 6, p.284.

- 47 LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n.5, p. 777-793, 1999.
- 48 SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: **Springer-Verlag**, 1999.
- 49 PEREIRA JUNIOR, N. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química. In: ENCONTRO ANUAL DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 11, 2006. São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2006.
- 50 BIOENERGY Research Centers, an overview of the science: U.S.A: Department of Energy, 2008.
- 51 CURVELO, A. A. D. S. **Processo de deslignificação organossolve**. 1992. 94 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.
- 52 EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and wood biotechnology**. Berlin: W. de Gruyter, 2009. 308 p.
- 53 US DEPARTMENT OF ENERGY. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. Office of Transportation Technologies. **Advanced bioethanol technology**. 2008. Disponível em: <<http://www.ott.doe.gov/biofuels>>. Acesso em 25 nov. 2013.
- 54 BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- 55 RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, 2003, p. 863-871.
- 56 FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter & Co, 1989. 613p.
- 57 KLASS, D. L. **Biomass for renewable energy, fuels and chemical**. San Diego: Academic Press, 1998. 650p.
- 58 BALAT M., BALAT H.; CAHIDE O. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34 p. 551–573, 2008.
- 59 ROSA, S. S. da; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 119-150, 2009.
- 60 HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology Chemical Technology**, v. 10, n.5, p. 315 - 319, 1980.
- 61 TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduce inhibition of enzymatic hydrolysis of steam – pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 835-844, 2001.
- 62 SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Índia, p.19-27, 2012.
- 63 TIAN, M. et al. A novel approach for lignin modification and degradation. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 4, p. 527-530, 2010.
- 64 BRODEUR, G. et al. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, Tallahassee, p.1-17, 2011.
- 65 HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Solvents applied in the field of cellulose chemistry: a mini review. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 15. n.2, p. 84-90, 2005.

- 66 ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, n.5, p.815–827, 2009.
- 67 GARCÍA-CUBERO, M. A. et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1608-13, 2009.
- 68 LAUREANO-PÉREZ, L.; TEYMOURI, F.;ALIZADEH, H.;DALE, B.E.. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 121, p. 1081–1099, 2005.
- 69 SCHACHT, C.; ZETZL, C.;BRUNNER, G. From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical. Fluids**. v.46, n.3, p.299–321, 2008
- 70 SANTOS, A. L. F., KAWASE, FAUSTA K. Y., COELHO, G. V. Enzymatic Saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Rio de Janeiro, p.277-282, 2011.
- 71 PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, Curitiba, p.1-8, 2012.
- 72 BERNARDO NETO, O. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2º geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1ºgeração)**. 2009. 137p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 73 ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ E.; BALLESTEROS M.; NEGRO M.J..Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4851-461, 2010.
- 74 SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**. v. 83, p.1–11, 2002.
- 75 ZHU J.Y;PAN X.J;WANG G.S; GLEISNER R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**. v.100, p. 2411–2418, 2009.
- 76 ZHU W, ZHU J.Y, GLEISNER R, PAN X.J. On energy consumption for size-reduction and yield from subsequent enzymatic sacchrification of pretreated lodgepole pine. **Bioresource Technology**,v 101, n.8, p. 2782-2792, 2010.
- 77 YANG B., WYMAN E.C. Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol, **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2 1, p. 26 – 40, 2007.
- 78 LEVAN, S.L., ROSS, R.J., WINANDY, J.E. **Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures**. Madison, U.S Department of agriculture, Forest service, Forest Products Laboratory,1990. 24p. Research Paper FPL-RP- 498.
- 79 WINANDY, J.E., **Effects of fire retardant treatments after 19 months of exposure at 150F (66C)**. Madison, U.S. Department of agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory,1995, 13p. Res. Note FPL-RN-0264.
- 80 ALLEN. S.; KAM, L. C.; ZEMANN, A. J.; ANTAL, M. J. Fractionation of sugar cane with hot compressed liquid water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.35, p. 2709 - 2715, 1996.
- 81 MCDONOUGH, T. J. The chemistry of organosolv delignification. **TAPPI Journal**, v. 76, n. 8, p. 186 - 193, 1993.
- 82 SARKANEN, K. V. Chemistry of solvent pulping. **TAPPI Journal**, v. 65, n. 3, p. 215-222-, 1990.

- 83 MONTANARI, S. **Processos de deslignificação organossolve: efeito da concentração de catalisador e do tempo de reação; utilização de ligninas na preparação de uretanais e poliuretanas**. 1994. 169f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.
- 84 NIMZ, H. H. Lignin-based wood adhesives, em wood adhesives: chemistry and technology. New York: **Marcel Dekker**, 1983. cap. 5; p. 247-288.
- 85 PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53–63, 2005
- 86 NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADLER, J. N. The influence of lignin on the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass substrate. In: ZHU, J.Y.; ZHANG, X.; PAN, X.J. **Sustainable production of fuels, chemicals, and fibers from forest biomass**. New York: American Chemical Society, 2011. v 1067, cap. 6, p.145-167.
- 87 NEILSON, M.J. et al. Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, n.2, p. 609-612, 1988.
- 88 ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 2, p.51-68, 2009.
- 89 BENAR, P. **Polpação acetosolv de bagaço de cana e madeira de eucalipto**. 1992. 71p. Dissertação – (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1992.
- 90 ZHANG, Y. H.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n.5, p. 367 - 375, 2008.
- 91 WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n.18, p. 1959-1966, 2005.
- 92 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, pt 2, p. 309-16, 1991.
- 93 MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-92, 1994.
- 94 BIRSAN, C. et al. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, n. 2, p. 156-60, 1998.
- 95 WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 325-337, 2001.
- 96 QUINTERO-RAMIREZ, R. Hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: CORTEZ, L. A. B. **Sugarcane bioethanol – R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher, 2008. cap. 13, p. 717-732.
- 97 KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Journal of Biochemistry**, v. 29, n. 47, p. 10577-10585, 1990.
- 98 OBEROI, H. S.; CHAVAN, Y.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as major substrate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4 p.528-536, 2008.
- 99 PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. 2004. 80p. Ph.D. Thesis - Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, 2004.

- 100 MIETTINEN-OINONEN, A. ***Trichoderma reesei* strains for production of celulasas for the textile industry**. 2004. 96 p. Ph.D. Thesis - Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004.
- 101 ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.
- 102 TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 1997.
- 103 GILKES, N. R.; HENRISSAT, D. G.; KILBURN, R. C. MILLER, JR.; WARREN, J. A. Domains in microbial beta-1,4 glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 2, p. 303-15, 1991.
- 104 PEREZ-PONS, J.A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Induction and preliminary characterization of intracellular β -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 148, n.3, p. 235-239, 1995.
- 105 BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620. 1997. doi: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2
- 106 CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n.14, p. 1291-1296, 2002.
- 107 LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, WH; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n.3, p. 506-77, 2002.
- 108 HOWARD, R.L.; et. al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion e enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. v.2 , n.12, p. 602-619, 2003.
- 109 SERPA, V.I; POLIKARPOV, I.: Enzymes in Bioenergy. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. H. **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011. cap 7, p. 97-113.
- 110 BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- 111 RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAICON, C.; KYU, K. L.; SAKKA, K.; KOSUGI, A.; MORI, Y. Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: a novel system for biomass utilization. In: MATOVIC, M. D. **Biomass now: cultivation and utilization**. Croatia: InTech, 2013. cap.16, p.460.
- 112 GENENCOR, A DANISCO DIVISION. **Accellerase 1500**,: cellulase enzyme complex for lignocellulosic biomass hydrolysis Disponível em <http://accellerase.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/accellerase/documents/DUP-00413_ProdSheet_1500_web.pdf> Acesso em: 22 jan. 2015
- 113 ATKINS, P.W.; DE PAULA, J. **Físico-química** (tradução). Rio de Janeiro, RJ:LTC Editora S.A, 2002.
- 114 RAMOS, R.A. **Correlação entre propriedades físico-químicas de celuloses e sua solubilização e derivatização em LiCl/DMAc e DMSO/TBAF.3H₂O**. 2005. 236p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2005.
- 115 HIMMEL M.E.; DING, S.Y.; JONHSON, D. K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass reclacitrance: engineering plants and enzyme for biofuels production. **Science**, v.315, n. 5813, p.804 - 807, 2007.

- 116 BERNADELLI, O. D. **Estudo espectroscópico da dinâmica molecular e empacotamento em semicondutores orgânicos**. 2011, 150 p. Dissertação (Mestrado Física) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 117 RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e gl**. 2010. 262p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010
- 118 COLETTA, V. C.; REZENDE, C. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; POLIKARPOV, I.; GUIMARÃES, F. E. G. Mapping the lignina distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. **Biotechnology for Biofuels**. v. 6, n. 43, p.1-10, 2013.
- 119 ALBINSSON, B. The origin of lignin fluorescence. **Journal of Molecular Structure**, v. 508, n. 1-3, p. 19-27, 1999
- 120 SARKANEN, S.; TELLER, D.; STEVENS, C.R.; MCCARTHY, J.L. Lignin. 20. Associative interactions between kraft lignin components. **Macromolecules**, v. 17, n. 14, p. 2588-2597, 1984.
- 121 WESTBYE, P. et al. The influence of lignin on the self-assembly behavior of xylan rich fractions from birch (*Betula pendula*). **Cellulose**, v. 14, n. 6, p. 603-613, 2007.
- 122 COLETTA, V.C. **Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de microscopia óptica de alta resolução**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 123 INOUE, S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: PAWLEY, J.P. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer, 2006. p. 1-19.
- 124 ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; WEBB, W.W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the bioscience. **Nature Biotechnology**, v.21, n. 11, p. 1369-1377, 2003.
- 125 BODDEKE, F.R. et al. Fluorescence lifetime determination for application in microscopy. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PATTERN RECOGNITION (ICPR'96), 13,1996. Austria. **Proceedings...** Austra,1996.v.3, p.854.
- 126 TETARD L., PASSIAN A., FARAH H.R., KALLURI U.C., DAVISON B.H., THUNDAT T. Spectroscopy and atomic force microscopy of biomass, **Ultramicroscopy**, v. 110, n.6, p. 701-707, 2010.
- 127 REZENDE, C.A. **Auto-organização de nanopartículas utilizando padrões formados por transição de molhabilidade**. 2007. 236 p. Tese. (Doutorado em Química). Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- 128 THORNTON, P. R. **Scanning electron microscopy**. London: Chapman & Hall, 1968.
- 129 LAWES, G. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. New York: John Wiley & Sons,1987. 102 p.
- 130 TANIMOTO T.S. **Utilização da engenharia interfacial para preparação de superfícies nano-estruturadas de Au pela aproximação bottom up**, Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 131 HOUGHTON, T. P., STEVENS, D.M., PRYFOGLE, P. A., WRITGH, C. T., RADTKE, C. W. The effect of drying temperature on the composition of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 4-10, 2009. doi:10.1007/s12010-008-8406-x
- 132 ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON

THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1997, Curitiba. **Anais...**, Curitiba: UFPR, 1997. v.5.

133 GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p.1-4, 2009.

134 SHIMADZU. High-Speed Analysis of Furfural. Disponível em <http://www2.shimadzu.com/applications/lc/22_Furfural_UFLC_appn_datasheetNo22.pdf> Acesso em 10 jan 2014.

135 KAAR, W.E.; BRINK, D. L. Summative analysis of nine common. North American woods. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v.11, p. 479 - 494, 1991. doi: 10.1080/02773819108051088

136 TEMPLETON, D. W.; SCARLATA, C.J.;SLUITER, J.B.; WOLFRUM, E. J. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2 method uncertainties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.16, p. 9054-9062., 2010.

137 WICKHOLM, K.; LARSSON, P. T.; IVERSEN, T. Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 312, p. 123-129, 1998. doi: 10.1016/S0008-6215(98)00236-5

138 HAMURI, B. O. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

139 HALLAC, B. B.; SANNIGRAHI, P.; PU,Y.; RAY, M.; MURPHY, R. J.; RAGAUSKAS, A. J. Biomass characterization of Buddleja davidii: a potential feedstock for biofuel production **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n.4, p.1275-1281, 2009.

140 HU, Z.; FOSTON, M. B.; RAGAUSKAS, A. J. Biomass characterization of morphological portions of alamo switchgrass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.14, p. 7765-7772, 2011.

141 SANNIGRAHI, P.; MILLER, S. J.; RAGAUSKAS, A. J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. **Carbohydrate Research**.v. 345, n. 7, p. 965-970, 2010.

142 KARTAL, S.P.; HWANG, W.; IMAMURA, Y. Water absorption of boron-treated and heat-modified wood. **Journal Wood Science**, v. 53, p. 454 - 457, 2007. doi: 10.1007/s10086-007-0877-9

143 LIMA, M. A.; GOMEZ, L. D.; STEELE-KING C. G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O. D.; M. A. CARVALHO, REZENDE C. A.; LABATE, C. A; DEAZEVEDO, E. R.; MCQUEEN-MASON S. J.; POLIKARPOV, I. Evaluating the potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production . **Biotechnology for Biofuels**, v.7, n.10, p. 1-19, 2014.

144 HEISS-BLANQUET, S.; ZHENG, D.; FERREIRA, N. L.; LAPIERRE, C.; BAUMBERGER, S. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5938-5946, 2011.

145 SELIG, M. J.; VIAMAJALA, S.; DECKER, S.R.; TUCKER, M. P. HIMMEL, M. E.; VINZANT, T. B. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333-1339, 2007.

146 DONOHOE, B. S.; DECKER, S.R.; TUCKER, M.P.; HIMMEL, M. E.; VINZANT, T. B. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913-925, 2008.

147 KOO, B.-W.; MIN, B.; GWAK, K.; LEE, S.; CHOI, J.; YEO, H.; CHOI, I. Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 24-32, 2012. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.03.012

148 FOERSTER, T. H. 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation. **Discussion of the Faraday Society**. v. 27, p. 7-17, 1959. doi: 10.1039/DF9592700007.