UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LEIDY PATRICIA QUINTERO MORA

**Tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar e seu efeito
na extração de xilana e na sacarificação da celulose residual**

Lorena

2018

LEIDY PATRICIA QUINTERO MORA

Tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar e seu efeito na extração de xilana e na sacarificação da celulose residual

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Maria Ferreira Milagres

Versão Corrigida

Lorena

2018

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

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

Quintero Mora, Leidy Patricia

Tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar e seu efeito na extração de xilana e na sacarificação da celulose residual / Leidy Patricia Quintero Mora; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres - Versão Corrigida. - Lorena, 2018. 91 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Tratamento sequencial. 3. Xilana. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira, orient.

Quiero dedicar este trabajo a Elisa Fernanda Quintero Rodriguez, eres y serás mi inspiración, tu mirada serena y sonrisa cálida fueron mi motivación durante estos años, Te amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria, inteligência e conhecimento concedido para lograr esta conquista.

A meu esposo Josman Velasco, pelo seu infinito amor, motivação, paciência e compreensão.

A minha família, especialmente meus pais Luis Emiro Quintero e Betsabe Mora por sempre acreditar em mim e apoiar minhas decisões, a meu irmão e cunhada, Luis e Alejandra, por torcer por este sonho e a meus sogros Benjamin Velasco e Helena Mendoza pelas suas orações.

A família Martins, Gloria, Sergio, Stefan e Tamires, vocês são os nossos anjos neste país, infinitas graças!

A minha orientadora, Prof^a. Adriane, pela sua disposição desde o início, dedicação, confiança e sua orientação para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Juliana, Matheus, Elizabeth, Fernando, Gabi, Stephanie, Thiago muito obrigada pelas aulas de português.

Ao time mais lindo, fofo e guerreiro da USP, Clara, Tamada, Renata, Dimôna, Giovana, Maju, Marcela, Erika, Ingrid e Lisa porque com Basquete todo é melhor.

Aos amigos de Laboratório Felipe, Maiara, Barbara, Aline, Yvi, Verônica, Aline, Bianca, Bruno, Gislene, Awana, pela amizade, pelos momentos de alegria e apoio nos momentos difíceis.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia Industrial que fizeram parte de minha formação e ao técnicos Djalma, José Cobrinha e José Moreira, pela ajuda e disposição.

A CAPES pela bolsa fornecida.

RESUMO

QUINTERO MORA, L. P. Tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar e seu efeito na extração de xilana e na sacarificação da celulose residual. 2018. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP.

A biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, tem potencial para ser usado como matéria-prima na fabricação de produtos de valor agregado, uma vez que, seus componentes estruturais podem ser separados através de pré-tratamentos e utilizados em linhas de processos. Diferentes tipos de pré-tratamentos tem sido desenvolvidos com este objetivo, e neste contexto, foi proposto um tratamento sequencial químico-enzimático (SQE) do bagaço de cana-de-açúcar com três estágios; 1) Extração alcalina a frio (CAE): realizado com 10% (m/m) de NaOH por 30 min a 25°C, 2) Pré-tratamento sulfito alcalino em etanol (ASE): realizado com 2,5% (m/m) de NaOH e 5% (m/m) de Na₂SO₃ em etanol (30 %v/v), por 2 h a 120°C e 3) Extração enzimática da hemicelulose residual (EEH): conduzida com extrato comercial de xilanase (Luminase) a 5UI/g de biomassa em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8 a 50°C, por 6 horas e 24 horas. O tratamento SQE permitiu a solubilização de 48% e 60% da hemicelulose e 86% e 84% da lignina original do bagaço, diferenças obtidas em função do tempo de extração enzimática de 6 e 24 horas, respectivamente. Os sólidos resultantes da segunda etapa do pré-tratamento (polpa-P2) e da terceira etapa (polpa-P3) foram hidrolisados com o coquetel enzimático Cellic Ctec2 (10 FPU/g de glucana) por 48h a 50°C, pH 4,8, nas consistências de 5%, 10% e 15% m/v. A extração enzimática de hemiceluloses (terceira etapa do tratamento SQE) da polpa-P2 não contribuiu com a hidrólise de celulose. Na consistência de 5%, as polpas P2 e P3 apresentaram 95 e 94% de conversão de celulose em 24h, valores similares foram obtidos para as polpas na consistência de 10%, porém em 48h de reação. A conversão de celulose das polpas P2 e P3 em 48h, a 15% de consistência, diminuiu para 84% e 81%, respectivamente. A polpa P3, proveniente da extração enzimática das hemiceluloses por 24h, apresentou um menor valor de conversão de celulose (74%), a 15% de consistência, evidenciando-se o efeito negativo da extração adicional de hemicelulose sobre a hidrólise da celulose. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas porcentagens de conversão de celulose nas polpas P2 e P3, a implementação das três etapas de pré-tratamentos possibilitou a obtenção de duas frações diferentes de hemiceluloses, que foram recuperadas por precipitação com etanol, cada uma delas com características e aplicações potenciais diferentes. A composição química das hemiceluloses extraídas do bagaço de cana as define como arabinoxilana. As condições operacionais utilizadas na primeira etapa (CAE) do tratamento SQE gerou xilanas com maiores massas molares (34.598 g/mol) e mais contaminadas com lignina (18%) comparadas às xilanas recuperadas na terceira etapa (EEH), que apresentaram massas molares entre 9.948-11.678g/mol com 1,5- 3,5% de lignina. Nestas últimas foram identificados a presença de xilooligossacarídeos (XOS) como xilotriose (X₃), xilotetraose (X₄) e xilopentaose (X₅).

Palavras chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento sequencial. Xilana.

ABSTRACT

QUINTERO MORA, L. P. Chemical-enzymatic sequential treatment of sugarcane bagasse and its effect on xylan extraction and saccharification of residual cellulose. 2018. 91 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP.

Lignocellulosic biomass such as sugarcane bagasse has the potential to be used as raw material in the manufacture of value-added products, since its structural components can be separated through pre-treatments and used in process lines. Different types of pre-treatments have been developed with this objective, and in this context, a sequential chemical-enzymatic treatment (SQE) of three-stage sugarcane bagasse was proposed. 1) Cold alkaline extraction (CAE): performed with 10% (w/w) NaOH for 30 min at 25°C, 2) Alkaline sulfite ethanol pre-treatment (ASE): performed with 2.5% (w/w) NaOH and 5% (w/w) Na₂SO₃ in ethanol (30% v/v) for 2h at 120°C and 3) Enzymatic extraction of residual hemicellulose (EEH): Conducted with commercial extract of xylanase (Luminase) at 5UI/g biomass in 50mM sodium phosphate buffer, pH 8 at 50°C, for 6h and 24h. The SQE treatment allowed the solubilization of 48% and 60% of the hemicellulose and 86% and 84% of the original bagasse lignin, differences obtained as a function of the enzymatic extraction time of 6 and 24 hours, respectively. The solids resulting from the second stage (pulp P2) and the third stage (pulp P3) of the pretreatment were hydrolyzed with the enzymatic cocktail Cellic Ctec2 (10FPU/g glucan) for 48h at 50°C pH 4.8, in the consistencies of 5%, 10% and 15% m/v. The enzymatic extraction of hemicelluloses (third stage of the treatment SQA) of the pulp-P2 did not contribute to the hydrolysis of cellulose. At the consistency of 5%, pulps P2 and P3 presented 95 and 94% of cellulose conversion in 24h, similar values were obtained for those pulps in the consistency of 10%, but in 48h of reaction. The cellulose conversion of pulps P2 and P3 in 48h, at 15% consistency decreased to 84% and 81%, respectively. The pulp P3, from the enzymatic extraction of the hemicelluloses for 24h, presented a lower value of cellulose conversion (74%), at 15% of consistency, evidencing the negative effect of the additional extraction of hemicellulose on the hydrolysis of cellulose. Although no significant differences were observed in the cellulose conversion percentages in the P2 and P3 pulps, the implementation of the three pretreatment steps allowed two different fractions of hemicelluloses to be obtained, which were recovered by precipitation with ethanol, each with characteristics and potential applications. The chemical composition of the hemicelluloses extracted from the sugarcane bagasse describes them as arabinoxylan. The operating conditions used in the first stage (CAE) of the SQE treatment generated xylans with higher molar masses (34,598 g/mol) and more lignin contaminants (18%) compared to the third stage (EEH) recovered xylans, which presented molar masses between 9,948-11,678g/mol with 1.5-3.5% lignin. In the latter, the presence of xylo-oligosaccharides (XOS) such as xylotriose (X3), xylotetraose (X4) and xylopentaose (X5) were identified.

Keywords: Sugarcane bagasse. Sequential treatment. Xylan.

ABREVIATURAS

ASE	Pré-tratamento sulfito alcalino em etanol
AX	Arabinoxilana
BLC	Biomassa lignocelulósica
DP	Grau de polimerização
CAE	Extração alcalina a frio
CBP	Bioprocessamento consolidado
CBM	Domínio de ligação a carboidrato
CD	Domínio catalítico
DNS	Ácido Dinitrossalicílico
EEH	Extração enzimática da hemicelulose remanescente
FPU	Unidade de papel filtro
GH	Glicosil hidrolases
G	Guaiacil
H	p-Hidroxifenil
LN	Licor negro
LA	Licor alcalino
LAE	Licor alcalino etanol
LCC	Complexo lignina-carboidrato
LTA	Tratamento alcalino a baixa temperatura
MDI	Metil
Mn	Massa molar ponderal média
Mn/Mw	Índice de dispersividade
Mw	Massa molar numérica média
P1	Polpa 1
P2	Polpa 2
P3-6h	Polpa 3 obtida depois de 6 horas de extração enzimática
P3-24h	Polpa 3 obtida depois de 24 horas de extração enzimática
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Siringil
SHCF	Hidrólise e co-fermentação das hexoses com pentoses
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas

SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
SSCF	Sacarificação simultânea à co-fermentação
SQE	Tratamento sequencial químico-enzimático
TLC	Cromatografia em camada fina
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
XOS	Xilooligossacarídeos
X	Xilose
X2	Xilobiose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
X5	Xilopentaose
X-1	Xilana 1
X-3-6	Xilana 3 obtida após 6 horas de extração enzimática
X-3-24	Xilana 3 obtida após 24 horas de extração enzimática

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de parênquima (P), vasos (V) e fibras (F) das regiões de córtex e medula de um corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar.....	19
Figura 2 – Precusores e estrutura da lignina.....	21
Figura 3 – Organização estrutural da celulose.....	22
Figura 4 – Diferentes sítios de ação das enzimas xilanolíticas na cadeia de xilana.	33
Figura 5 – Degradação enzimática da celulose.....	36
Figura 6 – Fluxograma geral do tratamento sequencial do bagaço de cana-de-açúcar.	42
Figura 7 – Curva de calibração de xilose utilizada no cálculo da atividade da xilanase.	46
Figura 8 – Curva de calibração da coluna Biogel P-30.	48
Figura 9 – Gráfico para determinar a diluição de enzima que libera aproximadamente 2 mg de glicose.	51
Figura 10 – Porcentagens de remoção de hemicelulose e lignina em diferentes concentrações de álcali (expressados em %m _{NaOH} /m _{Bagaço}), temperatura e tempo de reação.	56
Figura 11 – Porcentagens de remoção de hemicelulose e lignina dos bagaços pré-tratados a 121°C em diferentes concentrações de álcali (NaOH), sulfito (Na ₂ SO ₃) e tempo de reação.	59
Figura 12 – Remoção de xilana da polpa-P2 utilizando os dois extratos enzimáticos em diferentes cargas de xilanases.	65
Figura 13 – Conversão de celulose da polpa-P2 utilizando diferentes cargas de Cellic Htec2.	66
Figura 14 – Gráfico de interações entre as cargas enzimáticas 5UI, 50UI e 500UI dos dois tipos de extratos comerciais enzimáticos utilizados.....	66
Figura 15 - Esquema do tratamento sequencial químico-enzimático.	69

Figura 16 – Perfil de distribuição das massas molares das xilanas recuperadas por precipitação com etanol.	72
Figura 17 – Cromatografia em camada delgada das xilanas isoladas.	73
Figura 18 – Cromatografia em camada delgada das xilanas extraídas pelos extratos enzimáticos comerciais Luminase e Cellic Htec2 em diferentes cargas.	75
Figura 19 – Conversão de celulose e xilana na sacarificação em diferentes consistências de sólidos das polpas obtidas no tratamento sequencial do bagaço.	77
Figura 20 – Concentração de glicose e xilose durante o processo na sacarificação em diferentes consistências de sólidos das polpas obtidas no tratamento sequencial do bagaço.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de bagaços de cana-de-açúcar de diferentes procedências.....	20
Tabela 2 – Principais tipos de hemiceluloses.	23
Tabela 3 – Efeitos do diferentes processos de pré-tratamento na composição e estrutura da biomassa.....	29
Tabela 4 – Enzimas hidrolíticas envolvidas na despolimerização da celulose.....	35
Tabela 5 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	52
Tabela 6 – Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção dos componentes do bagaço de cana antes e depois da extração alcalina a frio	54
Tabela 7 – Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção dos componentes da polpa-P1 antes e depois do tratamento ASE.	58
Tabela 8 – Componentes determinados no licor negro (LN) gerado após o pré-tratamento alcalino/sulfito/etanol.....	60
Tabela 9 – Caracterização das polpas P3 geradas após os tratamentos enzimáticos em diferentes tempos de reação.	61
Tabela 10 – Balanço de massa da etapa de extração enzimática com Luminase do tratamento sequencial químico enzimático.....	63
Tabela 11 – Atividades enzimáticas das enzimas comerciais utilizadas.	64
Tabela 12 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar nas diferentes etapas do tratamento.	67
Tabela 13 – Composição das xilanas recuperadas a partir das frações líquidas geradas no tratamento sequencial.	70
Tabela 14 – Massa molar ponderal média (Mm), massa molar numérica média (Mn) e Índice de dispersividade (Mm/Mn) das xilanas isoladas do tratamento químico enzimático do bagaço de cana.	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	19
2.2 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULOSICA	20
2.2.1 Lignina.....	20
2.2.2 Celulose.....	22
2.2.3 Hemicelulose.....	22
2.3 APLICAÇÕES POTENCIAIS DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	24
2.3.1 Aplicações da lignina	24
2.3.2 Aplicações da celulose	26
2.3.3 Aplicações das hemiceluloses	27
2.4 PRE-TRATAMENTOS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	28
2.4.1 Tratamentos alcalinos	29
2.4.2 Tratamentos <i>organosolv</i>	31
2.4.3 Tratamentos enzimáticos	32
2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	34
2.5.1 Celulases	34
2.5.2 Sacarificação de celulose na biomassa	36
2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	40
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO	40
4.3 TRATAMENTO SEQUENCIAL QUÍMICO-ENZIMÁTICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	41
4.3.1 Etapa 1: Extração alcalina a frio (CAE)	41
4.3.2 Etapa 2: Pré-tratamento Sulfito alcalino com etanol (ASE).....	43

4.3.2 Etapa 3: Extração enzimática da hemicelulose remanescente.....	43
4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS COMERCIAIS DE XILANASES EM DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS	44
4.5 BALANÇO DE MASSA DO TRATAMENTO SEQUENCIAL	44
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE	45
4.7 RECUPERAÇÃO DAS HEMICELULOSES EXTRAÍDAS NO TRATAMENTO SEQUENCIAL.....	46
4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS.....	47
4.8.1 Cromatografia em camada fina.....	47
4.8.2 Determinação da massa molar.....	47
4.8.3 Determinação dos açúcares.....	48
4.8.4 Determinação de Lignina	49
4.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ- TRATADO	49
4.9.1 Determinação da Atividade de celulasas totais	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA	52
5.2 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA	53
5.2.1 Extração alcalina a frio da xilana.....	53
5.2.2 Pré-tratamento alcalino/sulfito/etanol (ASE).....	57
5.2.3 Extração enzimática da xilana remanescente	61
5.3 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS COMERCIAIS DE XILANASES EM DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS	63
5.4 ANALISE DO TRATAMENTO SEQUENCIAL QUÍMICO-ENZIMÁTICO	67
5.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS EXTRAIDAS DO BAGAÇO DE CANA	69
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO SEQUENCIAL NA SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE	75
6 CONCLUSÕES	82
REFERENCIAS	83
ANEXO A.....	91

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos fósseis têm promovido o desenvolvimento econômico mundial durante séculos mediante sua transformação em bens e serviços, embora a utilização de tecnologias de prospecção e exploração destes recursos não renováveis tenha produzido efeitos negativos e quase irremediáveis no ambiente, tais como as emissões de gases de efeito estufa. Neste contexto, as energias renováveis aparecem como fontes de energia alternativas, visando substituir os hidrocarbonetos como a matéria-prima principal.

Nos últimos anos a biomassa lignocelulósica (BLC) se apresenta como uma excelente candidata para a obtenção de energia alternativa por ser renovável e estar amplamente distribuída. Além disso, representa o maior volume potencial e menor custo para a produção de uma ampla gama de produtos, entre eles combustíveis, químicos, produtos de valor agregado ou outros bio-materiais que podem ser fornecidos como insumos para etapas posteriores (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010; FARHAT et al., 2017). Tudo isto é possível fazendo uso de todos os componentes estruturais da biomassa dentro do conceito de uma Biorrefinaria (ZHANG; PEI; WANG, 2016).

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto lignocelulósico do cultivo de cana em países tropicais gerado pela indústria sucro-alcooleira após a extração do caldo da cana. Atualmente, seu aproveitamento se baseia na co-geração de energia mediante a sua queima (MESA et al., 2011; PENG et al., 2009). No entanto, o bagaço é considerado um material, embora complexo, com potencial para a fabricação de produtos de interesse comercial e produção de energia a partir de seus constituintes. O bagaço se compõe de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, sendo as três primeiras frações as mais abundantes e importantes para seu uso potencial (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; FARHAT et al., 2017; ROCHA et al., 2012; TAYLOR et al., 2015).

Entre os componentes da parede celular da biomassa lignocelulósica as hemiceluloses se apresentam como uma mistura de polissacarídeos e são consideradas o segundo biopolímero mais abundante, porém ainda não são amplamente utilizadas em processos industriais. Quimicamente, as hemiceluloses possuem uma estrutura e composição diferentes, dependendo da espécie botânica de onde são provenientes. A principal hemicelulose de gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, é a glucuronoarabinoxilana (SUN et al., 2004). As hemiceluloses nativas e seus derivados têm algumas aplicações em diferentes setores industriais como alimentício, químico,

farmacêutico e de materiais, portanto seu estudo e caracterização têm ganhado interesse crescente (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; FARHAT et al., 2017). Por outro lado, a fração da lignina também é uma fonte importante para a fabricação de produtos comerciais, dada a natureza desta macromolécula. A literatura relata uma série de processos para a fragmentação e modificação química da lignina que levam a obtenção de alguns compostos de interesse, como resinas, pólios, adesivos e vanilina, mas também têm sido sugeridas algumas aplicações diretas da lignina, sem passar por processos de modificação (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

A gama de produtos que podem ser obtidos a partir dos constituintes da biomassa lignocelulósica é ampla, porém o seu aproveitamento total requer de um passo prévio conhecido como pré-tratamento. O objetivo desta etapa nos processos de transformação da biomassa nada mais é que diminuir a recalcitrância dos materiais facilitando a sua fragmentação, separação e recuperação das principais frações da biomassa, de maneira que vários tipos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos cada um com uma especificidade na alteração da estrutura física e química dos materiais lignocelulósicos (SUN et al., 2016). Os materiais depois de pré-tratados ficam mais susceptíveis à ação enzimática, possibilitando a sua transformação em diversos produtos por essa tecnologia.

Neste contexto, o foco deste estudo foi a combinação de diferentes tratamentos químicos e enzimático visando extrair as hemiceluloses do bagaço de cana-de-açúcar, restando um sólido enriquecido em celulose para a obtenção de glicose.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é reconhecido no cenário mundial como o maior expoente na produção de cana-de-açúcar, bem seja para a fabricação de açúcar ou etanol (anidro/hidratado). Esta atividade econômica se constituiu, nos últimos anos, em ponto estratégico da agenda comercial brasileira (VILELA et al., 2015). A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil, mas fatores do meio, tais como o clima, a temperatura, a umidade do ar e o tipo de solo em São Paulo consolidaram-no como o maior estado produtor do país onde se concentra 52,7% da área colhida (CONAB, 2017). Na safra 2017/2018 foram produzidas cerca de 651.841 mil toneladas de cana-de-açúcar das quais 182.525 mil toneladas de bagaço (base seca) foram geradas (UNICA, 2017), considerando que a partir de uma tonelada de cana são gerados em torno de 25% de bagaço após o processo de extração do caldo da cana nas indústrias sucro-alcoólicas (BIAN et al., 2012).

De acordo com Sandhu et al. (2006) estruturalmente a cana está composta por nós e entrenós e nestes pode-se distinguir duas regiões, a parte mais externa é chamada de córtex e a região interna é geralmente chamada de medula. Na medula da cana há maior aglomeração de células de parênquima, enquanto que no córtex células de esclerênquima, ricas em lignina e celulose, são predominantes.

Figura 1 – Células de parênquima (P), vasos (V) e fibras (F) das regiões de córtex e medula de um corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar.

Fonte: Siquera et al. (2011)

A distribuição das células da cana e demais componentes químicos fazem do bagaço um material heterogêneo para sua transformação e aproveitamento. O bagaço é um

material fibroso, cuja composição química pode variar de acordo com as espécies da planta, sua maturidade e condições climáticas de cultivo. Quimicamente, se compõe de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, sendo as três primeiras frações as mais abundantes e importantes para seu uso potencial (ROCHA et al., 2012) (Tabela 1). Além destes, encontram-se também os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico e ferúlico (SIQUEIRA et al., 2011).

Tabela 1 – Composição química de bagaços de cana-de-açúcar de diferentes procedências

Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas	Referência
38,5	27,8	17,7	2,7	8,8	Guilherme et al. (2015)
44,7	28,8	19,5	3,2	3,6	Rocha et al. (2015)
35,1	30,3	19,6	9,9	1,6	Benjamin; Cheng; Görgens, (2013)
39,4	23,2	25,7	-	4,5	Zhang e Wu (2014)
45,2	22,1	22,4	-	1	Yao et al. (2015)

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULOSICA

2.2.1 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática e amorfa de elevada massa molar, formada a partir do acoplamento oxidativo dos seus precursores primários, os álcoois cumarílico, coniferílico e sínapílico, que diferem em seus graus de metoxilação (Figura 1) (HAMMEL, 1997; RALPH, 2010). Mediante a polimerização radicalar estes são incorporados na macromolécula, originando as denominadas unidades de guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H) (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010; HORN et al., 2012). A composição da lignina varia entre os tipos de plantas, tecidos e também dentro das camadas da parede celular da mesma planta. A classificação das ligninas se baseia de acordo com o teor das unidades presentes. Segundo um estudo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massas (Py-GC/MS), ressonância magnética nuclear (RMN) e derivação seguida de clivagem redutora (DFRC), a lignina do bagaço é rica em unidades de siringil com uma composição molar de 2:38:60 (H:G:S), enquanto a palha da cana-de-açúcar é rica em unidades de guaiacil (4:68:28) (DEL RÍO et al., 2015).

As unidades fenilpropanólicas encontram-se ligadas entre si por dois tipos de ligações: ligações éter (C-O-C) e ligações carbono-carbono (C-C), sendo estas últimas menos abundantes. Diferenças na composição molar da lignina também se refletem nas diferentes ligações interunitárias. A lignina do bagaço, por exemplo apresentou 83% de ligações (mensuráveis com RMN) de β -O-4' aril éter e 6% de ligações de β -5' (DEL RÍO et al., 2015). A lignina pode também fazer ligações com os polissacarídeos, formando um tipo de associação conhecida como complexo lignina-carboidrato (LCC). Os LCCs envolvem ligações covalentes entre lignina e os carboidratos, principalmente com as hemiceluloses (FARHAT et al., 2017). Em gramíneas, o ácido p-cumárico e ferúlico também fazem parte deste complexo formando pontes entre a lignina e a hemiceluloses mediante ligações éter e éster, respectivamente (PENG et al., 2009; RALPH, 2010). Tudo isto faz com que a estrutura da lignina mostre alta estabilidade biológica e química. A lignina faz ligações com a hemicelulose, recobrando as microfibrilas de celulose mantendo-as orientadas, oferecendo tanto impermeabilidade como resistência mecânica aos tecidos das plantas contra o ataque dos microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2 – Precursores e estrutura da lignina.

Fonte: Adaptado de Calvo-Flores e Dobado, (2010).

2.2.2 Celulose

A celulose é o principal polissacarídeo da biomassa e está localizado majoritariamente na parede secundária das células. É o homopolímero linear mais abundante correspondendo a 40-50% da matéria seca na maioria das espécies vegetais (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012), constituída por monômeros de D-glicose (β -D-glicopiranoses) juntas entre si por ligações glicosídicas β -1,4 formando cadeias (Figura 3) (JEOH et al., 2017). Como resultado da geometria das ligações glicosídicas, os monômeros de glicose ao longo da cadeia sofrem um giro de 180 graus sobre o plano central da molécula, o que significa que o dissacarídeo, celobiose, é a unidade de repetição no polímero (FENGEL; WEGENER, 1989). Por sua vez, as cadeias glicosídicas interagem entre si mediante forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, gerando as microfibrilas. A associação das microfibrilas forma as fibrilas (PARTHASARATHI et al., 2011). As microfibrilas da celulose contém em sua estrutura tanto regiões cristalinas como regiões amorfas, as primeiras são mais organizadas e recalcitrantes que as segundas. Dependendo da origem da celulose, esta pode ter diferentes graus de polimerização, variando de 8.000-10.000 (PARK et al., 2010).

Figura 3 – Organização estrutural da celulose.

Fonte: Adaptado de: BGIM (2001).

2.2.3 Hemicelulose

A hemicelulose pode ser classificada como um homopolissacarídeo ou um heteropolissacarídeo dependendo se contém mais do que um tipo de monossacarídeo na sua cadeia principal. Pentoses (xilose, arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) são geralmente os açúcares constituintes da cadeia principal e dependendo da sua

Tabela 2 – Principais tipos de hemiceluloses.

HEMICELULOSES	XILANAS	(GX)	<p>ACETIL-4-O-METILGLUCURONOXILANA</p> <p><u>Cadeia principal</u> Xilose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> MeGlc α-(1-2) Acetil <u>Madeira dura</u></p>	<p>METILGLUCURONOXILANA (MGX) 4-o-metilglucuronoxilana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Xilose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> GlcA α-(1-2) MeGlc α-(1-2) <u>Madeira dura</u></p>	<p>ARABINOGLUCUROXILANAS (AGX) Arabino-4-o-metilglucuroxilana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Xilose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Arabinose α-(1-2) MeGlc α-(1-2) <u>Madeira branda e gramíneas</u></p>
		(AX)	<p>ARABINOXILANA L-arabin-D-xilana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Xilose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Arabinose α-(1-2) Pode ser mono o dissustituído Gramíneas</p>	<p>GLUCURONOARABINOXILANAS (GAX) D-glucurono-L-arabino-D-xilana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Xilose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> MeGlc α-(1-2), Arabinose α-(1-2) Acetil (parcialmente) Gramíneas (Bagaço de cana-de-açúcar)</p>	
	MANANAS	<p>GALACTOMANANAS (GaM) D-galacto-D-manana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Manana β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Galactose α-(1-6) <u>Leguminosas</u></p>	<p>GLUCOMANANAS (GM) D-glucu-D-manana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Glicose β-(1-4) Manose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Acetil</p>	<p>GALACTOGLUCOMANANAS (GGX) D-galacto-D-glucu-D-manana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Glicose β-(1-4) Manose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Galactose α-(1-6) e Acetil</p>	
	GLUCANAS (Xiloglucanas)	<p>XILOGLUCANAS (XG) D-xilo-D-glucana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Glicose β-(1-4) <u>Grupo pendente</u> Xilose α-(1-6) <u>Madeira dura e branda, gramíneas (menor quantidade)</u></p>	<p>METILGLUCURONOXILANA (MGX) 1$\rightarrow$3, 1$\rightarrow$4 glucana</p> <p><u>Cadeia principal</u> Glicose β-(1-3)(1-4) <u>Grupo pendente</u> Não apresenta <u>Gramíneas</u></p>		

Fonte: Adaptado de Ebringerová (2006), Peng et al. (2012) e Farhat et al. (2017).

predominância alguns autores têm classificado este polímero em xilanas, mananas, glucanas e galactanas. (EBRINGEROVÁ, 2006; PENG et al., 2012) (Tabela 2). Em comparação com a celulose, seu grau médio de polimerização (DP) é menor, em torno de 80-200 (PENG et al., 2012; ZHANG et al., 2016) e quando comparada com a organização da celulose, as hemiceluloses não apresentam regiões ordenadas o que facilita a sua solubilização por métodos químicos.

A hemicelulose encontra-se presente na biomassas em diferentes composições químicas dependendo da fonte botânica (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012). Por exemplo, a glucuronoxilana (o-acetil-4-o-metilglucuronoxilana) e a galactoglucomanana (o-acetilgalactoglucomanana) são respectivamente as principais xilanas encontradas em madeiras de folhosas (angiospermas) e coníferas (gimnospermas) (FARHAT et al., 2017). Nas gramíneas, a arabinoxilana e a glucuronoarabinoxilana são as hemiceluloses predominantes (EBRINGEROVÁ, 2006; PENG et al., 2012). No caso do bagaço de cana-de-açúcar a xilana tem sido definida como 4-o-metil-d-glucurono-l-arabino-d-xilana, e sua estrutura pode variar dependendo tanto da parte de planta examinada quanto do método de extração (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013; BRIENZO et al., 2014). As cadeias deste tipo de xilana são compostas por unidades de D-xilose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e apresentam grupos pendentes de acetila, arabinose e ácido metilglucurônico (HORN et al., 2012; PENG et al., 2012). A hemicelulose está intimamente associada às fibrilas de celulose e à lignina mediante ligações de hidrogênio e covalentes, respectivamente, o que dá rigidez ao tecido vegetal (RALPH, 2010).

2.3 APLICAÇÕES POTENCIAIS DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

2.3.1 Aplicações da lignina

A lignina representa uma fonte renovável para a obtenção de compostos químicos, de maneira que o desenvolvimento de aplicações da fração de lignina está sendo amplamente estudado com o objetivo de valorizar os processos de transformação da biomassa. Entre os processos de fragmentação e modificação da lignina encontra-se a pirólise, oxidação, hidrogenólise, hidrólise e gaseificação (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). Compostos fenólicos, como vanilina, cresóis, catecóis, guaiacol, podem ser gerados

na hidrólise e a oxidação da lignina sob altas pressões e temperaturas. A vanilina que é usada como agente aromatizante na indústria farmacêutica, de alimentos, e na indústria de fragrâncias, pode ser produzida a partir de lignina sulfonada e lignina kraft (ARAÚJO; GRANDE; RODRIGUES, 2010; LUO et al., 2016).

A lignina pode ter aplicações diretas, sem envolver processos químicos de modificação da sua estrutura como copolímero em diferentes formulações como poliolefinas-lignina, poliésteres-lignina e poliuretanos-lignina (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010; KENDALL PYE, 2006). Os lignosulfonatos, gerados na fabricação de pasta de celulose com sulfito, podem ser usados como agentes dispersantes para pesticidas, emulsificantes, e sequestrantes de metais pesados (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). Dada sua baixa toxicidade, eles tem sido estudados como aglutinantes na ração animal, pois melhoram as propriedades dos pellets da ração além de ajudar a fornecer nutrição balanceada para o gado (KENDALL PYE, 2006). Por outro lado as ligninas isentas de enxofre geradas nos pré-tratamento organosolv também foram testadas na alimentação animal, com efeitos prebióticos. Porém pesquisas ainda são necessárias para determinar as dosagens ideais de lignina (BAURHOO; RUIZ-FERIA; ZHAO, 2008).

A modificação química da lignina antes da incorporação nas formulações de polímeros também tem sido explorada, mediante reações de alquilação, desalquilação, oxialquilação, aminação, carboxilação, acilação, halogenação, nitração, hidrogenólise, metilação (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). No campo dos materiais a incorporação de diversas formulações de lignina em outros polímeros foram investigadas. Em resinas de fenol-formaldeído a substituição de aproximadamente 50% do fenol por lignina kraft ou lignina sulfonada não modificam substancialmente as propriedades do produto final (PARK; DOHERTY; HALLEY, 2008). A partir de lignina kraft foi sintetizado um copoliéster termoplástico com boa estabilidade térmica e mais amigável ao ambiente (THANH BINH et al., 2009). Alguns polióis como polietilenoglicol (PEG) ou polipropilenoglicol (PPG) e isocianato de metilenodifenil (MDI) podem ser sintetizados utilizando as ligninas organosolv (KENDALL PYE, 2006). Um material termoplástico, chamado ARBOFORM foi desenvolvido pela mistura de ligninas, fibras naturais e aditivos. Este material é um granulado de plástico que pode ser fundido e moldado por injeção, de modo que ao igual que com os termoplástico petroquímico pode ser aplicado com máquinas de processamento de plástico (NAGELE et al., 2002).

2.3.2 Aplicações da celulose

A principal utilização da celulose é para a obtenção de pasta ou polpa celulósica para a fabricação de papel, principalmente vinda de eucalipto (BAJPAI, 2017). Porém, alguns tipos de produtos finais toleram bem a utilização de celulose proveniente de resíduos agrícolas, tais como: papéis de embalagem, miolos de papelão ondulado, miolo de papel cartão, produtos de polpa moldada, etc.

Pesquisas tecnológicas mais recentes em nanotecnologias vislumbraram novas oportunidades para as moléculas e para as fibrilas de celulose. Partículas de celulose que possuem pelo menos uma de suas dimensões inferior a 100 nm, são conhecidas como nanoceluloses, dependendo da sua estrutura estas podem ser em forma de nanocristais e nanofibrilas (PEREIRA; ARANTES, 2018). A partir de estas, produtos de alto valor podem ser gerados para indústria de: cosméticos, têxtil, farmacêutica, implantes médicos, alimentos e compósitos (KLEMM et al., 2018).

A transformação das fibras de celulose da biomassa em biocombustíveis e bioprodutos é crescente. Acontece que a produção do etanol celulósico não é algo tão simples como possa parecer. A hidrólise da celulose a açúcar monomérico é um dos desafios mais importantes para os pesquisadores que estudam a produção de etanol de segunda geração (MCINTOSH et al., 2016; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Diferentes abordagens experimentais têm sido investigadas para a produção de etanol celulósico, como por exemplo a hidrólise e fermentação em reatores diferentes (SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), a hidrólise e co-fermentação das hexoses com as pentoses (SHCF), a sacarificação simultânea à co-fermentação (SSCF) e o nomeado bioprocessamento consolidado (CBP) que é uma combinação dos quatro eventos biológicos necessários para o processo de conversão da biomassa (SILVEIRA; VANELLI; CHANDEL, 2018). Por outro lado, outro tipo de fermentações em diferentes condições de processos, bem seja usando bactérias, fungos ou leveduras, geneticamente modificadas, ou não, podem ser empregadas para produzir álcoois, ácidos orgânicos, alcenos, lipídios e outros produtos químicos a partir dos monômeros de glicose obtidos mediante a hidrólise da celulose (TAYLOR et al., 2015).

2.3.3 Aplicações das hemiceluloses

Nos últimos anos aumentou o interesse no isolamento e purificação das hemiceluloses para sua utilização em diferentes setores industriais, a fim de aproveitar melhor todos os componentes da biomassa. Como já foi referido, as xilanas são abundantes na natureza e podem ser obtidas de várias fontes, tendo assim composições e massas molares diferentes. Isto possibilita às hemiceluloses nativas e seus derivados, diferentes aplicações dependendo do tipo de substituinte, do modo de substituição e método de extração (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

Com os açúcares constituintes das hemiceluloses, principalmente a xilose, obtidos por hidrólise seja ácida ou enzimática em combinação com rotas químicas e biotecnológicas é possível fabricar diferentes produtos. Entre eles o xilitol, que apesar de ter sido descoberto faz tempo é o produto mais amplamente comercializado, obtido seja mediante fermentação ou por processo complexo de hidrogenação catalítica de xilose. O xilitol se tornou um ingrediente popular em doces, chicletes, pastas para dentes e produtos para diabéticos, por sua capacidade como agente preventivo contra a cárie dentária e seu baixo teor calórico (FARHAT et al., 2017; PENG et al., 2009, 2012; PRAKASHAM; RAO; HOBBS, 2009). Outro produto, considerado como uma das aplicações mais importantes das xilanas é o furfural (PENG et al., 2009). Este composto é derivado principalmente das pentoses e, em parte dos ácidos urônicos, por desidratação em meio ácido o qual pode ser recuperado por destilação a vapor (WHISTLER, et al., 1993).

Na área farmacêutica, os biofilmes com estrutura polimérica baseada em microfibras de xilana têm sido desenvolvidos em curativo para feridas. Este produto pode aderir-se às feridas impedindo a penetrabilidade de água e de microrganismos, mas permite a troca de gases e vapor o que promove a rápida e ótima cicatrização das feridas (FERREIRA et al., 2009). Além disto, destacam-se os xilooligossacarídeos (XOS), os quais são oligômeros formados por diferentes tamanhos de cadeias de xilose, obtidos química ou enzimaticamente a partir das xilanas (BARBOSA; DEKKER; GIESE, 2010). Sua utilização como pré-bióticos tem ampla ação, como agentes preventivos contra a anemia, arteriosclerose, aterosclerose, osteoporose. Ademais, o uso para a redução de complicações associadas às diabetes e no controle do nível de amônia no sangue, tem ganhado ainda mais interesse já que estes produtos de valor agregado podem tornar a produção dos XOS mais rentável em comparação com o etanol combustível (BARBOSA; DEKKER; GIESE, 2010; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; FARHAT et al., 2017).

No campo dos biomateriais, a xilana é usada na formação de películas para embalagem, graças a sua resistência à água, flexibilidade e baixa permeabilidade (HANSEN; PLACKETT, 2008). Porém a capacidade de formação de película das xilanas está relacionada com fatores como o grau de polimerização, a heterogeneidade, a frequência e a regularidade dos grupos pendentes. Algumas películas de xilana têm sido desenvolvidas em mistura com vários polímeros naturais, como amido, quitosana, lignina, alginato, na presença de plastificantes (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012). Recentemente, tem-se observado que a manana poderia inibir a aderência de diferentes cepas de *Candida albicans*, portanto o revestimento dos equipamentos médicos com este tipo de hemicelulose é uma aplicação promissora, em especial na indústria odontológica (FARHAT et al., 2017). Uma outra alternativa vantajosa de uso das hemiceluloses é sua reincorporação e adsorção a polpas celulósicas, pois aumentam as ligações entre fibras, e consequentemente a resistência do papel e o seu rendimento (DOS SANTOS MUGUET; PEDRAZZI; COLODETTE, 2011).

2.4 PRE-TRATAMENTOS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Uma gama de produtos pode ser gerada a partir dos constituintes da biomassa lignocelulósica, porém a sua transformação requer um passo prévio conhecido como pré-tratamento, cujo objetivo é produzir a desorganização do complexo lignocelulósico, para permitir o fracionamento ou separação dos constituintes de interesse. A principal limitação dos pré-tratamentos encontra-se na dificuldade de separar um dos componentes sem que ocorra alguma degradação da estrutura química dos demais (PENG et al., 2012). Vários tipos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos, cada um tendo uma especificidade diferente na alteração da estrutura física e química dos materiais lignocelulósicos. Na Tabela 3 é apresentado um resumo com os efeitos gerados na biomassa lignocelulósica pelos principais tratamentos.

Nos tratamentos hidrotérmicos, os grupos acetila são clivados, por íons oxônios produzidos pela ionização da água, o que leva a uma diminuição do pH do meio favorecendo a auto-hidrólise da biomassa (FARHAT et al., 2017). Os tratamentos por explosão a vapor são feitos a altas temperaturas e tempos curtos, diferentemente do processo de auto-hidrólise. Nos dois processos podem ser obtidas hemiceluloses oligoméricas, açúcares monoméricos e produtos de degradação, em proporções que variam com as condições dos processos (PENG et al., 2012). Por outro lado, nos tratamentos com

ácidos diluídos as hemiceluloses são hidrolisadas a monômeros e produtos de degradação, como derivados do furano podem ser gerados em baixas quantidades, restringindo suas aplicações. (FARHAT et al., 2017).

Tabela 3 – Efeitos do diferentes processos de pré-tratamento na composição e estrutura da biomassa.

Pré-tratamento	Remoção de lignina	Remoção de hemicelulose	Aumento na acessibilidade	Descristalização de celulose	Aumento da porosidade	Geração de inibidores
Mecânico	-	-	Alto	Alto	-	Baixo
Alcalino	Alto	Alto	Alto	-	Alto	Baixo
Acido	Médio	Alto	Alto	-	Médio	Alto
Oxidativo	Alto	-	-	-	Alto	Baixo
Organosolv	Alto	Baixo	Alto	-	Médio	Baixo
Líquidos Iônicos	Médio	Baixo	Alto	Alto	Alto	Baixo
Explosão a vapor	Baixo	Alto	Alto	Baixo	Alto	Alto
Hidrotérmico	Médio	Alto	Médio	-	Médio	Alto
AFEX	Médio	Baixo	Alto	Alto	Alto	Baixo
SC-CO ₂	Baixo	Baixo	Alto	-	Alto	Baixo
Biológico	Alto	Médio	Alto	-	Alto	Baixo

Fonte: Adaptado de Sun et al. (2016).

Nota: AFEX: Ammonia fiber explosion

SC-CO₂: Supercritical CO₂

2.4.1 Tratamentos alcalinos

Os tratamentos alcalinos clivam as ligações α -éter e éster, entre lignina-hemicelulose ou lignina/hemicelulose-ácidos hidroxicinâmicos (PENG et al., 2012), solubilizando a lignina e a hemicelulose. A hemicelulose permanece na forma oligomérica em lugar de açúcares monoméricos, ampliando assim a sua utilização em diferentes aplicações como a fabricação de biofilmes ou a produção de xilo-oligossacarídeos (FARHAT et al., 2017). Geralmente este tipo de tratamento é realizado em altas temperaturas (>100°C) (WU et al., 2011), aumentando o custo do processo, pelo maior consumo de energia. Recentemente, foi proposta a extração alcalina a frio (Cold alkaline extraction-CAE) (CARVALHO et al., 2016), também chamado de tratamento alcalino a baixa temperatura (low temperature alkali treatment-LTA) (WU et al., 2011), uma vez que esta é conduzida em temperaturas entre 20°C e 40°C (HUTTERER; SCHILD;

POTTHAST, 2016) para melhorar a eficiência da extração de xilana, evitando uma demasiada deslignificação.

Condições como, tipo de álcali e concentração, tempo, temperatura e teor de sólidos ou consistência de reação têm mostrado diferentes efeitos sob o processo em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica. A condição otimizada de um processo CAE variou com os diferentes tipos de biomassa, como determinado para eucalipto (40°C, 60 min e 70 g/L de NaOH), bagaço (33°C, 60 min, 110 g/L de NaOH) e palha de cana-de-açúcar e (31°C, 55 min 110 g/L de NaOH). Nestas condições obtiveram porcentagens de extração de xilana diferentes com valores de 37% para eucalipto, 46% para bagaço e 61% palha de cana-de-açúcar, quando as reações foram conduzidas numa relação solido:líquido de 1:10 (g/mL) (CARVALHO et al., 2016). De maneira similar, a extração de arabinoxilanas de palha de trigo, em reações com menor teor de sólidos (7% m/v), apresentou 56% de rendimento de extração na condição otimizada de processo, 40°C, 90 min, 100 g/L NaOH num estudo que avaliou diferentes concentrações de álcali, tempo e temperatura (GARCÍA et al., 2013a). Devido à similaridade das condições de extração de algumas biomassas lignocelulósicas, poderia ser sugerida a mistura delas para seu tratamento, tornando as biorrefinarias mais flexíveis no sentido de não depender apenas de um tipo específico de biomassa de um só setor industrial, porém muitos estudos devem ser apresentados para verificar sua viabilidade. Por outro lado, em um tratamento com 40 g/L de NaOH a 30°C por 18 horas, foram atingidos porcentagens ainda maiores de remoção de hemicelulose 72%, 73% e 85 %, e de lignina 78%, 69% e 82% a partir de amostras de caule de milho sem extrativos, palha de centeio e palha de arroz, respectivamente, em baixa consistência (XIAO; SUN; SUN, 2001).

Hidróxido de sódio e potássio são frequentemente preferidos nestes tratamentos alcalino. Em concentrações iguais, a remoção da hemicelulose com hidróxido de potássio resulta em maior pureza, embora o hidróxido de sódio seja ligeiramente mais eficaz na remoção de hemicelulose (PENG et al., 2012). Em bagaço de cana-de-açúcar deslignificado, sete frações de hemicelulose foram solubilizadas com rendimentos entre 41-43% por fração, em reações com consistência de sólidos de 5% m/v, em diferentes temperaturas (20-50°C) durante 10 horas de tratamento e empregando 10% KOH em solução (BIAN et al., 2012). Rendimentos mais baixos de extração na faixa de 12-18% foram alcançados na extração de arabinoxilana de bagaço de cana com KOH em diferentes temperaturas, tempos de reação, concentração de álcali (DE FIGUEIREDO et al., 2017). Além destes álcalis, hidróxido de lítio, bário, amônio e cálcio são também apropriados,

embora o último apresente menor solubilidade e seletividade pela hemicelulose (PENG et al., 2012).

Em alguns casos, a carga do álcali está diretamente relacionada com a quantidade de hemicelulose solubilizada. Por exemplo, no trabalho de Khuong e colaboradores, (2014) quem trataram bagaço de cana-de-açúcar com uma consistência de sólidos de 5%*m/v*, observaram que ao aumentar a concentração de NaOH (8g/L, 10g/L e 15g/L) as respectivas porcentagens de remoção de lignina também aumentaram (64%, 80% e 89%) e do mesmo modo a remoção da xilana (49%, 65% e 96%) nas reações conduzidas a 121°C/60 min. Por outro lado, na mesma consistência de sólidos, porém em temperatura mais baixa (25°C), WU e colaboradores (2011) também observaram aumento na taxa de remoção de xilana de 33% para 62% e de 54% para 72% quando amostras de dois tipos de bagaço de sorgo foram tratadas com 40g/L e 100g/L de NaOH, respectivamente.

O peróxido de hidrogênio também é reportado como bom agente tanto na deslignificação quanto na solubilização das hemiceluloses (SUN; SU; WEN, 2001). No entanto, é necessária a adição de agentes quelantes ao meio reacional, a fim de eliminar os metais pesados que possam causar uma decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio, gerando radicais hidroxilas que decompõem os polissacarídeos (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009). Aproximadamente 71% de hemicelulose e 74% de lignina original do bagaço de cana-de-açúcar, foram solubilizados no licor após o pré- tratamento com 1,84 mL de peróxido de hidrogênio (7,4% *v/v*) por grama de bagaço nas condições otimizadas (25°C/1h), para a produção de etanol a partir da celulose residual (RABELO et al., 2014).

2.4.2 Tratamentos *organosolv*

Este tipo de pré-tratamento utiliza um solvente orgânico a temperaturas elevadas (ZHAO et al., 2017; ZHAO; CHENG; LIU, 2009) para solubilizar a lignina e parte da hemicelulose, deixando a fração sólida enriquecida com celulose (FARHAT et al., 2017; SUN et al., 2016). Muitos solventes orgânicos, como etanol, metanol, acetona, e etilenoglicol têm sido utilizados para o pré-tratamento de vários materiais lignocelulósicos, porém entre eles, o etanol é o solvente mais favorável devido à sua baixa toxicidade e fácil recuperação (ZHANG; PEI; WANG, 2016). O tratamento *organosolv* pode ser realizado com ou sem adição de catalisadores ácidos e alcalinos, permitindo atingir a despolimerização quase completa da fração hemicelulósica com um alto grau de

deslignificação. Na ausência de catalisadores é imprescindível o incremento na temperatura ($>185^{\circ}\text{C}$) para liberar os grupos acetil da hemicelulose e acidificar o licor, o que permitirá a auto-hidrólise do material por meio da clivagem das ligações glicosídicas das hemiceluloses (ZHANG; PEI; WANG, 2016). Ácidos minerais (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4) e orgânicos (ácido oxálico, acetilsalicílico, salicílico e fórmico) são alguns exemplos de catalisadores, alguns deles (ácido fórmico e acético) podem ser empregados à pressão atmosférica, mas causam corrosão e acetilação da celulose. Li e colaboradores (2012) solubilizaram 57% e 73% da xilana e lignina original, respectivamente, de bambu num pré-tratamento organosolv usando 2% m/m de H_2SO_4 como catalisador nas seguintes condições: etanol 75% m/m, 30 minutos, 160°C e 16% m/v de consistência. Entre os catalisadores alcalinos estão o NaOH , KOH , NH_4OH , Na_2SO_3 (ESPINOZA-ACOSTA et al., 2014). Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído foi submetido a um tratamento organosolv com 3% m/m de NaOH na relação de líquido:sólido de 1:7 (g/mL). Diferentes condições de temperatura (175 , 185 e 195°C), tempo de reação (20, 40 e 60 minutos) e concentração de solvente (10, 20 e 30%v/v de etanol) foram avaliadas. Nas condições ótimas do tratamento ($195^{\circ}\text{C}/60\text{min}/30\%\text{v/v}$ etanol) foram removidos 53% de xilose e 17% de lignina (MESA et al., 2011).

2.4.3 Tratamentos enzimáticos

O uso de enzimas para a despolimerização da biomassa lignocelulósica também pode ser considerado um tipo de tratamento (SUN et al., 2016). Dentre as enzimas utilizadas para esse fim, incluem-se as que atuam na hidrólise da xilana, que como já foi mencionado a redução desta fração, junto com a lignina, diminui a recalcitrância da biomassa (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Dependendo do sítio de clivagem, seja no interior da cadeia principal ou a partir do terminal não redutor, elas podem ser consideradas endoenzimas ou exoenzimas, respectivamente. As endo-xilanases produzem uma mistura de xilo-oligossacarídeos a partir da xilana, com diferentes números de resíduos na cadeia, substituídos ou não substituídos, enquanto que as exo-xilanases geram resíduos de xilose como produtos da hidrólise.

Por causa da variada e complexa estrutura das hemiceluloses, sua hidrólise total é um processo difícil que requer a ação coordenada de várias enzimas. A principal enzima na hidrólise da xilana é a endo- β -1-4-xilanase (E.C.3.2.1.8) pertencente às famílias GH 11, 10 e 30, diferindo entre si principalmente no modo de aceitação e reconhecimento dos grupos

pendentes. Tem sido descritas também várias enzimas acessórias que atuam nas diferentes ramificações das xilanas, α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), a α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) e a acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) removem a arabinose, o ácido glucurônico e os resíduos de acetil respectivamente. Na Figura 3 se apresenta os sítios de clivagem das enzimas envolvidas na despolimerização das xilanas (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; PENG et al., 2012).

Figura 4 – Diferentes sítios de ação das enzimas xilanolíticas na cadeia de xilana.

Fonte: Chávez, Bull e Eyzaguirre (2006).

A literatura cita poucos trabalhos envolvendo o uso de enzimas para a extração de xilanas diretamente de biomassas (FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2004; HAKALA; LIITIÄ; SUURNÄKKI, 2013; RÉMOND et al., 2010). No entanto, para a hidrólise de xilana presente no material lignocelulósico, é preciso realizar algum tipo de pré-tratamento, a fim de diminuir a recalcitrância do material para permitir a infiltração das enzimas. Com o objetivo de obter xilo-oligossacarídeos, polpa kraft branqueada foi submetida a um tratamento enzimático com xilanases e endoglucanases. Os tratamentos enzimáticos da polpa foram realizados antes de um ou entre dois passos subsequentes de extração alcalina. As reações enzimáticas foram conduzidas com dois tipos de enzimas (xilanases e endoglucanases) a 45°C, pH 5, consistência de 4%*m/v* durante 2 horas. Nos tratamentos com xilanases foram testadas duas cargas enzimáticas de 20 e 100 nkat/g de polpa, enquanto que a endoglucanase foi adicionada em razão de 0,5 mg de proteína/g de polpa. No caso do tratamento alcalino, este foi conduzido com 40g/L de NaOH numa consistência de 5,5%*m/v*, a temperatura ambiente por 2 horas. O rendimento de xilo-oligossacarídeos com a maior dose de xilanase (1000 nkat/g) foi de 12% ou 3,8% da xilana

na polpa original, no tratamento enzimático realizado para as polpas não extraída e extraída com álcali, respectivamente (HAKALA; LIITIÄ; SUURNÄKKI, 2013).

Outro estudo foi realizado tratando palha de trigo a 60°C com diferentes cargas de xilanases (90, 350 e 700 UI/ g de biomassa) e em diferentes consistências (2, 10, 20 e 28%*m/v*) (RÉMOND et al., 2010). Os autores não evidenciaram aumento na solubilização da xilana em relação ao aumento da carga enzimática. Após 24 horas de reação a solubilização de xilana foi similar nas diferentes consistências, na faixa de 15-19%, sendo a porcentagem mais alta na consistência menor. Valores de 20% da xilana original e 25% de lignina foram removidas após 6h de reação quando utilizou-se 350 UI/g de enzima. No entanto quando a biomassa foi primeiro pré-tratada com hidróxido de amônio (2,5%*m/v*) durante 3 dias à temperatura ambiente e depois tratada com as xilanases, as porcentagem de remoção de xilana e lignina foram de 56% e 45% respectivamente. Os principais xilooligossacarídeos produzidos no tratamento enzimático foram xilobiose e xilotriose (RÉMOND et al., 2010).

Figuerola-Espinoza e colaboradores, (2004) utilizaram uma preparação comercial de endoxilanases (Grindamyl: GS100) assim como também várias endoxilanases de diferentes microorganismos (*Aspergillus niger*:Xyl-1; *Talaromyces emersonii*:Xyl-2 e *Bacillus subtilis*:Xyl-3) na solubilização de arabinoxilana (AX) de farelo de centeio. As reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio 0,1 M em pH 5 a 20°C e 0,5UI/g de biomassa. As porcentagens de solubilização de AX reportadas foram de 5%, 5,1%, 6,7% e 7,7% após 24 h de reação para GS100, Xyl-1, Xyl-2 e Xyl-3, respectivamente. O aumento na solubilização da AX só foi atingido quando o farelo de centeio foi pré-tratado por extrusão. A maior solubilização de xilana foi de 27,4% a partir do farelo extrusado a temperatura alta (147°C) usando endoxilanase de *Bacillus subtilis* (Xil-3). O uso combinado de tratamentos químicos ou físicos com tratamento enzimáticos pode ser considerado como alternativa para diminuir a recalcitrância da biomassa ao mesmo tempo que podem ser obtidos outros produtos de interesse.

2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

2.5.1 Celulases

O processo de sacarificação enzimática da celulose é conduzido por celulases, um grupo de enzimas que agem em sinergismo, para hidrolisar a celulose até glicose (EZEILO

et al., 2017). Estas enzimas são produzidas principalmente por fungos, bactérias e alguns protozoários (GOLAN, 2011). As celulasas são membros da família de enzimas glicosil hidrolases (GH) que catalisam a quebra das ligações glicosídicas da celulose a glicose, (EZEILO et al., 2017; JEOH et al., 2017). Na Tabela 4 encontram-se as principais enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.

Tabela 4 – Enzimas hidrolíticas envolvidas na despolimerização da celulose.

Enzima	EC numero	Função	Família (GH)
Endo-1,4- β -glucanases	EC 3.2.1.4	Agem dentro da cadeia de celulose em regiões de baixa cristalinidade, clivando aleatoriamente as ligações β - (1,4) -glicosídicas expondo novas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias liberadas.	GH5, GH9, GH12 GH44 GH45 GH48 GH51 GH74 GH124.
Exo-1,4- β -glucanases (Celobiohidrolases-CBH)	EC 3.2.1.91 (CBH1) EC 3.2.1.74 (CBH2)	Agem sucessivamente nas regiões cristalinas da cadeia de celulose, liberando celobiose das extremidades redutoras (CBH1) e não-redutoras (CBH2) da cadeia de celulose para liberar unidades de glicose, tendo preferência por substratos de maior comprimento de cadeia.	GH3 GH5 GH6 GH7 GH9 GH48 GH49
1,4- β -glicosidases	EC 3.2.1.21	Hidrolisam a celobiose e outros β -D-oligossacarídeos de cadeia curta (até celohexaose) para formar glicose.	GH1 GH3 GH5 GH9 GH30 GH116

Fonte: Adaptado de Ezeilo et al. (2017); Jeoh et al. (2017).

De maneira geral, vários autores têm descrito que a hidrólise total da celulose acontece em vários passos simultâneos, pela ação em sinergismo das principais celulasas (HORN et al., 2012; JEOH et al., 2017). Assim, a conversão enzimática começa com a adsorção da enzima à superfície da celulose (no caso das endo e exo-glucosidases), seguida da hidrólise das cadeias de celulose (hidrólise primária) e dos produtos liberados, no caso celobiose (hidrolise secundária) (REESE; SIU; LEVINSON, 1950). No caso das celobiohidrolases (CBH), a adsorção acontece em dois passos: primeiro, a enzima liga-se à cadeia de celulose por meio de seu módulo de ligação de carboidrato (CBM) e segundo, acontece a ligação a uma única molécula de celulose no local ativo do domínio catalítico (CD) das CBHs num processo denominado complexação. Finalmente, no meio reacional

ocorre a hidrólise dos oligossacarídeos liberados pela ação da 1,4- β -glicosidases (Figura 4) (JEOH et al., 2017).

Figura 5 – Degradação enzimática da celulose.

Fonte: Adaptado de Jeoh et al. (2017).

2.5.2 Sacarificação de celulose na biomassa

A sacarificação enzimática da celulose da biomassa lignocelulósica está sendo considerada como um tratamento viável para a liberação de açúcares para a produção de etanol de segunda geração, no entanto existem alguns fatores limitantes na hidrólise enzimática do material pré-tratado. Em geral, há dois grupos de fatores: aqueles relacionados aos mecanismos e interações das enzimas celulolíticas e aqueles relacionados às características estruturais da lignocelulose. Este último grupo é considerado como principal limitante, entre estes fatores são considerados a acessibilidade à área superficial do substrato pelas enzimas, a estrutura e teor de lignina residual, o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o teor da hemicelulose e o volume de poros (SUN et al., 2016; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Não obstante, a magnitude de cada um destes fatores está relacionado aos diferentes pré-tratamentos utilizados (ZHANG; WU, 2014).

Neste sentido, a hidrólise enzimática dos materiais resultantes dos diferentes pré-tratamentos tem sido estudada, para encontrar uma relação positiva entre estas duas etapas. Um bom exemplo desta relação, foi obtido com bambu submetido a um tratamento por dois estágios, organosolv e alcalino. O pré-tratamento organosolv (2% m/m de H_2SO_4 em

75% m/m de etanol a 160 °C/30 min) foi seguido pela deslignificação alcalina variando o tipo de álcali (NaOH e CaOH₂) em concentração (10% e 20% m/m). Os resultados mostraram diferentes graus de cristalinidade nos materiais dependendo das condições do pré-tratamento. Quando o bambu pré-tratado foi hidrolisado enzimaticamente com celulase (15FPU/g de glucana) e β-glicosidase (30 UI /g de glucana) o rendimento de conversão de celulose se correlacionou inversamente com o índice de cristalinidade, assim 69,4% e 95,5% de sacarificação foram obtidos nos materiais com maior e menor índice de cristalinidade respectivamente após 48h de reação a 50°C e pH 4,8 com as enzimas (LI et al., 2012).

A pré-extração da hemicelulose por métodos químicos e enzimáticos de bagaço previamente pré-tratado num processo quimo-termomecânico (NaOH/Na₂SO₃; 5%/10% m/m) permitiu a remoção de lignina e xilana em diferentes níveis. Os materiais resultantes foram sacarificados com celulases comerciais (2.5FPU/g de glucana) e β-glucosidases (5UI/g de glucana). Os autores indicaram que a sacarificação foi influenciada pelo teor de lignina residual, assim os materiais com baixo teor de lignina (7%) apresentam valores de conversão de glucana de 72%, enquanto que para os outros materiais com alto teor de lignina (10-15%) porcentagens menores em torno de 25-45% de conversão foram atingidas (SPORCK et al., 2017).

A remoção de lignina é um fator muito relevante para a ação enzimática de celulases. Laurito-Friend et al. (2015) pré-trataram o bagaço de cana com solução sulfito-alcalino, usando diferentes concentrações de reagentes, e verificaram que a sacarificação da celulose dependeu da remoção deste componente. Por sua vez, Siqueira e colaboradores (2017) avaliaram tanto a ligação improdutiva das enzimas com as ligninas residuais como a acessibilidade das enzimas à celulose de biomassa pré-tratada. Para isto, amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram avaliadas por cinco tipos de pré-tratamentos (NaOH; NaOH/Na₂SO₃; H₂SO₄; NaHSO₃/H₂SO₄; Explosão a vapor/SO₂). Os resultados mostraram que as ligninas residuais nos bagaços resultantes dos pré-tratamentos à base de sulfito (sulfito alcalino e sulfito ácido) apresentaram menor capacidade de ligação às celulases, em comparação com as ligninas resultantes dos pré-tratamentos sem sulfito (alcalino e ácido) fato que foi atribuído à sulfonação da lignina. Por outra parte os bagaços pré-tratados por explosão a vapor e sulfito alcalino resultaram em substratos mais acessíveis, aproximadamente 82-92% da celulose foi hidrolisada usando altas cargas enzimáticas.

2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este trabalho surgiu em função da necessidade de se estudar alternativas para o melhor aproveitamento dos polissacarídeos presentes no bagaço de cana-de-açúcar e, fornecer formas de aumento de competitividade das indústrias sucro-alcooleiras. Alguns estudos de pré-tratamento sulfito-alcalino do bagaço de cana foram realizados por nosso grupo de pesquisa, obtendo-se materiais de alta hidrolisabilidade enzimática (MENDES et al., 2011). Em função da seletividade deste pré-tratamento para a deslignificação, cerca de 70% da hemicelulose permanecem no sólido residual. Por conseguinte, em uma produção anual de 180.000 toneladas de bagaço, 13.500 toneladas de hemiceluloses seriam dissolvidas no licor junto com a lignina, mas 31.500 toneladas ainda permaneceriam no sólido residual para serem utilizadas. A decisão de como extraí-las e recuperá-las é um tema complexo e ainda não totalmente explorado. A xilana extraída poderia ser recuperada e o resíduo, enriquecido em celulose, hidrolisado com celulasas o que geraria um licor de hidrólise essencialmente composto por hexoses. Considerando que a viabilidade econômica da produção de etanol 2G a partir de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino dependeria dessa utilização mais efetiva da xilana, este estudo foi realizado com o objetivo de integrar o pré-tratamento ao processo de extração de xilanas combinando tratamentos químicos e enzimáticos em sequência. Para isso, foi avaliado o pré-tratamento utilizando metade da carga de reagentes normalmente utilizados para tratar o bagaço de cana (MENDES et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar um tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar e avaliar seu efeito na extração de xilana e na sacarificação da celulose residual, visando descrever um novo processo que permita desenvolvimento de estratégias para potenciais aplicações biotecnológicas das frações da biomassa lignocelulósica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os rendimentos de extração dos principais componentes lignocelulósicos do bagaço de cana depois de cada etapa do tratamento sequencial.
- Obter e caracterizar as frações de xilanas extraídas do bagaço de cana através de processos alcalinos brandos e enzimáticos feitos sequencialmente.
- Comparar os graus de polimerização e substituição das frações de xilanas do bagaço de cana obtidas após cada etapa de extração.
- Avaliar o efeito da remoção de xilana sobre a eficiência da conversão do bagaço de cana tratado sequencialmente por métodos químicos e enzimáticos.
- Avaliar o rendimento de conversão da celulose e xilana em diferentes concentrações de sólidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho foi obtido da Usina Zilor/Lençóis Paulista/SP. O material foi ensacado e estocado à temperatura ambiente para a execução dos experimentos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO

A caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*” e pré-tratados foi realizada mediante hidrólise ácida de acordo com a metodologia descrita por Ferraz et al. (2000). Inicialmente, três gramas (massa seca) do bagaço foram submetidas ao processo de extração em um aparelho Soxhlet durante 6 horas, usando etanol 96%v/v como solvente, à temperatura de ebulição. Após a realização do procedimento de extração, o material foi seco em temperatura ambiente. Uma vez seco o material foi moído e passado por uma peneira de 25 mesh. Foram pesados 0,33 gramas do material (massa seca) dentro de tubos de ensaio e adicionou-se 3 mL de H₂SO₄ 72% p/p. Esta pré-hidrólise foi conduzida a 30°C em banho-Maria por 60 minutos, sendo homogeneizado o material a cada 15 minutos com a ajuda de um bastão de vidro. Transcorrido este tempo o conteúdo do tubo foi transferido a um Erlenmeyer e foram adicionados 79 mL de água destilada para obter uma concentração final de 4% p/p do H₂SO₄. A seguir está suspensão foi autoclavada a 121°C, 1 atm por 60 minutos.

Depois de resfriada a suspensão foi passada através de um filtro com uma placa porosa de vidro sinterizado N°3, previamente tarado. A fração sólida foi secada em estufa a 105°C até massa constante, para a determinação por gravimetria da lignina insolúvel. O líquido filtrado foi transferido para um balão de 200 mL e completado com água destilada até atingir o seu volume. O conteúdo do balão foi utilizado para a determinação das concentrações de açúcares monoméricos (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Empregou-se um cromatografo WATERS 2414 com detector de índice de refração a 35°C; a separação foi feita em uma coluna Bio Rad HPX87H a 45°C a um fluxo de 0,6 mL/min, usando ácido sulfúrico a 0,005 M de concentração como eluente. O teor de lignina solúvel foi medido por espectroscopia UV a 205 nm de comprimento de onda, utilizando para os cálculos a absorvidade de 105

L/g.cm nesse comprimento de onda (DENCE, 1992). O teor de lignina total correspondeu a soma da lignina insolúvel e solúvel.

O teor de cinzas presentes nos bagaços foi determinado transferindo aproximadamente 0,5 g de amostra para um cadinho de porcelana, previamente tarado e mantidos em mufla por 4 horas a temperatura de $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$. O processo de calcinação consistiu em aquecer a amostra a 105°C por 12 minutos, depois a uma temperatura de 250°C por 30 minutos e por último a uma temperatura de 575°C por 3 horas. Após resfriamento em dessecador, o material foi quantificado quanto ao teor de cinzas por gravimetria, a partir da diferença entre a massa inicial da amostra e a massa final da amostra calcinada (SLUITER et al., 2005).

4.3 TRATAMENTO SEQUENCIAL QUÍMICO-ENZIMÁTICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

O fluxograma completo com as etapas de todo o tratamento sequencial do bagaço de cana-de-açúcar é apresentado na Figura 6.

4.3.1 Etapa 1: Extração alcalina a frio (CAE)

A extração alcalina a frio (CAE) foi conduzida a temperatura de 25°C por 30 minutos com carga de álcali de 10% mNaOH/mBagaço . O meio reacional foi preparado na consistência de 15% em volume final de 400 mL. Foram pesadas 60 gramas de bagaço *in natura* (massa seca) em reatores de aço inox (volume de 1000 ml) e com auxílio de uma bomba de vácuo foi retirado o ar durante 30 minutos, para favorecer a impregnação do material com a solução alcalina. Sem desligar a bomba de vácuo, e com a ajuda de uma mangueira situada na tampa do reator, adicionou-se a solução de hidróxido de sódio e à partir desse momento foi levado em conta o tempo de reação. Após esta etapa, o material resultante foi filtrado sob vácuo através de uma tela de nylon colocada em um funil de Buchner. A fração líquida, denominada de Licor Alcalino-LA, foi coletada e armazenada a uma temperatura de 4°C . O sólido retido nomeado como polpa-P1 foi recolhido e armazenado a 4°C , para evitar problemas de contaminação, até a execução da segunda etapa. Uma amostra dos sólidos foi lavada até a neutralidade do filtrado e caracterizados quimicamente quanto ao teor de açúcares, acetil e lignina. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Figura 6 – Fluxograma geral do tratamento sequencial do bagaço de cana-de-açúcar.

Ao licor-LA foi adicionado etanol (95%) até uma concentração final de 30%v/v no licor. A solução foi homogeneizada com um bastão de vidro e em seguida deixada em repouso na geladeira à 4°C para a decantação do precipitado durante no mínimo de 16 horas (YAO et al., 2015). Terminado o tempo a solução foi centrifugada a 4000 g por 20 minutos para sua separação dos sólidos. O sobrenadante obtido foi removido e nomeado Licor Alcalino/Etanol (LAE). Inicialmente, foi determinada a quantidade de álcali residual no Licor-LAE mediante a medição do pH e, posteriormente foram adicionadas ao licor LAE a quantidade necessária de Na₂SO₃ para atingir a condições estabelecidas de pré-tratamento (5% Na₂SO₃) para a segunda etapa. Este licor foi nomeado de Licor Sulfito/Alcalino/Etanol (ASE).

4.3.2 Etapa 2: Pré-tratamento Sulfito alcalino com etanol (ASE)

A fração sólida, obtida após a extração alcalina a frio (polpa P1), foi então pré-tratada com o licor ASE. A polpa-P1 foi misturada com o licor de cozimento (ASE) em reatores de aço inox numa consistência de 10%*m/v*, posteriormente os reatores de aço inox foram fechados hermeticamente e autoclavados a 120°C por 2 horas. Finalizado o tempo da reação a fração sólida foi separada do licor por filtração a vácuo, sendo posteriormente o material sólido lavado com 2,5 L de água por cada 60 gramas de material, até que o pH do filtrado atingisse a neutralidade. A fração sólida foi nomeada como polpa-P2 e a fração líquida de licor negro (Figura 5). A polpa-P2 foi caracterizada quimicamente e o licor negro analisado quanto ao teor de açúcares, acetato, lignina e cinzas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.2 Etapa 3: Extração enzimática da hemicelulose remanescente

A polpa-P2 foi submetida ao tratamento enzimático com o preparado comercial Luminase PB-200 (Verenium) de uma endo-1,4-β-xilanase que atua entre 40-70°C e pH 5-8,5. Para esta etapa empregou-se 5UI da enzima Luminase por grama de polpa-P2. A reação foi conduzida em Erlenmeyers de 125 ml, com 2 gramas de material (massa seca) misturadas com tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 8 em volume final de 40 mL a temperatura de 50°C sobre agitação recíproca de 120 rpm. O material foi coletado 6 e 24 horas após o início da reação e em seguida foi fervido por 5 minutos para interromper a reação. Após resfriamento, o material foi filtrado a vácuo utilizando uma tela de nylon colocada em um

funil de Buchner. A fração sólida foi nomeada como polpa-P3 (Figura 6). A fração líquida foi estocada a 4°C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS COMERCIAIS DE XILANASES EM DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS

Foram avaliados os extratos comerciais de xilanases: Luminase PB 200 (Verenium) e Cellic Htec2 (Novozymes), empregando a polpa-P2 como substrato, na consistência de 5% (m/v). Foi avaliado o efeito da carga de xilanase (U/g polpa) sobre o rendimento de extração de xilana. Esses experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL de meio reacional, sob agitação recíproca de 120 rpm e temperatura de 50°C. Para o acompanhamento da reação amostras de 200 µL foram retiradas periodicamente até 48h e imediatamente aquecidos em banho de água fervente (100°C) por 5 minutos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior quantificação do rendimento de xilana e composição química. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, calculado sus desvios padrões e comparados com o teste Tukey com 95% de confiança no programa Sthatgraphics.

4.5 BALANÇO DE MASSA DO TRATAMENTO SEQUENCIAL

O rendimento de sólidos foi calculado para cada etapa do tratamento, relacionando-se a massa seca sem cinzas (em gramas) recuperada após o tratamento pela quantidade de massa submetida ao processo, segundo a equação 1.

$$RS = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

RS = Rendimento de sólidos (%)

W_f = Massa seca final obtida após o tratamento (g)

W_i = Massa seca inicial (g)

Também foi estimada quantidade removida de cada componente (xilana, glucana e lignina) do material durante cada etapa do tratamento sequencial químico-enzimático

(SQE). A porcentagem de remoção de cada componente foi estimada segundo a equação 2 onde,

$$R_c = 100 - \left(\frac{[W_{cf} \times RS]}{W_{ci}} \right) \quad (2)$$

Sendo:

R_c : Porcentagem de remoção de componente (%)

W_{cf} : Massa seca do componente presente no material tratado (g)

RS : Rendimento de sólidos (%)

W_{ci} : Massa seca do componente presente no material antes do tratamento (g)

A eficiência de tratamento SQE foi estimada relacionando a massa dos compostos não celulósicos (lignina e xilana) presente na biomassa antes e depois do tratamento.

$$Ef = 100 - \left(\frac{[W_{ci} - (W_{cf} \times RS)]}{W_{ci}} \right) \quad (3)$$

Sendo:

Ef : Eficiência do tratamento SQE (%)

W_{cf} : Massa seca dos compostos não celulósicos no material tratado (g)

RS : Rendimento de sólidos (%)

W_{ci} : Massa seca dos compostos não celulósicos no material antes do tratamento (g)

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE

A atividade de xilanase foi determinada nos extratos comerciais Luminase PB-200 e Cellic Htec2. As reações foram conduzidas em tubos de ensaio adicionando-se 0,9 mL de xilana *beechwood* 1% (preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 8 para o ensaio de Luminase e em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6 para a Cellic Htec2) e 0,1 mL de enzima propriamente diluída, incubados a 50°C por 5 minutos. Após o tempo de reação, adicionou-se 1,5 ml do reagente DNS (MILLER, 1959), interrompendo-se a reação hidrolítica, e em seguida o tubo foi fervido em banho-Maria à 100° C por 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. O controle da reação foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, a solução de DNS antes do extrato enzimático. Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de xilose foi construída para converter as absorbâncias medidas em teor de

xilose presente em solução (Figura 7). Os cálculos de atividade enzimática foram realizados através da equação obtida da curva de calibração considerando a diluição feita. Uma unidade (UI) de atividade enzimática corresponde a formação de 1µmol de açúcar redutor (expresso em xilose) por minuto (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992).

Figura 7 – Curva de calibração de xilose utilizada no cálculo da atividade da xilanase.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.7 RECUPERAÇÃO DAS HEMICELULOSES EXTRAÍDAS NO TRATAMENTO SEQUENCIAL

As xilanas extraídas após a extração alcalina a frio do bagaço, que ficaram dissolvidas no licor-LA, foram precipitadas pela adição de etanol (95%) até uma concentração final de 30%v/v, com o objetivo de recuperá-las. A solução foi homogeneizada com um bastão de vidro e em seguida deixada em repouso na geladeira à 4°C para a decantação do precipitado durante no mínimo de 16 horas (YAO et al., 2015). Após este tempo, a solução foi centrifugada a 4.000 g por 20 minutos para sua separação. O precipitado resultante foi congelado, liofilizado para secagem da amostra a qual foi nomeada como Xilana 1 (X-1). Cabe referir que este mesmo procedimento foi realizado na fração líquida obtida após a extração enzimática (Filtrado, Figura 6). A xilana aqui obtida foi nomeada como Xilana 3 (X-3).

A recuperação de xilana na precipitação foi calculada relacionando a massa de xilana recuperada após a precipitação em etanol e liofilização, com a massa de hemicelulose no material submetido ao tratamento de extração, de acordo com a equação 4

$$R_x = \frac{W_{xr}}{W_{xe}} \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

R_x = Recuperação de xilana (%)

W_{xr} = Massa seca de xilana obtida após a liofilização, determinada gravimetricamente (g)

W_{xe} = Massa seca de xilana presente no material antes do tratamento, determinada pela composição química (g)

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS

4.8.1 Cromatografia em camada fina

Com o intuito de conhecer o perfil dos xiloligossacarídeos presentes nas xilanas obtidas após a primeira (CAE) e segunda etapa (EEH) do tratamento sequencial do bagaço de cana foi feita uma separação por cromatografia em camada fina. Foram utilizadas placas de sílica gel 60 F254 (Merck), e como fase móvel empregou-se uma mistura de acetato de etila:ácido acético:propanol:ácido fórmico:água (25:10:5:1:15). A cuba cromatográfica foi preparada 30 minutos antes de iniciar a corrida. As amostras e mistura de padrões de xilose - Sigma-Aldrich e xilo-oligômeros - Megazyme (xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose) foram aplicados a 1 cm da parte inferior da placa mantendo uma distância de 1 cm entre cada amostra. A corrida foi conduzida a temperatura ambiente durante 1 hora e meia para garantir uma boa separação. Finalizado o tempo de corrida, a placa foi retirada e seca em estufa a 45°C aproximadamente por 5 minutos até que estivesse livre de solvente. A revelação das amostras foi realizada por aspersão da solução reveladora e seca em estufa a 100°C durante aproximadamente 5 minutos. A solução reveladora foi preparada dissolvendo 1,8 g de N-(1-Nafitil)-etilenodiamina-dihidrocloreto (Sigma) em 200 mL de etanol e, sob agitação constante, foram adicionados lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.8.2 Determinação da massa molar

As massas molares das xilanas foram determinadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), utilizando uma coluna (1cm X 65 cm) empacotada com uma resina de poliacrilamida Biogel P30 (Bio-rad), com faixa de separação de 2.500-40.000 g/mol,

equilibrada com o eluente, NaOH 0,01 M, pH 10 (SPORCK et al., 2017). As amostras de xilana foram dissolvidas no eluente em uma concentração de 10 mg/mL. O volume de injeção foi de 200 µL a um fluxo de 0,3 ml/min. Frações de 3 ml foram coletadas para determinação dos açúcares totais pelo método do fenol/ácido sulfúrico em espectrofotômetro a 490 nm. A coluna foi calibrada com soluções de xilose (180 g/mol), dextranas obtidas da Pharmacosmos com massas molares médias de 3.500 g/mol, 6.000 g/mol, 10.000 g/mol e 20.000 g/mol e azul de dextrana (2.000.000 g/mol). A curva de calibração foi construída correlacionando as diferentes massas molares de padrões com seus respectivos volumes de eluição (Figura 8). Os dados foram linearizados em uma equação de tipo $\text{Log}M = aV_e + b$, onde M é a massa e V_e o volume de eluição, a e b representam os coeficientes da equação.

Figura 8 – Curva de calibração da coluna Biogel P-30.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.8.3 Determinação dos açúcares

A composição de carboidratos das xilanas foi determinada seguindo a metodologia descrita por Sluiter et al. (2008) com pequenas modificações. As xilanas (X-1 e X-3) foram transformadas em monômeros por hidrólise em meio ácido. Foram pesados 10 mg de cada xilana e dissolvidas em 3 mL de água, em seguida se adicionou 10 µL de HCl concentrado com a finalidade de diminuir o pH da reação. Dependendo do valor de pH obtido, foi adicionado um volume de ácido sulfúrico a 72% (Tabela A.1.), para obter uma concentração final de 4% de H₂SO₄. Após a adição do ácido o volume final foi

ajustado para 5mL em balão volumétrico e finalmente transferidos para tubos de ensaio com tampa para serem autoclavados a 120°C/1 atm durante 60 minutos. Os monômeros (xilose, arabinose e glicose) liberados foram analisados em HPLC (WATERS) nas mesmas condições descritas na seção 4.2. Como controle foram utilizados 5 ml de uma solução de xilose a 0,15 g/L, autoclavada nas mesmas condições descritas anteriormente e comparada com uma amostra de xilose 0,15 g/L, que não foi autoclavada. A degradação da xilose aceita é de no máximo 5%.

4.8.4 Determinação de Lignina

A presença de lignina e cromóforos nas xilanas foi avaliada pelo espectro de absorção do UV/Vis. Para isso foi preparada uma solução de xilana 1 g/L, em pH 12 (0,01 M NaOH) para leitura. Foi feita uma varredura de absorção na faixa de 780 a 230 nm. Para o cálculo da concentração de lignina foi empregado o coeficiente de absorção específica da lignina do bagaço de cana-de-açúcar no comprimento de onda de 280nm [$a=23,88$ (g/L*cm), determinado por (GOUVEIA et al., 2009) na expressão que correlaciona a absorbância com a concentração.

4.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Após os tratamentos do bagaço, as polpas P2 e P3 foram submetidas à hidrólise enzimática. Os experimentos foram conduzidos em tubos eppendorff de 5 mL com volume reacional de 2 mL. Os ensaios foram realizados em diferentes teores de sólidos (5%, 10% e 15% (m/v)). O meio reacional foi preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida sódica 0,01% (m/v) e a polpa-P3, obtida após a extração enzimática da xilana da polpa P2. Como controle foi utilizada a polpa-P2 resultante do pré-tratamento ASE (meio sulfito alcalino etanol). Empregou-se o extrato enzimático Cellic cTec2 (Novozymes), na carga de 10 FPU/g de glucana. A reação foi conduzida em banho Maria a 50°C sob agitação recíproca de 120 rpm. A amostragem foi feita nos tempos de 3, 6, 8, 24 e 48h e imediatamente as amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos para interromper a reação. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 15 minutos. Os açúcares presentes no sobrenadante foram analisados por HPLC (WATERS), usando como

eluente 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min, com um detector de índice de refração a 35°C (WATERS 2414) e uma coluna BioRad HPX87H a 45°C. A conversão enzimática da celulose foi estimada como a relação entre a concentração de glucana obtida após a hidrólise enzimática e a concentração de glucana presente no substrato, de acordo com a equação 5:

$$CEC = \left(\frac{(C_G \times fc) \times V}{(W \times C)} \right) \times 100 \quad (5)$$

Sendo,

C_G : Concentração de glicose obtida na sacarificação (g/L)

fc : Fator de conversão de celulose em glicose (0.9)

V : volume de reação enzimática (L)

C : porcentagem de celulose na polpa P2 (% m/m)

W : massa seca da polpa P2 (g)

4.9.1 Determinação da Atividade de celulasas totais

A atividade de celulasas foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose, (1987) e de acordo com a equação 6. Uma unidade de papel filtro (FPU) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto, empregando como substrato o papel filtro Whatman n°1, na temperatura de 50°C.

$$FPU/ mL = \frac{0,37}{\text{Diluição de enzima que libera 2 mg de glicose}} \quad (6)$$

O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 μ mol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra e o tempo de reação. Várias reações com diferentes diluições enzimáticas foram conduzidas, para construir um gráfico que permitisse determinar a diluição de enzima que libera 2 mg de glicose. No gráfico 9 foi correlacionado o logaritmo das diluições com as massas de glicose liberadas nessas reações.

As reações foram conduzidas em tubos de ensaio de 30 ml contendo 1,0 ml de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), uma tira de 1 x 5 cm de papel de filtro Whatman

nº1 (aproximadamente 50 mg) e 0,5 ml de extrato enzimático (Cellic cTec2) nas diluições de 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400, os tubos foram mantidos em banho-maria a 50°C por 60 minutos. Após o período de reação, se adicionou 3 ml de reagente DNS e a mistura foi fervida durante 5 minutos a 100°C. Adicionou-se 20 ml de água destilada em todos os tubos, deixando em repouso durante 20 minutos, antes de realizar a leitura da absorbância a 540 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). O branco foi feito nas mesmas condições de reação substituindo o volume de enzima por tampão. Também foi feito um branco de enzima para cada diluição enzimática, para isto em tubos foram adicionados 1mL de tampão, 3mL de DNS e 0,5 mL de Enzima (respeitando a ordem); em seguida os tubos foram fervidos durante 5 minutos a 100°C. Após o tempo as amostras foram tratadas e lidas da mesma maneira que as reações enzimáticas. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva de calibração de glicose (MILLER, 1959)

Figura 9 – Gráfico para determinar a diluição de enzima que libera aproximadamente 2 mg de glicose.

Fonte: Arquivo pessoal.

A curva de glicose foi construída através da relação de massa de glicose em 0,5 mL (0,25, 0,5, 0,75, 1; 1,65, 2; 2,25 e 2,5 mg) e a absorbância a 540nm. Foram adicionados 0,5 mL da solução de glicose, 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 3 mL de DNS, em seguida a mistura foi fervida durante 5 minutos a 100°C. Depois do resfriamento dos tubos, foram adicionados 20 mL de água e medida a absorbância a 540 nm. O branco foi feito nas mesmas condições de reação substituindo o volume do padrão por tampão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA

No contexto das biorrefinarias o conhecimento da composição química da matéria prima, no caso a biomassa lignocelulósica (BLC), assim como sua organização estrutural é fundamental para a implementação dos processos que permitiram o aproveitamento de seus componentes. Glucana, lignina e hemicelulose são as frações principais da BLC, e se encontram em diferentes proporções dependendo do tipo de BLC. Na Tabela 5 apresentam-se os valores em porcentagem dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho.

Tabela 5 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Componente	% (m/m)
Glucana	39,3 ± 0,476
Xilana	20,9 ± 0,210
Arabinosil	2,0 ± 0,019
Acetila	3,4 ± 0,841
Lignina Solúvel	2,5 ± 0,031
Lignina Insolúvel	18,8 ± 0,039
Extrativos	1,8 ± 0,161
Cinzas	3,4 ± 0,609
Total	92

Fonte: Arquivo pessoal.

Os percentuais das principais frações foram de 21% de lignina, 39% de glucana e 26% de hemicelulose. Esta última fração foi considerada como a soma do teor de xilose, arabinose e grupos acetila. Os valores obtidos para cada componente encontram-se dentro das faixas reportadas na literatura para bagaços gerados pelas indústrias sucro-alcooleiras do estado de São Paulo e do Nordeste brasileiro (Glucana: 36,9-45,7%; Lignina:18,9-26,1%; Hemicelulose:25,6-29,6%; Extrativos: 3,32 -10.45% e Cinzas:1,14-5.96%) (GUILHERME et al., 2015; LAURITO-FRIEND et al., 2015; ROCHA et al., 2015). Em um conjunto de amostras de bagaço de cana foi observado que os teores máximos e mínimos dos principais componentes podem se alterar dependendo da variedade da cana-de-açúcar (MASARIN et al., 2011). Estas diferenças nos valores reportados estão relacionadas com fatores como o tempo de colheita, o tipo de cana ou mesmo com parte ou

região da planta da cana como expõe Costa e colaboradores (2013), que observaram variações de 40- 55%, 14-22%, e 21-27% de glucana, lignina e hemicelulose para a região da medula, de diferentes canas, entretanto para a região do córtex os valores foram de 40-44%, 20-22% e 25-28% de cada fração na devida ordem.

A recalcitrância da BLC tem sido largamente atribuída à lignina uma vez que limita a acessibilidade das enzimas celulolíticas (BATTISTA; BOLZONELLA, 2018; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012), embora a hemicelulose, em uma proporção menor, também esteja relacionada de alguma maneira com a resistência destes materiais à hidrólise enzimática (COSTA et al., 2013). Sendo assim ambos componentes limitam a sacarificação da celulose de tal forma que o conteúdo total destas duas frações pode ser um primeiro indicativo tanto para a seleção da BLC quanto para a implementação dos processos que permitam o seu fracionamento e o aproveitamento dos polissacarídeos constituintes (SIQUEIRA et al., 2011).

5.2 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA

A utilização eficiente das frações do bagaço de cana requer a separação dos seus componentes por meio de pré-tratamentos. Neste trabalho foram realizados processos sequenciais no bagaço de cana, no intuito de extrair a xilana. Foi avaliada uma extração alcalina a frio, seguido de um tratamento organosolv (sulfito/alcalino/etanol) e extração enzimática.

5.2.1 Extração alcalina a frio da xilana

A extração alcalina a frio é uma técnica utilizada para a remoção de hemicelulose, utilizando baixas temperaturas (20-40°C) e diferentes concentrações de NaOH. Quanto maior a carga alcalina maior a extração de hemicelulose, chegando a 62% de remoção de xilanas de polpas Kraft de eucalipto não branqueada com 70% m/m de NaOH (GOMES et al., 2015). Esta técnica foi vantajosa para a extração de hemicelulose de eucalipto, pois em baixas temperaturas a extração alcalina não atuou como etapa deslignificante, mas sim como um estágio específico para remoção de xilana.

Neste estudo empregou-se a extração alcalina a frio com a intenção de retirar uma parte da xilana do bagaço de cana *in natura* utilizando 10% de NaOH (m/m) a 25°C. Esta etapa gerou uma corrente líquida e sólida, nomeadas como Licor Alcalino-LA e polpa-P1,

respectivamente. A polpa-P1 foi caracterizada quimicamente e os valores percentuais obtidos são apresentados na Tabela 6.

O aumento em 5% no teor de cinzas observado está relacionado com o sódio residual do álcali adicionado ao tratamento, o qual foi descontado da massa total da polpa-P1 para uma comparação apenas dos componentes originais do bagaço e da polpa. Um comportamento similar foi observado na extração alcalina a baixa temperatura de eucalipto e bagaço de cana quando foram tratados com 70% $m_{\text{Eucalipto}}/m_{\text{NaOH}}$ e 110% $m_{\text{Bagaço}}/m_{\text{NaOH}}$ (CARVALHO et al., 2016).

Tabela 6 – Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção dos componentes do bagaço de cana antes e depois da extração alcalina a frio

Componentes	Composição g/100 g		Massa recuperada (g)	Remoção (%)
	<i>In natura</i>	Polpa P1		
Rendimento de sólidos	100	89	-	-
Glucana	$39,3 \pm 0,476$	$42,8 \pm 0,702$	38	3,3
Hemicelulose	$26,3 \pm 0,632$	$25,2 \pm 0,3681$	22,4	14,8
Xilana	$20,9 \pm 0,210$	$22,8 \pm 0,053$	-	-
Arabinosil	$2,0 \pm 0,019$	$2,4 \pm 0,201$	-	-
Acetila	$3,4 \pm 0,841$	Nd	-	-
Lignina total	$21,3 \pm 0,162$	$17,3 \pm 0,574$	15,38	27,8
Lignina Solúvel	$2,5 \pm 0,031$	$1,72 \pm 0,024$		-
Lignina Insolúvel	$18,8 \pm 0,039$	$15,2 \pm 1,401$		-
Extrativos	$1,8 \pm 0,161$	Na	-	-
Cinzas	$3,4 \pm 0,609$	$7,9 \pm 0,426$	7,0	-

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota: Nd. Não detectado.

Na. Não analisado.

O aparente enriquecimento da fração de glucana em relação ao bagaço *in natura* é consequência da solubilização parcial dos demais componentes estruturais após o tratamento a 25°C/30 minutos. A presença dos compostos alcalinos no meio reacional provoca o inchamento das fibras do material facilitando a difusão dos reagentes, e, por conseguinte o acontecimento das reações leva à solubilização de fragmentos de lignina e hemicelulose.

Os grupos acetila foram totalmente removidos do bagaço no tratamento alcalino e não foram detectados nas análises da polpa P1, podendo-se dizer assim que nas condições testadas de temperatura (25°C), tempo de reação (30 minutos) e concentração de álcali (10% m_{NaOH}/m_{Bagaço}) foram suficientes para quebrar as ligações éster que mantêm unido o ácido acético à cadeia de xilana, obtendo assim a desacetilação total do bagaço. Em amostras de palha de trigo tratadas em condições tanto similares quanto maiores de temperatura, tempo e concentração de álcali também não foram detectados grupos acetila (GARCÍA et al., 2013).

A Tabela 6 também apresenta o balanço de massa para esta primeira etapa do tratamento SQE. Cabe referir que os valores da composição da polpa estão correlacionados com o rendimento de sólidos obtido nesta etapa, o qual foi de 89%. As condições operacionais da extração alcalina a frio permitiram a preservação da fração de glucana, sua solubilização foi pequena (3,4%). Na parede celular das gramíneas há glucanas mistas, cuja cadeia principal é constituída por monômeros de D-glicose unidas entre si por ligações β -1,4 e β -1,3, sem ramificações. É provável que a solubilização observada de glicose provenha deste tipo de estruturas e não das cadeias de celulose (EBRINGEROVÁ, 2006). Carvalho e colaboradores (2016) também não observaram mudanças nas percentuais do conteúdo de glucana a temperaturas baixas de reação (20-40°C), porém em outro trabalho do mesmo autor ao aumentar a temperatura de reação (175°C), a solubilização da glucana aumentou para 10% quando 100 gramas de bagaço foram tratadas com 10% m/m de NaOH (CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016). Como é referido na literatura, nos tratamentos alcalinos os polissacarídeos são conservados e sua degradação é resultado das reações de *peeling* que somente iniciam no terminal redutor em altas temperaturas (100°C), de modo que a redução da massa molar destes polissacarídeos a baixa temperatura não é tão rápida.

É evidente que nesta primeira etapa a maior porcentagem de remoção foi na fração da lignina, 28% do conteúdo original foram solubilizados. Em meio alcalino a despolimerização desta estrutura é principalmente devido à clivagem da ligação éter do carbono alfa como consequência da desprotonação do grupo hidroxila de tipo fenólico, os quais se encontram em pequenas quantidades dentro da molécula (FENGEL; WEGENER, 1989). Assim, a remoção de lignina em presença apenas de álcali é menor quanto comparada à sua remoção na presença, por exemplo, de sulfito. A remoção de grandes quantidades de lignina não era o alvo desta primeira etapa do processo, e sim recuperar xilanas com maiores graus de polimerização.

Levando em consideração os teores de xilose, arabinose e ácido acético, o bagaço continha originalmente 26,3% de hemicelulose; após a extração a polpa-P1 gerada possuía 25,5% desta fração (Tabela 6), assim a remoção desta fração nesta etapa foi de 15%. Ao contrário da fração de Glucana, a sua solubilização foi maior, em parte graças a sua estrutura amorfa que torna mais susceptíveis as diferentes ligações para reagir com o álcali em condições mais brandas de processo.

Em meios alcalinos a solubilização de lignina e hemicelulose parecem estar condicionadas com as variáveis do processo como a temperatura, a carga de álcali e tempo de reação, obtendo assim diferentes porcentagens de remoção, de modo que quanto maiores sejam estas variáveis maiores serão as porcentagens de solubilização das frações de hemicelulose e lignina (Figura 10). Em comparação com dados da literatura, a remoção de lignina e hemicelulose do bagaço de cana foi bem inferior. A Figura 10A mostra a faixa de remoção de lignina (37-74%) e de hemiceluloses (52-67%) obtidos em outros estudos de extração alcalina a frio (CARVALHO et al., 2016; XU et al., 2006). No entanto, é importante ressaltar que a carga de álcali utilizada nesses trabalhos foi muito maior, assim como os tempos de reação foram mais longos.

Figura 10 – Porcentagens de remoção de hemicelulose e lignina em diferentes concentrações de álcali (expressados em %m_{NaOH}/m_{Bagaço}), temperatura e tempo de reação.

Fonte: a: Dados próprios.

b: Carvalho et al. (2016)

c: (XU et al., 2006)

d: Siqueira et al. (2017)

e: Mendes et al. (2011)

f: Carvalho, Queiroz e Colodette (2016)

Nota: A: Temperaturas baixas

B: Temperaturas altas.

O padrão de solubilização em baixa temperatura (Figura 10A) com alta carga de álcali mostra uma relação de remoção aproximadamente de 1:1 hemicelulose/lignina, fato que poderia ser considerado como um indicador tanto da baixa seletividade para a remoção de hemicelulose, como da contaminação das hemiceluloses extraídas. As ligações α -1,2 das cadeias laterais (arabinose) da xilana assim como as ligações éster (acetil) são mais instáveis que as ligações C-C da macromolécula da lignina, portanto a taxa de clivagem destas ramificações pode ver-se favorecida pelo incremento na carga de álcali, promovendo uma maior solubilização da hemicelulose. Maiores porcentagens de remoção de lignina em altas concentrações de álcali e baixas temperaturas também podem ser atribuídos as rupturas das ligações éster entre o ácido ferúlico e as hemiceluloses e lignina (PENG et al., 2009). Um efeito maior na remoção de lignina e hemiceluloses pode ser apreciado melhor quando a consistência do sistema reacional é baixa (XU et al., 2006), pois é esperado que nesta condição a difusão dos reagentes seja favorecida.

A remoção das frações de lignina e hemiceluloses no processo alcalino a frio, em baixa concentração de álcali seguiu o mesmo padrão observado em condições de altas temperaturas ($>100^{\circ}\text{C}$), no entanto os valores de remoção dos componentes foram um pouco inferiores (Figura 10B). Em altas temperaturas e cargas de álcali um pouco maiores (175°C e 10-15% mNaOH/mBagaço) se observa maior seletividade para a remoção da fração de lignina.

5.2.2 Pré-tratamento alcalino/sulfito/etanol (ASE)

Esta etapa teve como objetivo obter um sólido enriquecido em xilana e celulose, como consequência da remoção da lignina remanescente no material tratado pelo processo de extração alcalina a frio. Para isto ao licor LAE, contendo um residual de 2,5% (m/m) de NaOH e 30%v/v de etanol, foi adicionado sulfito de sódio 5% (m/m). Essa solução foi utilizada no tratamento da polpa-P1 a 120°C / 2 horas visando obter um material estruturalmente menos recalcitrante e mais poroso, a fim de melhorar na difusão das enzimas na etapa seguinte do processo. A fração sólida resultante, nomeada como polpa-P2, foi caracterizada quimicamente e os resultados são apresentados na Tabela 7. O rendimento de sólidos alcançado nesta segunda etapa foi de 73%, ou seja, 24 pontos percentuais a menos se comparado ao pré-tratamento quimiomecânico conduzido com as mesmas condições de carga de reagentes, temperatura e tempo de reação; porém sem etanol (LAURITO-FRIEND et al., 2015). Este resultado indica uma maior solubilização

dos componentes da biomassa, provavelmente pela presença do etanol no licor de cozimento. Este valor de rendimento obtido também foi um pouco menor do que a faixa de rendimentos reportados para bagaços de cana-de-açúcar (74-82%) submetidos a pré-tratamentos quimiomecânicos com o dobro de carga de sulfito e álcali (5%NaOH /10%Na₂SO₃), sem etanol (MENDES et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2017; SPORCK et al., 2017).

Tabela 7 – Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção dos componentes da polpa-P1 antes e depois do tratamento ASE.

Componentes	Composição g/100 g		Massa recuperada (g)	Remoção (%)
	Polpa-P1	Polpa-P2		
Rendimento de sólidos	100	73	-	-
Glucana	42,8 ± 0,70	53,9 ± 0,854	39,3	8,06
Hemicelulose	25,2 ± 0,368	28,5 ± 0,459	20,8	17,4
Xilose	22,8 ± 0,05	26,0 ± 0,60		-
Arabinose	2,4 ± 0,20	2,5 ± 0,158		-
Acetila	Nd	Nd	-	-
Lignina total	17,3 ± 0,57	6,5 ± 0,902	4,75	72,5
Lignina Solúvel	1,72 ± 0,02	0,3 ± 0,019		-
Lignina Insolúvel	15,2 ± 1,40	6,2 ± 0,945		-
Extrativos	Na	Na	-	-
Cinzas	7,9 ± 0,42	9,2 ± 1,901	7,0	-

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota: Nd. Não detectado.

Na. Não analisado.

Segundo com o balanço de massa elaborado correlacionando as composições químicas das polpas P1 e P2 (Tabela 7), em relação com a fração dos polissacarídeos constatou-se uma remoção de 8% de glucana e 17% de hemicelulose. Nesse sentido pode se dizer que o pré-tratamento sulfito alcalino na presença de etanol não somente favorece a deslignificação do material, mas também apresenta menor perda de hemicelulose em comparação aos outros pré-tratamentos (SUN et al., 2016). A xilana removida nesta etapa não foi precipitada para sua recuperação, devido a sua alta contaminação com lignina (SPORCK et al., 2017).

Até esta etapa aproximadamente 30% da hemicelulose e 80% da lignina original do bagaço foram removidas e apenas 10% de glucana, sendo parte dela provavelmente de origem não celulósica. Esse resultado de baixa remoção de hemiceluloses pelos métodos químicos empregados, sugere que a hemicelulose residual parece ser muito difícil de extrair, e provavelmente seja aquela hemicelulose que se encontra situada na parte mais interna das microfibrilas de celulose, e entre as cadeias de glicose que formam as fibrilas elementares. Ainda na Tabela 7, observa-se 73% de remoção de lignina, valor que é significativamente maior do que as faixas de remoção de lignina (43-66%) reportadas em condições de ensaio com o dobro da carga de reagentes ($5\%m_{NaOH}/m_{Bagaço}$ e $10\%m_{Na_2SO_3}/m_{Bagaço}$), na ausência de etanol, porém seguido de um etapa de refino (Figura 11) (LAURITO-FRIEND et al., 2015; MENDES et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2017).

Figura 11 – Porcentagens de remoção de hemicelulose e lignina dos bagaços pré-tratados a 121°C em diferentes concentrações de álcali (NaOH), sulfito (Na_2SO_3) e tempo de reação.

Fonte: a. Dados próprios.

b. Laurito-Friend et al. (2015)

c. Siqueira et al. (2017)

d. Mendes et al. (2011)

e. Sporck et al. (2017)

Notas: (*) Sem refino.

Concentrações dos reagentes estão expressados em $\%m_{reagente}/m_{Bagaço}$.

Uma explicação para o efeito positivo da adição de etanol ao tratamento sulfito alcalino possa ser a redução da tensão superficial do licor de cozimento e por conseguinte o favorecimento da penetração dos reagentes para dentro da estrutura do material (BU et al., 2012). É um fato que a adição de sulfito permitiu aumentar a solubilização tanto da hemicelulose quanto da lignina. O ataque nucleofílico dos íons sulfito sobre o carbono β

além de fracionar a estrutura da lignina, permite a sua sulfonação melhorando a sua solubilidade no meio alcalino. Estes fragmentos de lignina são denominados como lignosulfonatos (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). A ruptura das ligações β -O-4, é a mais importante para a despolimerização da macromolécula pois são as mais abundantes, trazendo como consequência uma maior solubilização da mesma. Embora a fragmentação da lignina possa acontecer pela ruptura tanto das ligações α -éter quanto β -éter. De acordo com Mesa e colaboradores (2011) a combinação do solvente orgânico etanol, com o hidróxido de sódio aprimorou a capacidade de deslignificação do etanol e a seletividade pela lignina por parte do álcali, fato que pode ser observado pela diferença na relação xilana:lignina removidas.

A composição química do licor obtido após o tratamento ASE foi avaliada quanto ao teor de açúcares e lignina. (Tabela 8). Visando a sustentabilidade do processo os compostos do licor negro poderiam ser recuperados e reutilizados. No caso do solvente, sua recuperação pode ser realizada por destilação, enquanto que a lignina pode ser também recuperada por precipitação em meio ácido. A partir do pH 9,5 esta começa a precipitar, mas no pH 4 precipita completamente, embora na presença do solvente orgânico a precipitação não seja tão eficiente (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010; ZHANG; PEI; WANG, 2016).

Tabela 8 – Componentes determinados no licor negro (LN) gerado após o pré-tratamento alcalino/sulfito/etanol.

Componentes	Concentração
Lignina	24,46 g/L
Glicose	0,54 g/L
Xilose	4,14 g/L
Arabinose	1,6 g/L
Acetil	3,46 g/L
Cinzas	20 g/L

Fonte: Arquivo Pessoal.

A lignina presente no licor pode ser aproveitada de diversas maneiras (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). Nas usinas, hoje em dia, a lignina é utilizada para a co-geração de energia, porém em uma biorrefinaria esta fração deve ser usada como matéria prima para gerar produtos de maior valor agregado, junto com a fração de polissacarídeos. A valorização da lignina tem um papel muito importante na viabilidade das futuras

biorrefinarias segundo estudos tecno-econômicos realizados a esse respeito (DAVIS et al., 2013). Vardon et al. (2015) reportaram seu uso como fonte de carbono para o cultivo de *Pseudomona putida* KT2440 modificada metabolicamente, em fermentações em batelada alimentada. A lignina obtida de um pré-tratamento alcalino com antraquinona, foi convertida em cis cis-muconato, o qual é transformado em ácido adípico por hidrogenação. Este ácido tem um volume de mercado de 2,6 milhões de toneladas por ano tornando-se o ácido dicarboxílico mais importante comercialmente. Ele é usado como um precursor de polímero para a fabricação de nylon, plastificantes, lubrificantes e polióis de poliéster.

No licor ASE, a lignina está predominantemente na forma de lignosulfonatos, os quais não se precipitam facilmente. Assim como a lignina, os lignosulfonatos podem ter várias aplicações, por exemplo como emulsificante de pesticidas, produtos químicos no campo de óleo, auxiliares de tingimento e acabamento para têxteis (BU et al., 2012; CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

5.2.3 Extração enzimática da xilana remanescente

Esta etapa teve como objetivo extrair a xilana remanescente do bagaço de cana para obter outros produtos que permitam a sua valorização sem contudo, ocasionar grande perdas de celulose. Com esse intuito, realizaram-se ensaios enzimáticos incubando a xilanase comercial (Luminase) na polpa-P2 por 6 h ou 24 h. As condições do ensaio foram 5UI/g de polpa, em pH 8 e na consistência de sólidos de 5%*m/v*. Os dados da composição química das polpas-P3 obtidas depois dos tratamentos enzimáticos por 6 horas (polpa-P3-6) e por 24 horas (polpa-P3-24) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Caracterização das polpas P3 geradas após os tratamentos enzimáticos em diferentes tempos de reação.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA (% <i>m/m</i>)						
	Lignina	Glucana	Xilose	Arabinose	Acetil	Cinzas
Polpa-P3-6	5,7 ± 0,13	61,3 ± 0,35	24,3 ± 0,36	2 ± 0,13	Nd	2,8 ± 0,20
Polpa-P3-24	7,7 ± 0,41	61,2 ± 0,55	22,5 ± 0,25	1,6 ± 0,184	Nd	3,1 ± 0,20

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota: Nd: Não detectado.

Verifica-se que o teor de glucana praticamente não variou, apresentando uma média de 61,25%, enquanto que o teor de hemicelulose (xilose + arabinose) apresentou uma pequena variação (24,1 a 26,3%), diminuindo com o aumento do tempo de hidrólise. A variação da lignina entre as polpas P3-6 e P3-24 foi de 2 pontos percentuais. As cinzas também tiveram um pequeno aumento entre as polpas.

O balanço de massas em relação às principais frações desta etapa é apresentado na Tabela 10. O rendimento de sólidos desta etapa foi de 81% após as 6 horas de reação. Correlacionando os valores da composição química com o rendimento de sólidos obtidos constatou-se uma remoção de 26% de hemicelulose em base a composição da polpa-P2, evidenciando que a clivagem das cadeias de xilana foi insuficiente para atingir a remoção total da xilana residual. Rendimentos similares de 30% e 22% de extração de xilanas foram atingidos usando 8UI/grama de material, durante 24 horas, em bagaços pré-tratados lavados e não lavados, respectivamente (SPORCK et al., 2017). Neste caso, os bagaços de cana foram pré-tratados com 5%*m/m* de NaOH e 10%*m/m* de Na₂SO₃, seguido de refino. Concomitantemente à hemicelulose, observou-se a remoção de 8% de glucana e de 29% de lignina, esta última está relacionada com a remoção da xilana graças as interações químicas entre elas, mesmo que o processo não esteja orientado para a sua solubilização.

Visando em remover maior quantidade de hemicelulose, o tempo de reação enzimática foi estendido para 24 horas. Ao aumentar o tempo de extração observou-se que houve maior remoção de xilana (47%), porém 23% da glucana também foi solubilizada. Embora, a quantidade de xilana solubilizada tenha aumentado quando comparada com a extração durante 6 h, constatou-se que ainda ficou uma parte dela no material. Certamente, a hidrólise da biomassa via enzimática envolve um complexo processo de reação catalítica sólido-líquido de duas fases, o qual deve ser precedido pela adsorção da enzima na fase líquida no substrato insolúvel para ser catalisado (DUTTA; CHAKRABORTY, 2015), fato que aumenta a complexidade do processo tornando difícil a obtenção de altos rendimentos de extração de xilana sem a solubilização de outros compostos. O uso de enzimas auxiliares poderia ser uma tentativa para melhorar as porcentagens de remoção sem afetar tanto a fração de glucana. Goldbeck et al., (2016), a partir de substratos com alto teor de lignina (28.8% de lignina e 19.9% de hemicelulose) e baixo teor de lignina (2,1% lignina e 35,7% de hemicelulose) conseguiram 21,36 % e 55,35% de conversão de hemicelulose usando endo-xilanase e feruloil esterase a 50°C durante 48 horas, respectivamente.

A limitada acessibilidade ao substrato por outros fatores além da composição química, também podem diminuir as taxas de hidrólise. Ao analisar o rendimento da

extração em função da velocidade de agitação, num processo de extração com álcali de xilanas a partir de polpas kraft branqueadas, a tendência foi o aumento do valor do rendimento (65,4-78,3%) com relação ao aumento da velocidade de agitação (75,2-84,3%), evidenciando-se a influência da efetiva homogeneização do material sobre a extração da xilana (MARQUES, 2014). A interação improdutiva das enzimas ao substrato é outro fator muito discutido e quase incontornável a se levar em conta para atingir altos rendimentos de extração (ZHANG; WU, 2014). Porém, este efeito não foi considerado relevante nos baixos rendimentos de extração obtidos neste estudo, isto porque o material de partida para esta etapa (polpa-P2) apresentava um baixo teor de lignina residual (6,5%), que se encontra sulfonada como consequência do pré-tratamento, reduzindo assim a sua capacidade de ligação com as proteínas como consequência das cargas negativas (SIQUEIRA et al., 2017); A explicação mais provável para os resultados de extração enzimática da xilana está na baixa acessibilidade das xilanases ao substrato. As enzimas devem hidrolisar as hemiceluloses que estão na superfície do material, mas não conseguem alcançar as hemiceluloses residuais que se localizam entre a estrutura organizada das fibrilas de celulose. Assim a celulose tem que ser levada em consideração como a barreira física limitante dentro da extração de hemicelulose.

Tabela 10 – Balanço de massa da etapa de extração enzimática com Luminase do tratamento sequencial químico enzimático.

Polpas	RS (%)	COMPOSIÇÃO g/g 100 Polpa			COMPOSIÇÃO g/g 100 P2			REMOÇÃO (%)		
		Lignina	Glicose	Xilose	Lignina	Glicose	Xilose	Lignina	Glicose	Xilose
P2	100	-	-	-	6,5	53,85	28,45			
P3-6	81	6	61	26	4,6	49,43	21,18	29	8	26
P3-24	68	7,7	61,2	24	5,3	41,59	16,32	19	22,8	42,7

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: P2. Polpa obtida após do pré-tratamento ASE.

P3-6. Polpa obtida após da extração enzimática por 6 horas.

P3-24. Polpa obtida após da extração enzimática por 24 horas.

5.3 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS COMERCIAIS DE XILANASES EM DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS

Com o objetivo de comparar a eficiência do extrato enzimático Luminase com o extrato Cellic Htec2, foram conduzidos experimentos de extração de xilana empregando

5% (m/v) de Polpa P2 como substrato. A Luminase possui alta atividade de endo-xilanase em pH 8, porém o coquetel enzimático Cellic Htec2 atua melhor em pH 6 e além da endo-xilanase este extrato contém, Endoglucanase, Celobiohidrolase, β -glicosidase (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividades enzimáticas das enzimas comerciais utilizadas.

	Endo-xilanase	β -xilosidase	Endoglucanase	Celobiohidrolase	β -glicosidase
Luminase	26468 UI/mL	-	-	-	-
Cellic Htec2	10733 UI/mL	157 UI/mL	850 UI/mL	28 UI/mL	7,1 UI/mL

Fonte: Arquivo pessoal.

Em geral, a presença de diferentes enzimas melhora o desempenho das endo-xilanases nas hemiceluloses e, para verificar este efeito foi necessário estudar a carga das enzimas. A Figura 12 apresenta a cinética de liberação de xilana observada em cada condição avaliada. Nas figuras 12A e 12B podem-se observar que a remoção de xilana aumentou em função da carga da enzima no decorrer do tratamento ao utilizar tanto a enzima Luminase como o coquetel enzimático Cellic Htec2. Verifica-se que o comportamento foi semelhante entre os dois extratos nas duas primeiras cargas (5 e 50 UI/g), mas na carga de 500 UI/g observa-se um melhor desempenho especialmente nos ensaios com Cellic Htec2, sendo alcançado uma máxima remoção de xilana de 57% e 77% em 48 horas de reação com Luminase e Cellic Htec2, respectivamente.

Todas as cargas enzimáticas avaliadas apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nas porcentagens de remoção de xilana ao longo do tempo para os dois extratos comerciais testados (Figura 12C e Figura 12D). Entretanto, para o extrato Luminase os dados indicam que em cargas altas de enzima (500UI e 1000UI) a diferença na xilana solubilizada não é significativa ($p \geq 0,05$) independentemente do tempo de reação, mostrando um aumento de remoção entre as cargas em média de 10% (Figura 12C). Estes resultados sugerem que uma parte da xilana residual após o pré-tratamento ASE não foi acessível para as xilanases do extrato Luminase, que diferentemente do Cellic Htec2, não apresenta outros tipos de enzimas que pudessem ajudara com a desestruturação do material. Este aspecto pode ser corroborado com os resultados obtidos com a carga mais alta de enzima Cellic Htec2 (500 UI/g), tanto para remoção de xilana (Figura 12B) como para a liberação de glicose (Figura 13), uma vez que foi observada uma remoção de 56% e 76% de xilana em 24h e 48h, respectivamente (Figura 12B). Nesses mesmos tempos a conversão de glicose correspondeu a 54% e 77%. Nas menores cargas enzimáticas do

extrato Cellic Htec2, a conversão de glicose foi baixa, sendo observado em 48 h de reação os valores de 2% (com 5 UI/g) e 15% (com 50 UI/g) (Figura 13).

Figura 12 – Remoção de xilana da polpa-P2 utilizando os dois extratos enzimáticos em diferentes cargas de xilanases.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: A Extração de Xilana utilizando Luminase
 B Extração de Xilana utilizando Cellic Htec2
 C Extração de Xilana utilizando Luminase
 D Extração de Xilana utilizando Cellic Htec2

De forma geral, verifica-se que o aumento na carga de Cellic Htec2 resultou em um incremento na remoção de xilana (Figura 12B). Este aumento observado está relacionado com a remoção de celulose pelas celulasas presentes neste coquetel enzimático, pois à medida que a celulose é hidrolisada pelas celulasas, novas cadeias de hemicelulose são deixadas expostas. No entanto efeito positivo na extração da xilana

observado na carga de 500UI não foi tão acentuado nas cargas menores devido a que a quantidade de celulases presentes é menor (Figura 13).

Figura 13 – Conversão de celulose da polpa-P2 utilizando diferentes cargas de Cellic Htec2.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos de remoção de xilana em 48 h de reação da polpa-P2 com os extratos enzimáticos Luminase e Cellic Htec2. A extração enzimática da xilana residual com cargas enzimáticas na faixa de 5UI-50UI não apresentou diferenças significativas entre os tipos de extratos enzimáticos testados, de tal modo que para atingir a solubilização total da fração de xilana é necessária a hidrólise parcial da celulose.

Figura 14 – Gráfico de interações entre as cargas enzimáticas 5UI, 50UI e 500UI dos dois tipos de extratos comerciais enzimáticos utilizados.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 ANÁLISE DO TRATAMENTO SEQUENCIAL QUÍMICO-ENZIMÁTICO

De posse dos balanços de massa de cada etapa do tratamento sequencial químico-enzimático (SQE) foram calculados os rendimentos de sólidos, os quais foram de 89% e 65% para a primeira e segunda etapas químicas e 52% e 44% para a etapa de extração enzimática em 6 h e 24 h, respectivamente (Tabela 12). A diminuição observada no rendimento é coerente uma vez que, as condições de temperatura, tempo de reação e reagentes usados em cada etapa, favoreceram o acontecimento de determinadas reações que levaram a remoção dos componentes estruturais do bagaço.

Tabela 12 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar nas diferentes etapas do tratamento.

	RS* (%)	COMPOSIÇÃO g/ 100 g Polpa			COMPOSIÇÃO g/ 100 g Bagaço		
		Lignina	Glucana	Xilana	Lignina	Glucana	Xilana
Bagaço	100	-	-	-	21,3	39,3	26,3
Polpa-P1	89	17,3 ± 0,57	42,8 ± 0,70	25,2 ± 0,368	15,3	38,0	22,3
Polpa-P2	65	6,5 ± 0,90	53,9 ± 0,85	28,5 ± 0,459	4,2	34,7	18,4
Polpa-P3-6	52	5,7 ± 0,01	61,3 ± 0,35	26,3 ± 0,471	3,0	31,9	13,7
Polpa-P3-24	44	7,7 ± 0,41	61,2 ± 0,55	24 ± 0,392	3,4	26,8	10,5

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: RS*: Rendimento sequencial de sólidos

Xilana: Calculada considerando a soma dos teores de xilose, arabinose e ácido acético.

Considerando o tratamento sequencial completo, mas em 6 horas de reação com Luminase, verifica-se ao final do processo que 48% da xilana foi removida do bagaço de cana com a solubilização de apenas 19% da fração de glucana, mostrando que as condições operacionais do processo permitem uma boa preservação desta fração. Com respeito à lignina 86% desta fração foi removida, diminuindo assim a recalcitrância do material o que é vantajoso para a etapa subsequente de sacarificação da celulose residual, pois como já foi mencionado a lignina se apresenta como uma barreira física que limita a hidrólise enzimática dos polissacarídeos (WEI; WU; XU, 2016). Num estudo realizado observou-se como a hidrólise direta dos bagaços de cana de híbridos com baixo teor de lignina (16,8-18,6%) apresentaram porcentagens de 25-35% na conversão enzimática de celulose após 72 horas de reação com celulasas comerciais, porém a conversão aumentou para 80% quando o material foi deslignificado quimicamente usando cloreto de sódio em meio ácido,

reduzindo a 10% o teor de lignina (MASARIN et al., 2011). Deste modo a remoção da lignina e a hemicelulose aumenta a porosidade do material, diminuindo assim a recalcitrância do material em termos de maior acessibilidade das celuloses para a sacarificação. Quimicamente a polpa-P3 resultante da última etapa do tratamento SQE apresentou condições favoráveis para a etapa da sacarificação da glucana residual, isto é baixo teor de lignina (5,7-7,7%), e alto teor de glucana (61%).

Além dos aspectos econômicos um dos fatores que facilita a tomada de decisões na implementação de determinado processo em escala industrial é a eficiência do mesmo. Neste estudo a eficiência do tratamento foi calculada em função da remoção dos componentes não celulósicos durante todo tratamento SQE, a qual foi de 65% quando a extração enzimática se realizou em 6 horas, porém ao aumentar o tempo de extração para 24 horas a eficiência foi de 71%. Em termos apenas da hemicelulose, fração de interesse, o tratamento SQE tem uma eficiência de 15% para a primeira etapa, 17% para a segunda etapa e entre 26%-43% para a terceira etapa em 6 h ou 24 h, respectivamente. Sabendo que o controle e identificação de falhas de operação podem ser detectadas mediante o seguimento deste parâmetro, pode se dizer que a otimização das condições das duas primeiras etapas deveria ser considerada como alvo para melhorar a eficiência do tratamento. No caso da extração alcalina a frio, a otimização das variáveis tempo e temperatura seria de fundamental importância para aumentar a remoção de hemicelulose. De fato, os trabalhos de Carvalho et al. (2016) e Xu et al. (2006) mostram uma maior influência da variável tempo do que a carga de reagentes na remoção de xilana nos processos de extração alcalina a frio. Analisando a segunda etapa do tratamento, verifica-se que houve uma remoção expressiva de hemiceluloses (15%) e de glucanas (9%). As condições do pré-tratamento empregaram uma carga de reagentes relativamente moderada (5% de sulfito/2,5% de NaOH/etanol 30% v/v), mas o tempo de tratamento a 120°C foi bem longo (2 horas), de maneira que a diminuição do tempo de pré-tratamento dentro do tratamento SQE pode ser considerada para evitar a perda das xilanas, desde que mantendo a mesma remoção de lignina. Desta forma, o processo pode tornar-se mais atrativo tanto ambiental como economicamente ao reduzir o consumo de energia. Essa hipótese está baseada nos resultados obtidos por Mendes et al. (2013) que trataram o bagaço de cana com sulfito alcalino (10% de sulfito/5% de NaOH) em diferentes tempos (30, 60 e 90 minutos, a 120°C) e mostraram remoção de 50% de lignina em 30 minutos de tratamento atingindo apenas 66% de remoção em 90 minutos reação, enquanto a remoção de xilana e glucana se mantiveram constantes em todas as condições de pré-tratamento. Em outro pré-

tratamento de bagaço com etanol e ácido acético conduzido em relação sólidos/líquido de 1:8 em diferentes tempos na faixa de 60-90 minutos, os autores indicaram que o tempo não foi a variável que mais influência no processo, uma vez que nem a deslignificação nem a remoção de hemicelulose aumentaram significativamente após 60 minutos de reação (ZHANG; WU, 2014).

As frações não celulósicas obtidas em cada etapa do tratamento SQE (Figura 15) podem ser utilizadas para a fabricação de produtos de valor agregado. Nos trabalhos de Farhat et al. (2017) e Calvo-Flores e Dobado, (2010) pode ser encontrado um resumo das potenciais aplicações para as hemiceluloses e a lignina. O tratamento SQE proposto neste estudo possibilita a recuperação do 69-75,3% do total da hemicelulose solubilizada ao utilizar métodos de isolamento como a precipitação com solventes orgânicos nas frações líquidas geradas nas etapas de extração alcalina a frio e extração enzimática e, a partir do Licor Negro (fração líquida gerada após o pré-tratamento) pode ser recuperada 60% do total da lignina solubilizada durante o tratamento SQE. As hemiceluloses solubilizadas no licor negro não foram prospectadas para sua recuperação, devido a sua alta contaminação com lignina (SPORCK et al., 2017).

Figura 15 - Esquema do tratamento sequencial químico-enzimático.

Fonte: Arquivo pessoal

5.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS EXTRAIDAS DO BAGAÇO DE CANA

A precipitação pela adição de solventes orgânicos miscíveis é um dos principais métodos de recuperação e purificação de hemiceluloses. Entre os solventes mais utilizados

encontra-se o etanol, no entanto o metanol e a acetona, além de outros solventes orgânicos também são aplicados para o fracionamento da hemicelulose (PENG et al., 2012).

A xilana solubilizada na etapa de extração alcalina a frio foi recuperada após precipitação em 30% v/v de etanol, liofilizada e nomeada de X-1. As xilanas extraídas com Luminase por 6 h e 24 h foram precipitadas em etanol (30% v/v), liofilizadas e nomeadas como X-3-6 e X-3-24. Boa parte das hemiceluloses solubilizadas não precipitou em etanol, obtendo-se baixas porcentagens de recuperação, 1,7% para X-1, 9,2% para X-3-6 e 7,6% para X-3-24.

As características das hemiceluloses, como o grau de polimerização e o grau de substituição afetam a solubilidade, portanto hemiceluloses com alto grau de substituição parecem ser mais solúveis, sendo provável que este tipo de hemicelulose tenha permanecido em solução o que exigiria uma concentração mais alta de etanol para precipitá-las (PENG et al., 2011a). A composição química das três xilanas recuperadas do bagaço de cana está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 – Composição das xilanas recuperadas a partir das frações líquidas geradas no tratamento sequencial.

XILANA	Composição (%m/m)					Xil/Ara
	Xilose	Arabinose	Glicose	Acetil	Lignina	
X-1	12,5% $\pm$ 0,92	1,7% $\pm$ 0,37	8,8% $\pm$ 0,14	1% $\pm$ 0,25	18%	7,4
X-3-6	4,1% $\pm$ 0,29	0,5% $\pm$ 0,13	1,2% $\pm$ 0,16	Nd	1,5%	8
X-3-24	6,4% $\pm$ 0,71	0,8% $\pm$ 0,2	3,3% $\pm$ 0,02	Nd	3,5%	8

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Nd. Não detectado.

A xilose foi o carboidrato que se encontrou em maior proporção (4,1-12,5%), seguido da glicose (1,2-8,8%) e arabinose (0,5-1,7%). O teor de glicose da X-1 foi o mais alto, porém valores ainda maiores que este foram determinados em xilanas extraídas também com álcali como consequência da solubilização das (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanas (PENG et al., 2011a). A X-1 apresentou conteúdo alto de lignina (17%), sugerindo que na primeira etapa de extração a xilana foi solubilizada com parte da lignina. As condições de tratamento alcalino utilizadas foram brandas para causar a ruptura das ligações éter entre as hemiceluloses e a lignina, permanecendo estas estruturas unidas no licor alcalino (PENG et al., 2009). Xilanas com valores um pouco menores de lignina (8-10%) foram extraídas

de bagaço deslignificado por outros métodos químicos (SPORCK et al., 2017). Em outro trabalho quando se utilizou peróxido de hidrogênio em meio alcalino em diferentes concentrações e tempos de reações, o teor de lignina nas xilanas extraídas foi de 5-14% (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009). Por outra parte os dados da Tabela 13 também mostram que as xilanas extraídas por via enzimática apresentaram teores mais baixos de lignina, com valores de 1,5% para a X-3-6 e 3,5% para a X-3-24. É evidente que o uso de enzimas gera produtos mais puros quando comparados aos obtidos por métodos químicos, dada sua especificidade pelo substrato (SPORCK et al., 2017).

Todas as xilanas isoladas apresentaram valores similares na relação xilose/arabinose sugerindo níveis iguais de ramificação com respeito a este grupo pendente, porém apenas a xilana X-1 se encontrava acetilada. Xilanas mais lineares podem ser obtidas com cargas mais altas de álcali e tempos de reação maiores (BIAN et al., 2012; PENG et al., 2011a, 2011b; XU et al., 2006).

As massas molares das xilanas recuperadas de cada etapa, por precipitação em etanol (30%v/v) foram determinadas por cromatografia de exclusão molecular (Figura 16). Na Tabela 14 são apresentados os valores da massa molar ponderal média (Mw) e massa molar numérica média (Mn) e o índice de dispersividade (Mm/Mn) para cada Xilana X-1, X-3-6 e X-3-24. O valor de Mm/Mn calculado para a X-1, extraída quimicamente, sugere que a maioria das moléculas apresentam a mesma massa molar, uma vez que o valor do índice foi de 1.03. Com respeito à X-1, as xilanas extraídas enzimaticamente apresentaram valores maiores de Mm/Mn, podendo-se dizer que as xilanas X-3 extraídas em diferentes tempos apresentaram maior dispersão nas massas molares das cadeias de xilana que a compõem.

Tabela 14 – Massa molar ponderal média (Mm), massa molar numérica média (Mn) e Índice de dispersividade (Mm/Mn) das xilanas isoladas do tratamento químico enzimático do bagaço de cana.

Método de Extração	Xilana	Mm	Mn	Mm/Mn
Ext. Alcalino a frio (10% $m_{NaOH}/m_{Bagaço}$ -30min)	X-1	34.598	33.444	1,03
Ext. Enzimática (5UI / $g_{polpaP2}$ -6 horas)	X-3-6	11.678	41.35	2,82
Ext. Enzimática (5UI / $g_{polpaP2}$ -24 horas)	X-3-24	9.948	3.442	2,89

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 16 – Perfil de distribuição das massas molares das xilanas recuperadas por precipitação com etanol.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: **A:** Padrões de calibração: 40 Kg/mol (—), 20 Kg/mol (—), 10 Kg/mol (—), 6 Kg/mol (—), 3,5 Kg/mol (—), 2,5 Kg/mol (—)

B: X-1 (—)

C: X-3-6 (—)

D: X-3-24 (—)

A eluição da X-1 (Figura16B) procedente da extração alcalina a frio apresentou apenas um pico como massa molar ponderal média de 34.598 g/mol. Esta fração de xilana apresentou uma massa molar maior que a reportado por Brienzo e colaboradores (2009) que isolaram xilanas de bagaço de cana com Mw de 21.000 g/mol utilizando 6% de peróxido a 20°C durante 4 horas. As ligações β -glicosídicas entre os monômeros da cadeia principal das hemiceluloses são estáveis em condições alcalinas brandas, portanto é de se esperar-se que o grau de polimerização das xilanas isoladas seja alto. Xilanas com massas molares ponderais médias na faixa de 35.200-37.430 g/mol foram obtidas na extração com alta carga de álcali (100% $m_{\text{NaOH}}/m_{\text{bagaço}}$) durante 18 horas e massas destas xilanas aumentaram com a temperaturas testada, que variou entre 20-40°C (XU et al., 2006). Um

comportamento similar foi observado na hemicelulose extraída durante 10 horas utilizando bagaço deslignificado com clorito de sódio em médio ácido. As massas molares das xilanas extraídas em temperaturas baixas (até 35°C) aumentaram em função do tempo de extração, mas as massas molares diminuíram com o incremento da temperatura (BIAN et al., 2012). Frações de hemicelulose extraídas de bambú com 0,5% e 1% de $m_{\text{NaOH}}/m_{\text{Biomassa}}$ a 60°C durante 3 horas apresentaram massas molares de 14.990 e 17.830 g/mol. Quando foi adicionado ao meio reacional etanol e aumentada a concentração de álcali para 5 e 8% no processo de extração, as massas molares das frações também aumentaram para 20.890 e 25.340 g/mol, respectivamente (PENG et al., 2011b).

As xilanas extraída por via enzimática durante 6 horas (Figura 16C) e 24 horas (Figura 16D) mostram perfis de eluição mais variado com diferentes picos com respeito a X-1, estas xilanas apresentaram massas molares medias de 9,948 e 11.678g/mol para X-3-6 e X-3-24, respectivamente.

As xilanas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (TLC) e mostraram perfis de migração bem diferentes entre elas, assim como a intensidade das manchas, atribuídas à concentração (Figura 17).

Figura 17 – Cromatografia em camada delgada das xilanas isoladas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A xilana X-1 não saiu da origem de aplicação na placa cromatográfica e portanto não foram observadas manchas por apresentarem uma massa molar alta e a fase móvel da corrida cromatográfica não conseguiu arrastá-la consigo. Foram observadas manchas bem

mais claras no local de aplicação das amostras X-3-6 e X-3-24 em comparação a X-1. Ao comparar a migração das manchas nas xilanas X-3-6 e X-3-24 com os padrões estas podem ser atribuídas a xilooligosacarídeos (XOS) com diferentes graus de polimerização. Assim nas duas xilanas enzimáticas foram identificados a presença de xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e Xilopentaose (X5), além desses a xilana X-3-24 apresentou Xilobiose (X2) em sua composição. Em contrapartida em nenhuma das xilanas foram visualizadas manchas correspondentes a xilose, devido à falta da β -Xilosidase no extrato da Luminase. Os xiloligosacáridos (XOs) são oligômeros de açúcar constituídos por unidades de xilose. Eles tem ganhado interesse industrial por suas propriedades prebióticas com efeitos positivos para a saúde. Por exemplo para aplicações relacionadas a alimentos, oligossacarídeos com graus de polimerização entre 2-4 são preferidos (VÁSQUEZ et al., 2000). Diante disto as xilanas isoladas na terceira etapa do tratamento químico enzimático apresentam potencial para serem usadas no setor de alimento, enquanto que a xilana X-1 pode ser utilizada em aplicações onde se necessita de maiores graus de polimerização, como por exemplo na fabricação de cosméticos e hidrogéis. Não obstante, este tipo de xilana também pode ser utilizada como substrato para as xilanases na produção de XOs. Para estas aplicações, os coquetéis xilanolíticos com baixa atividade de exo-xilanase ou β -xilosidase são os mais apropriados, a fim de evitar a produção de xilose (VÁSQUEZ et al., 2000).

Os produtos das hidrólises utilizando os dois extratos enzimáticos (Luminase e Cellic Htec 2) em diferentes cargas enzimáticas (5UI, 50UI, 500UI) de xilanases também foram separados por TLC, sendo os diferentes perfis de migração apresentados na Figura 18. As xilanas extraídas com ambos extratos apresentam uma mancha na origem de aplicação, atribuída a xilana de alta massa molar. Em todos os casos foram observadas manchas atribuídas a X3 e X4 com algum grupo pendente, pois quando comparadas com os respectivos padrões apresentam-se pequenas diferenças na distância de migração. As manchas referentes às amostras das xilanas extraídas com Cellic Htec2 foram mais intensas em comparação às obtidas pela Luminase, especialmente nos tempos mais curtos de reação.

O perfil das xilanas obtidas em 24 horas de reação da polpa-P3 com a Luminase foi muito similar. Xiloligosacáridos na faixa de X2-X5 podem ser obtidos ao utilizar tanto cargas baixas como cargas altas de enzima, enquanto que em tempos de reação mais curtos (6 horas) manchas correspondentes a X2 foram ficando mais intensas com o

aumento da carga de enzima. Embora esta técnica não seja quantitativa a intensidade das manchas é um reflexo da concentração de amostra.

Figura 18 – Cromatografia em camada delgada das xilanas extraídas pelos extratos enzimáticos comerciais Luminase e Cellic Htec2 em diferentes cargas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.6 EFEITO DO TRATAMENTO SEQUENCIAL NA SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE

As polpas P3-6 e P3-24 obtidas após a extração das hemiceluloses com a enzima Luminase durante 6 e 24 horas, respectivamente, foram hidrolisadas com o coquetel enzimático comercial Cellic Ctec2 na razão de 10 FPU/g de glucanas. A polpa P2 também foi hidrolisada nas mesmas condições e utilizada como controle. Estes ensaios foram feitos para avaliar se a remoção de parte das xilanas das polpas iria influenciar uma subsequente hidrólise enzimática da celulose. Com a remoção de constituintes da parede celular espera-se o aumento da porosidade, que, por sua vez está associado como a acessibilidade das enzimas, podendo se alcançar maiores rendimentos de sacarificação (BATTISTA; BOLZONELLA, 2018; SIQUEIRA et al., 2017; SUN et al., 2016).

Na figura 19 se apresenta a cinética da hidrólise das polpas P2, P3-6 e P3-24, durante 48 horas de reação. O padrão de conversão de celulose (A, C e E) e de xilana (B, D e F) foi similar para todas as polpas, aumentando em função do tempo. Entre as polpas não se observou diferenças no processo da sacarificação, mesmo elas tendo composições químicas diferentes. As polpas P3-6 e P3-24 apresentam em média 54% menos hemicelulose e 85% menos lignina que o bagaço original, enquanto para a polpa-P2 os respectivos valores são 30% e 80% menores que o bagaço original. Esses resultados sugerem que a extração alcalina a frio seguida do pré-tratamento ASE do bagaço, utilizando baixa carga de sulfito ($2,5\% m_{\text{sulfito}}/m_{\text{polpa}}$) em meio alcalino e na presença de etanol, já foi suficiente para gerar mudanças na composição química e estrutural do bagaço, que permitiram uma eficiente conversão da celulose residual. A sacarificação total da celulose pela Cellic Ctec2 implica a solubilização conjunta de xilanas, pois neste extrato também há enzimas xilanolíticas. Com respeito à conversão da xilana, a hidrólise foi mais lenta, podendo-se sugerir a necessidade de mais xilanases e com diferentes modos de ação diferentes no extrato comercial, para promover a degradação total desse substrato.

As reações enzimáticas foram conduzidas nas consistências de 5% m/v, 10% m/v e 15% m/v, com o intuito de avaliar o efeito da carga de sólidos (MS) no processo hidrolítico. Na condição de baixa consistência de sólidos (5%) a conversão de celulose foi rápida e, nas primeiras 24 horas a maior parte da celulose já havia sido hidrolisada. Nas 12 horas seguintes de reação se evidenciou um incremento de 6% na hidrólise das polpas, atingiu-se a conversão completa da celulose (Figura 19A). Comparativamente, a hidrólise de xilana foi mais lenta chegando a porcentagens de 86%, 85% e 83% de conversão para as polpas P2, P3-6 e P3-24 respectivamente, em 48 h de reação, mas observa-se que o perfil da curva de reação não atingiu um patamar (Figura 19B). Os altos valores de conversão de celulose e xilana obtidos nestes ensaios evidenciam os bagaços pré-tratados como substratos muito apropriados para a hidrólise enzimática. Por outro lado, rendimentos de conversão de celulose menores que 50% foram reportados em bagaços pré-tratados com NaOH (5% m/m), H₂SO₄ (0.75% m/m) e NaHSO₃/H₂SO₄ (9%/0.75% m/m) em consistência de 2% m/v após 72 horas de reação. Apenas quando utilizaram bagaços pré-tratados com explosão a vapor/SO₂ (3.0% m/m) ou com Na₂SO₃/NaOH (10%/5% m/m) a conversão de celulose chegou a 92 e 88%, respectivamente (SIQUEIRA et al., 2017). Ainda assim, a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado ASE foi maior, em tempo de reação mais curto, e empregando uma maior carga de sólidos.

Figura 19 – Conversão de celulose e xilana na sacarificação em diferentes consistências de sólidos das polpas obtidas no tratamento sequencial do bagaço.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: A Conversão de Celulose na consistência de 5%
 B Conversão de Xilana na consistência de 5%
 C Conversão de Celulose na consistência de 10%
 D Conversão de Xilana na consistência de 10%
 E Conversão de Celulose na consistência de 15 %
 F Conversão de Xilana na consistência de 15%

As conversões de celulose foram de 96% para a polpa P2, 98% para a polpa P3-6 e 100% para polpa P3-24 nas hidrólises feitas em consistência média (10% m/v) (Figura 19C). Esses valores são comparáveis aos obtidos nas polpas conduzidas com 5% m/v de sólidos, porém foi necessário estender o tempo de reação até 48h.

A Figura 19E mostra as porcentagens de sacarificação de celulose na maior consistência, podendo-se verificar que durante as primeiras 8 horas de reação não há muita diferença nos valores obtidos entre as polpas, diferentemente do observado no restante do tempo de reação, especialmente no caso da polpa P3-24. Às 24 horas, as porcentagens de conversão de glicose da P2 e P3-6 foram aproximadamente 12 pontos percentuais a mais do que a polpa P3-24, diminuindo essa diferença a 8 pontos percentuais às 48 horas da reação. Estes resultados indicam que em consistências maiores, a extração prévia das xilanas da polpa de bagaço ASE por xilanases (polpa P3), teve um efeito negativo na hidrólise da celulose. Há alguns estudos mostrando que a remoção excessiva de xilana e até mesmo de lignina não resultou em incremento na digestibilidade enzimática de celulose (ROLLIN et al., 2011; ZHANG; WU, 2014). Embora tenha sido sugerido que altos níveis de deslignificação não trazem um aumento na digestibilidade enzimática da biomassa devido ao colapso das microfibras de celulose (ZHANG; WU, 2014), este efeito não foi observado na polpa-P2, que tinha apenas 6.5% de lignina residual mostrando ser um substrato facilmente hidrolisável enzimaticamente. No entanto, os valores menores na sacarificação, especialmente o da P3-24h pode ser atribuído ao colapso das microfibras de celulose depois da remoção enzimática da xilana.

Resultado semelhante foi obtido pelo pré-tratamento do bagaço de cana em diferentes concentrações de etanol: ácido acético (60:40 e 80:20, v/v) (ZHANG; WU, 2014). Os autores relataram que a conversão de celulose aumentou até certo ponto, em função do aumento na deslignificação e remoção de xilana. Porém quando a lignina e ou xilana foram extensamente removidas, a conversão de celulose diminuiu; de tal forma que dependendo da concentração dos componentes principais estes podem ter influência tanto negativa quanto positiva nos processos subsequentes. Deste modo, alterações estruturais suscitadas pelos pré-tratamentos podem reduzir a digestibilidade enzimática.

Battista e colaboradores (2018) relataram que quando o grau de porosidade é superior a 65%, o substrato tende a absorver mais água aumentando a viscosidade do meio reacional pela redução de quantidade de água livre o que consequentemente dificulta a hidrólise em alto teor de sólidos, em termos de difusão das enzimas (DUTTA; CHAKRABORTY, 2015). Além da viscosidade do meio reacional, a baixa mistura e

homogeneização do meio reacional são considerados fatores limitantes nas hidrólises enzimáticas com altas consistências. Assim em reatores de tanque agitado com rotores, tipicamente a hidrólise começa a ser ineficiente em porcentagens de sólidos acima de 10% (JØRGENSEN et al., 2007). Outras características da celulose como a sua cristalinidade, o grau de inchamento das fibra e seu grau de polimerização tem sido relatados como aspectos que afetam a hidrólise enzimática da celulose (PARK et al., 2010; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Em relação à fração de xilana, os valores de conversão foram 16% menores na hidrólise com 15% de sólidos com respeito aos valores alcançados nas hidrólises com carga de 10% de sólidos, isto é 69% para a P2, 71% para P3-6 e 59% para a P3-24, sugerindo que a maior formação de produtos na reação conduzida em alta carga de sólidos pode ter inibido as xilanases presentes no coquetel Cellic Ctec2 (DUTTA; CHAKRABORTY, 2015; POLIZELI et al., 2005). Uma outra explicação para a redução na conversão enzimática de xilanas quando o substrato estava em alta consistência pode estar relacionada ao fenômeno de adsorção (JØRGENSEN et al., 2007). Segundo Dutta e Chakraborty (2015) uma maior carga de substrato reduz a adsorção específica e a relação de distribuição sólido-líquido da endoxilanase, retardando a hidrólise. Todos esses fatores podem ter afetado a hidrólise das polpas pré-extraídas com xilanase. Esperavam-se diferenças significativas na sacarificação entre as polpas que foram tratadas com xilanases e as que não foram tratadas. Porém, a extração de xilana das polpas ASE por via enzimática, conforme proposto, não influenciou positivamente na etapa de sacarificação da celulose residual utilizando o coquetel Cellic Ctec2.

A concentração de açúcares produzidos da hidrólise das polpas está apresentada na Figura 20. A liberação tanto de glicose quanto de xilose aumentaram com o decorrer da sacarificação nas três condições de consistência testadas. As maiores concentrações de glicose foram alcançadas após as 48 horas na faixa de 75-87g/L na maior carga de sólidos (Figura 20E), uma vez que havia mais substrato para ser hidrolisado; em contrapartida, as concentrações mais baixas foram registradas na menor carga de sólidos, com valores de 29-33g/L (Figura 20A).

Analisando o perfil de liberação de glicose e xilose a partir das polpas nas consistências de 10% e 15%, observa-se que em de 24 horas de reação a concentração de glicose no meio é maior que 40g/L, independentemente do tipo de polpa. Sabe-se que a presença de glicose acima desta concentração no meio, apresenta um efeito inibitório na ação das β -glicosidases (BATTISTA; BOLZONELLA, 2018). Outros produtos da sacarificação como a celobiose e xilo-oligossacarídeos também podem inibir as

Figura 20 – Concentração de glicose e xilose durante o processo na sacarificação em diferentes consistências de sólidos das polpas obtidas no tratamento sequencial do bagaço.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: A Concentração de Celulose na consistência de 5%

B Concentração de Xilana na consistência de 5%

C Concentração de Celulose na consistência de 10%

D Concentração de Xilana na consistência de 10%

E Concentração de Celulose na consistência de 15 %

F Concentração de Xilana na consistência de 15%

endoglucanases e exoglucanases (BATTISTA; BOLZONELLA, 2018; BEZERRA; DIAS, 2005).

Como a concentração de glicose foi maior nas hidrólises das polpas P3 (Figura 20C e 20E) é possível que tenha ocorrido um efeito inibitório sobre as β - glicosidases, razão pela qual não se observou um efeito positivo da remoção enzimática da xilana sobre a sacarificação destas polpas. Com respeito à concentração de xilose produzida na carga baixa de sólidos (Figura 20B) não se apreciam diferenças significativas entre as polpas quando comparado com a carga alta de sólidos (Figura 20F). Em todos os casos as maiores concentrações de xilose foram alcançadas nas hidrólises feitas com as polpas P2 nas três condições de consistência testadas. Por outro lado, a menor produção de xilose foi obtida com a polpa P3-24, devido em parte à menor concentração de xilana na polpa original.

A partir dos resultados da Figura 20 foi possível demonstrar a importância de se pré-tatar adequadamente o bagaço de cana-de-açúcar e também de remover uma parte da xilana antes de iniciar a hidrólise com celulasas. Claramente houve uma maior produção de glicose com a sequência completa de pré-tratamento. Ademais, nos processos enzimáticos dos polissacarídeos da biomassa além do custo dos coquetéis enzimáticos existem outros aspectos a serem considerados que devem ser reduzidos para ter bons resultados econômicos, como o consumo de água, o volume e o número de reatores, o gasto energético.

A condução da hidrólise enzimática com um alto teor de sólidos pode minimizar estes custos. Por exemplo, na produção de etanol são necessárias altas concentrações de glicose no processo fermentativo, tornando viável a destilação. A concentração mínima de etanol para destilação deve ser de 4% p/p, o que requer a produção de um licor com concentração mínima de glicose de 8% p/p, o que, por sua vez está associado a pelo menos uma carga de 15% p/p de teor de sólidos de biomassa nos processos enzimáticos (MCINTOSH et al., 2016). Diante isto o tratamento sequencial químico-enzimático se apresenta vantajoso nos processos de sacarificação com cargas relativamente altas (15%) uma vez que a concentração de glicose foi de 87g/L, além do que permite a recuperação da xilana gerando um produto adicional que pode ser considerado de valor acrescentado no processo geral.

6 CONCLUSÕES

O tratamento sequencial químico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar permitiu a solubilização de 61% dos compostos não celulósicos dos quais 48% correspondem à fração de hemicelulose e 86% à fração de lignina, quando a extração enzimática de hemicelulose foi conduzida em 6 horas, porém ao estender o tempo para 24 horas pode ser alcançada a solubilização de 71% das frações não celulósicas.

A reutilização do licor Alcalino Etanol, composto pelo álcali residual, da extração alcalina a frio (primeira etapa), e etanol, empregado na precipitação da xilanas solubilizadas, acrescido de sulfito de sódio promoveu uma alta deslignificação do bagaço, evitando a necessidade de empregar altas cargas de reagentes, o que torna esse processo vantajoso para a obtenção de xilana e glicose.

Foram recuperadas duas frações de Xilana (X-1 e X-3) com diferentes massas molares que podem ser usada em diferentes aplicações. A fração de xilana extraída com álcali (X-1) apresentou maior conteúdo de lignina quando comparadas com as xilanas extraídas enzimaticamente (X-3)

As alterações estruturais e químicas produzidas no bagaço durante as duas primeiras etapas do tratamento SQE foram suficientes para gerar altas porcentagens de conversão de celulose (80-100%) nas consistências de 5% e 10% m/v, de modo que a remoção da hemicelulose remanescente (terceira etapa) durante 6h não influenciou no processo da sacarificação.

A remoção da hemicelulose remanescente com xilanases durante 24 horas teve um efeito negativo na sacarificação com consistência de 15% de sólidos.

A hidrólise enzimática da celulose foi dependente da consistência de sólidos, na menor consistência (5%) foi atingindo quase o 100% de conversão da celulose na metade do tempo em comparação com a maior consistência (15%).

Embora não tenha sido observada diferença nas porcentagens de conversão de celulose entre as polpas P2 e P3 na etapa de sacarificação, a implementação do tratamento sequencial químico-enzimático completo possibilita a obtenção de mais de um produto de valor agregado a partir do bagaço, no caso xilana na forma de XOs permitindo melhorar a viabilidade do processo.

REFERENCIAS

- ANELI BARBOSA, ELLEN C GIESE, R. F. H. D. Bioactive Oligosaccharides: Production, Biological Functions and Potential Commercial Applications. In: [s.l: s.n.].
- ARAÚJO, J. D. P.; GRANDE, C. A.; RODRIGUES, A. E. Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, p. 1024–1032, 2010.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BATTISTA, F. et al. Bioresource Technology Enzymatic hydrolysis at high dry matter content : The influence of the substrates ' physical properties and of loading strategies on mixing and energetic consumption. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 191–196, 2018.
- BATTISTA, F.; BOLZONELLA, D. Some critical aspects of the enzymatic hydrolysis at high dry-matter content: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2018.
- BAURHOO, B.; RUIZ-FERIA, C. A.; ZHAO, X. Purified lignin : Nutritional and health impacts on farm animals — A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 175–184, 2008.
- BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7–18, 2013.
- BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. Enzymatic Kinetic of Cellulose Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, p. 49–59, 2005.
- BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- BRIENZO, M. et al. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1454–1465, 2014.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199–204, 2009.

BU, L. et al. Comparative study of sulfite pretreatments for robust enzymatic saccharification of corn cob residue. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 87, 2012.

CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A. Lignin as renewable raw material. **ChemSusChem**, v. 3, p. 1227–1235, 2010.

CARVALHO, D. M. DE et al. Cold alkaline extraction as a pretreatment for bioethanol production from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Energy Conversion and Management**, v. 124, p. 315–324, 2016.

CARVALHO, D. M. DE; QUEIROZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932–941, 2016a.

CARVALHO, D. M. DE; QUEIROZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932–941, 2016b.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.

DAVIS, R. et al. Process Design and Economics for the Conversion of Lignocellulosic Biomass to Hydrocarbons: Dilute-Acid and Enzymatic Deconstruction of Biomass to Sugars and Biological Conversion of Sugars to Hydrocarbons. n. October 2013, 2013.

DE FIGUEIREDO, F. C. et al. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 164–170, 2017.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1627–1640, 2012.

DOS SANTOS MUGUET, M. C.; PEDRAZZI, C.; COLODETTE, J. L. Xylan deposition onto eucalypt pulp fibers during oxygen delignification. **Wood Research and Technology Holzforschung**, v. 65, n. 4, p. 605–612, 2011.

- DUTTA, S. K.; CHAKRABORTY, S. Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose of xylan type. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 642–650, 2015.
- EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2006.
- ESPINOZA-ACOSTA, J. L. et al. Ionic liquids and organic solvents for recovering lignin from lignocellulosic biomass. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 3660–3687, 2014.
- EZEILO, U. R. et al. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 4, p. 647–662, 2017.
- FARHAT, W. et al. A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. **ChemSusChem**, v. 10, n. 2, p. 305–323, 2017.
- FERRAZ, A. et al. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, 2000.
- FERREIRA, L. M. et al. Hemicellulose dressing versus rayon dressing in the re-epithelialization of split-thickness skin graft donor sites: a multicenter study. **Journal of Tissue Viability**, v. 18, n. 3, p. 88–94, 2009.
- FIGUEROA-ESPINOZA, M.-C. et al. Enzymatic Solubilization of Arabinoxylans from Native, Extruded , and High-Shear-Treated Rye Bran by Different Endo-xylanases and Other Hydrolyzing Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4240–4249, 2004.
- GARCÍA, J. C. et al. Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 71, p. 127–133, 2013b.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied chemistry**, v. 59, n. 5, p. 695–702, 1987.
- GOLDBECK, R. et al. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36–46, 2016.
- GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.
- GUILHERME, A. A. et al. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 23–33, 2015.

- HAKALA, T. K.; LIITIÄ, T.; SUURNÄKKI, A. Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 102–108, 2013.
- HAMMEL, K. E. Fungal degradation of lignin. In: **Driven by nature: plant litter quality and decomposition**. [s.l: s.n.]. p. 33–45.
- HANSEN, N. M. L.; PLACKETT, D. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 6, p. 1493–1505, 2008.
- HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.
- HUTTERER, C.; SCHILD, G.; POTTHAST, A. A precise study on effects that trigger alkaline hemicellulose extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 460–467, 2016.
- IWAMOTO, L. et al. [Adherence of *Candida albicans* is inhibited by yeast mannan]. **Yakugaku Zasshi**, v. 126, n. 3, p. 167–172, 2006.
- JEON, T. et al. Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis—A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1369–1385, 2017.
- JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 862–870, 2007.
- KENDALL PYE, E. Industrial Lignin Production and Applications. In: **Biorefineries-Industrial Processes and Products**. v. 2p. 165–200.
- KHUONG, L. D. et al. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 62–68, 2014.
- KLEMM, D. et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science : Today ' s state. **Materials Today**, v. xxx, n. xx, p. 1–29, 2018.
- LAURITO-FRIEND, D. F. et al. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, 2015.
- LI, Z. et al. Bioconversion of Bamboo To Bioethanol Using the Two-Stage Organosolv and Alkali Pretreatment. **BioResources**, v. 7, n. 4, 2012.

- LUO, J. et al. Selective Lignin Oxidation towards Vanillin in Phenol Media. **Chemistry select**, v. 1, p. 4596–4601, 2016.
- MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.
- MCINTOSH, S. et al. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam. p. 346–358, 2016.
- MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.
- MENDES, F. M. et al. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 890–895, 2013.
- MESA, L. et al. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1157–1162, 2011.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- NAGELE, H. et al. Arboform ® - A Thermoplastic , Processable Material from Lignin and Natural Fibers. In: **Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin**. p. 101–119.
- PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.
- PARK, Y.; DOHERTY, W. O. S.; HALLEY, P. J. Developing lignin-based resin coatings and composites. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 163–167, 2008.
- PARTHASARATHI, R. et al. Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 49, p. 14191–14202, 2011.
- PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009.
- PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PENG, P. et al. Studies on the starch and hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation from bamboo *Phyllostachys bambusoides* f. *shouzhu* Yi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2680–2688, 2011a.

PENG, P. et al. Isolation and structural characterization of hemicelluloses from the bamboo species *Phyllostachys incarnata* Wen. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 883–890, 2011b.

POLIZELI, M. L. T. . et al. Xylanases from fungi : properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 577–591, 2005.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 8–36, 2009.

RABELO, S. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014.

RALPH, J. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 65–83, 2010.

REESE, E. T.; SIU, R. G.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485–497, 1950.

RÉMOND, C. et al. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6712–6717, 2010.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, n. March, p. 52–58, 2015.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274–279, 2012.

ROLLIN, J. A. et al. Increasing Cellulose Accessibility Is More Important Than Removing Lignin : A Comparison of Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation and Soaking in Aqueous Ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 22–30, 2011.

SANDHU, H. S. et al. Sugarcane Botany : A Brief View 1 Main Parts of the Plant. p. 1–5, [s.d.].

SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI, B. A.; CHANDEL, A. K. Second Generation Ethanol Production : Potential Biomass Feedstock , Biomass Deconstruction , and Chemical Platforms for Process Valorization. In: **Advances in Sugarcane Biorefinery**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 135–152.

SIQUEIRA, G. et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 2–10, 2011.

SIQUEIRA, G. et al. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

SLUITER, A et al. Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42623**, n. January, p. 1–14, 2008.

SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in BiomassNational Renewable Energy Laboratory (NREL)**. [s.l: s.n.].

SPORCK, D. et al. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 296, 2017.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

SUN, R. C.; SU, X. F.; WEN, J. L. Fractional and structural characterization of lignins isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5322–5330, 2001.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

TAYLOR, R. et al. **From the Sugar Platform to biofuels and biochemicals. Final report for the European Commission Directorate-General Energy**. [s.l: s.n.].

THANH BINH, N. T. et al. Synthesis of Lignin-Based Thermoplastic Copolyester Using Kraft Lignin as a Macromonomer. **Composite interfaces**, v. 16, p. 923–935, 2009.

VÁSQUEZ, M. J. et al. Xylooligo- saccharides : manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387–393, 2000.

VILELA, R. A. DE G. et al. Pressão por produção e produção de riscos: a “maratona” perigosa do corte manual da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 40, n. 131, p. 30–48, 2015.

WEI, W.; WU, S.; XU, S. Enhancement of enzymatic saccharification of bagasse by ethanol-based organosolv auto-catalyzed pretreatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 580–587, 2016.

WU, L. et al. Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4793–4799, 2011.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, n. 2, p. 307–319, 2001.

XU, F. et al. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 253–261, 2006.

YAO, S. et al. Efficient extraction of bagasse hemicelluloses and characterization of solid remainder. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 21–27, 2015.

ZHANG, H.; WU, S. Efficient Sugar Release by Acetic Acid Ethanol-Based Organosolv Pretreatment and Enzymatic Saccharification. 2014.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 21–33, 2016.

ZHANG, W. et al. Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 250–258, 2016.

ZHAO, X. et al. Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 567–590, 2017.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 815–827, 2009.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p. 465–482, 2012.

ANEXO A

Tabela A1. Dosage de ácido sulfúrico a 72%v/v de acordo com o pH para atingir uma concentração de 4%v/v.

Volume of 72% H2SO4 (in uL) required to bring liquor acid concentration to 4%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL)				Vol. of liquor (mL		