UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

DANIELE SPORCK GONÇALVES DA SILVA

**Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática
da celulose residual**

Lorena-SP

2016

DANIELE SPORCK GONÇALVES DA SILVA

Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da
celulose residual

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para 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 Ferreira Milagres

Edição Reimpressa e Corrigida

Lorena – SP

Setembro, 2016

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)

Silva, Daniele Sporck Gonçalves da
Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar
integrado à hidrólise enzimática da celulose residual
/ Daniele Sporck Gonçalves da Silva; orientadora
Adriane Maria Ferreira Milagres - ed. reimp., corr.
Lorena, 2016.
100 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. 2016
Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Xilana. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Extração
alcalina. 4. Xilanases. I. Título. II. Milagres,
Adriane Maria Ferreira, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir andar com Ele nessa caminhada, por ser meu guia, meu Senhor e minha paz nos momentos precisos.

Aos meus pais Eduardo e Márcia, por sempre incentivarem meus sonhos e ideias, por mais mirabolantes que eles sejam, por terem me criado com valores e princípios diante da palavra de Deus e por sempre me lembrarem quem eu sou em todos os momentos independente do mundo, vocês são meu porto seguro e os amores da minha vida.

À minha adorável Tia Julita, por sempre me ajudar, me amar e ter me escolhido para ser sua sobrinha predileta. Minha vida, em especial a acadêmica, não seria possível sem ter tido você na torcida o tempo todo!

A minhas irmãs Cristiane e Daiane por terem contribuído para formarem quem eu sou hoje seja pelas discussões, risadas ou conversas sérias. Em especial a Daiane, que me deu o privilégio de ser titia do maior amorzinho do mundo, meu sobrinho Pietro. E também aos meus cunhados: Kevin e Felipe, por cuidarem tão bem das minhas irmãs.

As minhas amigas Camila, Priscila, Michelle, Luana e Cristiane, pela amizade sincera, por estarem comigo em todos os momentos importantes da minha vida. Vocês são as melhores!

A Prof. Adriane, pela orientação e apoio desde o início para o desenvolvimento deste trabalho, por me permitir crescer na ciência e confiar no meu trabalho. Muito obrigada!

Aos Prof. André Ferraz e Valdeir por me terem dado excelentes conselhos e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório: Bárbara, Felipe, Maiara, Paula, Mariana, Guilherme, Bianca, Vítor e as temporárias Verônica e Juliana pela convivência diária, por me ensinarem, por resolverem os problemas diários sempre ajudando um ao outro e rindo das situações cotidianas.

Aos amigos: Andrés, Diego, Lina, Isabela, Fernanda, Ângela, Rafael, Isabella, Lisa, Larissa, Thales, Omar, Carlaile, Gabriela, Wiliam, Renan, Eduarda pela amizade e por terem me feito me sentir em casa em Lorena.

Ao meu querido amigo Germano, pelos conselhos e ensinamentos, por sempre (sempre mesmo) me ouvir, aconselhar, brigar comigo quando necessário e por me impulsionar a ser o melhor de mim mesma. Você é o cara!!!

Ao Zé Moreira, Zé Cobrinha e Djalma pela prontidão em sempre ajudar com meus experimentos e solucionar os desafios.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

À FAPESP por financiar o desenvolvimento deste projeto.

SILVA, D. S. G. Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual. 2016. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

RESUMO

A intensa busca por fontes renováveis de energia traz como alternativa a utilização da biomassa lignocelulósica para produção de biocombustíveis e biopolímeros a partir de seus componentes, celulose, hemicelulose e lignina. Nesse estudo, a partir do bagaço de cana-de-açúcar obteve-se uma polpa enriquecida em glucana e xilana utilizando-se o pré-tratamento químio-termomecânico em solução sulfito alcalino (10% Na_2SO_3 e 5% NaOH). O pré-tratamento removeu 43% de lignina e 8% de xilana do bagaço e após uma etapa de lavagem do material, ocorreu maior dissolução da lignina (53%), xilana (17,4%) e também uma pequena solubilização de glucana (5%). O objetivo foi isolar e caracterizar as xilanas do bagaço pré-tratado e aquelas solubilizadas no licor e também avaliar a degradabilidade enzimática da celulose residual. A extração de xilanas foi realizada em condição alcalina, assistida ou não por xilanases, a partir do bagaço pré-tratado lavado (BLA) e não lavado (BNL). A extração enzimática das xilanas foi feita com 8 UI de xilanase comercial (Luminase) por grama de material, em tampão fosfato 50 mM, 50° C, pH 8 por 24 horas. Os métodos químicos para a extração das xilanas empregaram 40% NaOH (m/m), com variações nas condições de incubação entre os métodos de Lopez (L) (60° C, 2h) e Hoije (H) (25° C, 16h). Os rendimentos de sólidos e de xilana obtidos por Hoije foram próximos a 60%, diferente do observado para as xilanas extraídas pelo método de Lopez e enzimático. No método de Hoije utilizou-se o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, parcialmente deslignificado com clorito de sódio em meio ácido, e obteve-se xilanas mais puras. O menor rendimento de xilanas foi obtido através do método enzimático (22 a 30%). Todas as xilanas apresentaram composição majoritária de xilose (60-80%), seguido de grupos arabinosil (7-12%), ácidos urônicos (4-13%), ácidos hidroxicinâmicos (0,3-1,2%) e lignina (3-10%). A relação xilose/arabinose das xilanas variou de 7 a 10, enquanto que a relação xilose/ácidos urônicos apresentou uma faixa mais ampla (9-28). Este grau de substituição refletiu na maior solubilidade das xilanas. As xilanas isoladas com xilanases apresentaram duas frações com massas molares ponderais médias (M_w) de 3.700 g/mol e 800 g/mol, inferiores às das xilanas isoladas pelo método de Hoije (24.300 g/mol) e de Lopez (24.450 g/mol). As xilanas recuperadas do licor sulfito apresentaram um rendimento de 34% e massa molar ponderal média de 28.660 g/mol. As xilanas isoladas pelos métodos químicos foram caracterizadas por FT-IR e mostraram absorções em números de ondas característicos, com perfil semelhante. A conversão enzimática de glucana dos resíduos, após extração de xilanas com o método de Hoije, foi maior que dos bagaços pré-tratados. Quando a extração de xilanas foi realizada através dos métodos de Lopez ou enzimático essa melhoria não foi observada.

Palavras chave: Xilana, bagaço de cana-de-açúcar, extração alcalina, xilanase.

SILVA, D. S. G. **Isolation of xylan from sugarcane bagasse integrated with enzymatic hydrolysis of residual cellulose.** 2016. 100p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

ABSTRACT

The intensive search for renewable energy sources is often associated with the use of lignocellulosic biomass for biofuel production as well for the extraction of biopolymers from their components: cellulose, hemicellulose and lignin. In the present study, a pulp enriched in glucan and xylan was obtained from sugarcane bagasse using chemi-thermomechanical alkaline sulfite solution (10% Na₂SO₃ and 5% NaOH) pretreatment. The pretreatment removed 43% of lignin and 8% of xylan from the pulp, and a greater dissolution of lignin (53%) and xylan (17.4%) and also an additional dissolution of glucan (5%) was reached after a washing step of the material. The aim was to isolate and characterize xylans from the pretreated bagasse as well as those solubilized in the liquor, and also to evaluate the enzymatic degradability of the residual pulp. The xylan extraction was performed in alkaline conditions, being assisted or not by xylanases from the washed pretreated bagasse (WB) and unwashed pretreated bagasse (UWB). Enzymatic extraction of xylan was performed with 8 IU commercial xylanase (Luminase) per gram of material in 50 mM phosphate buffer, 50° C, pH 8, for 24 hours. The chemical methods for xylan extraction employed 40% NaOH (w/w), with varying in the incubation conditions using the Lopez (L) (60 ° C, 2h) and Hoije (H) (25 ° C, 16h) methods. The solids and xylan yields obtained through the Hoije method were near 60%, which were different from those observed for the xylan extracted by Lopez and enzymatic methods. In the Hoije method (H), sugarcane bagasse was pretreated with alkali sulfite and was partially delignified with sodium chlorite in an acid medium, resulting in even more pure xylans. The lowest xylan yield was obtained by the enzymatic method (22 to 30%). All xylans presented xylose as major component (60-80%), followed by arabinosyl groups (7-12%), uronic acids (4-13%), hydroxycinnamic acids (0.3-1.2%), and lignin (3-10%). The xylose/arabinose ratio of xylan ranged from 7 to 10, while the xylose/uronic acids ratio showed a greater range (9-28). This degree of substitution reflected in an increasing in the xylan solubility. Xylans isolated by xylanases exhibited two fractions with an weight average molecular weight (Mw) of 3.700 g/mol and 800 g/mol, which were lower than those xylans isolated through the Hoije (24.300 g/mol) and Lopez (24.450 g/mol) methods. The xylan recovered from sulfite liquor had a yield of 34% and an weight average molar weight of 28.660 g/mol. The xylans isolated by chemical methods were characterized by FT-IR, and showed absorptions at characteristic wavenumbers with similar profile. After the extraction of xylans with Hoije method, the enzymatic conversion of glucan residues was higher than the one for the pretreated bagasse. When the xylan extraction was performed with the Lopez or enzymatic methods, such improvement was not observed.

Keywords: Xylan, sugarcane bagasse, alkaline-extraction, xylanases.

LISTA DE ABREVIATURAS

D	Dispersividade
AA9	Mono-oxigenase lítica da família 9
AA10	Mono-oxigenase lítica da família 10
AQ	Antraquinona
BLA	Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e lavado
BNL	Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e não lavado
CAZY	Enzimas ativas em carboidratos
CBHI	Celobiohidrolase I
CBHII	Celobiohidrolase II
CBM	Modulo de ligação à carboidratos
CTM	Pré-tratamento químico-termomecânico
EG	Endoglucanase
FA	Ácido 2-furanocarboxílico
FFA	Ácido 5-formil-2-furanocarboxílico
FT-IR	Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier
GH	Glicosil hidrolase
GP	Grau de polimerização
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HLA	Xilana extraída do bagaço lavado pelo Método de Höije
HNL	Xilana extraída do bagaço não lavado pelo Método de Höije
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LCC	Complexo lignina-carboidrato
LLA	Xilana extraída do bagaço lavado pelo Método de Lopez
LNL	Xilana extraída do bagaço não lavado pelo Método de Lopez

LPMO	Monooxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre
pNP	Para-nitrofenol
pNPG	Paranitrofenil β -D-glicopiranosídeo
RHLA	Resíduo do bagaço lavado após extração de xilana pelo Método de Hoije
RHNL	Resíduo do bagaço não lavado após extração de xilana pelo Método de Hoije
RLLA	Resíduo do bagaço lavado após extração de xilana pelo Método de Lopez
RLNL	Resíduo do bagaço não lavado após extração de xilana pelo Método de Lopez
RXLA	Resíduo do bagaço lavado após extração de xilana com xilanases
RXNL	Resíduo do bagaço não lavado após extração de xilana com xilanases
SPORL	Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose
TLC	Cromatografia de camada delgada
XL1	Fração 1 da xilana do licor alcalino
XL2	Fração 2 da xilana do licor alcalino
XLA	Xilana extraída do bagaço lavado com xilanases
XNL	Xilana extraída do bagaço não lavado com xilanases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da celulose	19
Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura de uma 4-O-metil-glucurono arabinoxilana. ...	21
Figura 3: Estrutura sugestiva de lignina-guaiacil, presente em coníferas.....	24
Figura 4: Estrutura química dos monolignóis (a) álcool p-cumarílico, (b) álcool coniferílico, (c) álcool sinapílico.....	25
Figura 5: Esquema representativo de uma ligação α éter (a) e β éter (b) formadas entre lignina e hemicelulose através de um hidroxicinamato.	26
Figura 6: Mecanismo da reação de <i>peeling</i> em uma glucomanana.	28
Figura 7: Mecanismo de sulfonação da lignina em meio neutro ou alcalino.	30
Figura 8: Local de clivagem da endo-xilanase (GH 10) na glucurono-arabinoxilana.....	35
Figura 9: Enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose. Enzimas hidrolíticas: endo-glucanases (EG), exo-glucanases (CBH1, CBH2), β -glicosidase. Enzimas oxidativas: mono-oxigenases líticas (AA9).	37
Figura 10: Fluxograma de extração de xilana pelo método de Lopez.	44
Figura 11: Fluxograma de extração de xilana pelo método de Höije.	45
Figura 12: Fluxograma de extração de xilana utilizando xilanase.....	46
Figura 13: Rendimento de sólidos (■) e rendimento de xilana (▨) das xilanas extraídas pelos métodos de Hoijs (HLA e HNL), Lopez (LLA e LNL) e por Xilanases (XLA e XNL).	60
Figura 14: Aspecto visual das xilanas isoladas pelo Método de Hoijs em a e b (HNL e HLA), Lopez em c e d (LLA e LNL) e com xilanases em e e f (XLA e XNL)	66
Figura 15: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço lavado pelo pelo método de Hoijs (HLA em a e HNL em b) e Lopez (LLA em c e LNL em d). As xilanas obtidas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P30.	70

Figura 16: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço pelo método enzimático, obtida a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P-30 (a,b) e BioGel P2 (c,d). Em (a e c) observa-se a eluição das xilanas obtidas dos substratos lavados e em (b e d) dos substratos não lavados. A extração de xilanas foi realizada 8 UI/ g de xilanase comercial (Luminase) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8, a 50° C, por 24 horas.....71

Figura 17: Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos resultantes da hidrólise enzimática com 8 U/g de xilanase comercial (luminase), por 24 horas.....72

Figura 18: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das xilanas: de *beechwood* (em azul), isoladas pelo Método de Hoije: HLA (em vermelho), HNL (rosa) e pelo método de Lopez: LLA (em roxo) E LNL (em verde).....75

Figura 19: Curva padrão de ácido glucurônico77

Figura 20: Componentes detectados no licor alcalino78

Figura 21: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas recuperadas do licor sulfito alcalino do bagaço, obtidas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P30.79

Figura 22: Conversão de glucana (a, b) dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (▲) e dos resíduos obtidos após remoção de xilana pelo Método de Hoije (▲), Lopez (▲) e com xilanas (▲). Em (a) o perfil de conversão dos substratos lavados e em (b) dos substratos não lavados. A hidrólise foi conduzida com Celluclast (5 FPU) e α-Glicosidase (10 UI) por grama de glucana.83

Figura 23: Conversão de xilana (a, b) dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (■) e dos resíduos obtidos após extração de parte da xilana pelo Método de Hoije (■), Lopez (■) e com xilanas (■). Em (a) o perfil de conversão dos substratos lavados e em (b) dos substratos não lavados. A hidrólise foi conduzida com Celluclast (5 FPU) e α-Glicosidase (10 UI) por grama de glucana.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos monolignóis (monômeros de lignina) em diferentes plantas.	25
Tabela 2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito alcalino.....	58
Tabela 3: Composição química (% m/m) dos materiais extraídos dos bagaços lavado (BLA) e não lavado (BNL) por diferentes métodos	64
Tabela 4: Composição de açúcares das xilanas isoladas dos bagaços lavado (BLA) e não lavado (BNL) por diferentes métodos	65
Tabela 5: Massa molar ponderal média (Mm), massa molar numérica média (Mn) e dispersividade (Đ) das xilanas isoladas do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino determinadas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular.	69
Tabela 6: Solubilidade em água e solubilidade relativa das xilanas isoladas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino a partir dos métodos de Lopez (LLA e LNL), Hoije (HNL e HLA) e enzimático (XNL e XLA).	73
Tabela 7: Principais atribuições para as absorções no infravermelho de xilanas	74
Tabela 8: Dosagem do teor de ácidos urônicos (m/m) pelo método colorimétrico (Sulfúrico-carbazole) e através da intensidade de absorção a 1735 cm^{-1} por FT-IR.	76
Tabela 9: Massa molar ponderal média (Mm), Massa molar numérica média (Mn) dispersividade (Đ) das xilanas isoladas do licor sulfito alcalino (XL1: frações de alta massa molar e XL2: frações de baixa massa molar).	80
Tabela 10: Caracterização química e relação xilose/arabinose dos resíduos após extração de xilana dos bagaços lavado (RLA) e não lavado (RNL)	81

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Componentes da parede celular	19
2.1.1. Celulose	19
2.1.2 Hemiceluloses	20
2.1.3 Lignina	23
2.2. Interações entre a hemicelulose e a lignina	25
2.3 Pré-tratamentos	27
2.3.1. Pré-tratamento químico- termomecânico	28
2.4 Extração de xilanas.....	31
2.4.1 Extração alcalina.....	32
2.4.2 Extração enzimática	34
2.5 Hidrólise enzimática da celulose.....	36
2.5.1 Fatores que limitam a hidrólise da celulose	38
2.6 Considerações sobre a Revisão Bibliográfica	40
3.OBJETIVOS.....	41
Objetivo Geral.....	41
Objetivos específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Matéria-prima	42
4.2 Pré-tratamento	42
4.3 Métodos de extração das xilanas	43
4.3.1. Extração de xilana pelo Método de Lopez.....	43
4.3.2. Extração de xilana pelo Método de Hoije.....	44

4.3.3. Extração enzimática	46
4.4. Precipitação de hemiceluloses do licor resultante do pré-tratamento com sulfito alcalino	47
4.5. Pós-hidrólise dos açúcares solúveis das xilanas isoladas com xilanase e do licor	47
4.6. Cálculos de Rendimento	48
4.6.1. Rendimento de sólidos	48
4.6.2. Rendimento de xilana.....	48
4.7 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina	49
4.8 Determinação de ácidos urônicos	49
4.9 Determinação de ácidos hidroxicinâmicos.....	50
4.10 Análise de açúcares por cromatografia de camada delgada	50
4.11 Determinação dos teores de furanos e fenólicos do licor	51
4.12 Determinação da massa molar aparente das xilanas	51
4.13 Solubilidade das xilanas em água	52
4.14 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	53
4.15 Determinação de atividade enzimática	53
4.15.1 Xilanase.....	53
4.15.2 Celulases totais.....	54
4.15.3 β -glicosidase	54
4.16 Ensaios de hidrólise dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados.....	55
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 56
5.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	56
5.2. Extração de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino	59
5.2.1 Comparação do rendimento de extração das xilanas	59
5.2.2 Composição química.....	62
5.2.3 Aspecto visual das xilanas	65

5.2.4 Determinação da massa molar	66
5.2.5 Solubilidade	72
5.2.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	73
5.2.7. Estimativa por FT-IR da concentração de ácido glucurônico em xilanas	75
5.3. Xilana recuperada do licor alcalino	77
5.3.1 Composição química do licor alcalino.....	77
5.3.2 Recuperação da xilana do licor	78
5.4 Degradabilidade enzimática da celulose residual	80
5.4.1 Composição química do material residual.....	80
5.4.2 Ensaios de hidrólise com celulasas	81
 6.CONCLUSÕES.....	 87
 REFERÊNCIAS.....	 89

1.INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico abundante no Brasil, uma vez que o país é o maior produtor mundial de cana, seguido de China e Índia. O bagaço é um coproduto da indústria sucro-alcooleira, gerado após extração da sacarose. Atualmente, o bagaço é utilizado nas usinas para geração de energia através de sua queima. Como a quantidade gerada é elevada, existe grande interesse em utilizá-lo para outras aplicações, especialmente na forma de seus constituintes isolados.

Os principais constituintes químicos do bagaço de cana são a celulose (32-50%), hemicelulose (19-25%), lignina (23-32%), pequenas quantidades de extrativos (5%) e cinzas (2%) (HOI et al., 2013). A hemicelulose é o segundo biopolímero de origem lignocelulósica mais abundante do planeta e apesar disso ainda é subutilizada em processos industriais. Por exemplo, no processo de polpação kraft, a maior parte das hemiceluloses é degradada a ceto-ácidos, os quais se encontram dissolvidos no licor negro, que também contém lignina, e outros reagentes empregados no processo. Este licor é queimado para geração de energia; entretanto, a hemicelulose possui um baixo poder calorífico, não sendo vantajosa a sua utilização para esta finalidade. No processo de produção de etanol celulósico, a remoção de hemicelulose é desejável pois, associado a remoção de lignina aumenta a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose e promove altos rendimentos de sacarificação de forma a tornar o processo de produção de etanol economicamente viável (PENG et al., 2012).

Logo, verifica-se que o isolamento da hemicelulose de materiais lignocelulósicos, pode ser destinada para a geração de produtos com elevado valor agregado dentro de uma biorrefinaria, visando o uso completo da biomassa e a integração de novas tecnologias a uma fábrica de açúcar, papel e etanol já existentes. Xilanas poliméricas podem ser utilizadas como adesivos e emulsificantes (KAMM; KAMM, 2004) e arabinosílo-oligossacarídeos apresentam propriedades interessantes como prébióticos (COURTIN et al., 2009), enquanto a xilose pode ser fermentada a etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007) e xilitol (GRANSTRÖN et al., 2007).

Muitos são os desafios encontrados ao isolar xilanas de materiais lignocelulósicos, visto que a estrutura recalcitrante da parede celular, a presença de lignina e as interações entre seus constituintes químicos são limitantes neste processo. Há várias formas de isolar as hemiceluloses da biomassa como explosão a vapor, auto-hidrólise, solventes orgânicos, álcali, ácidos diluídos e tratamento enzimático. A extração alcalina é de interesse quando se

deseja obter xilanas poliméricas, entretanto, parte da lignina também é solubilizada, o que diminui a pureza das xilanas isoladas.

Alguns estudos foram realizados combinando os tratamentos enzimáticos com a extração alcalina com o intuito de remover xilana e xilo-oligossacarídeos e melhorar a hidrólise enzimática da celulose residual (HAKALA et al, 2013, REMOND et al, 2010). Nesses estudos foram utilizadas altas cargas de enzimas o que levou a extração de xilanas com massa molar média 50% menor que das xilanas do material de referência.

Nesse contexto, o presente trabalho visou estudar um tratamento enzimático com baixa carga enzimática (8 UI/ g de bagaço), em condições levemente alcalinas (pH 8) para isolar xilanas do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino e comparar o rendimento e suas características físico-químicas com xilanas isoladas por métodos alcalinos. Os resíduos, enriquecidos em celulose, foram hidrolisados com celulasas no intuito de avaliar se a hidrólise em questão pode ser afetada pela extração das xilanas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Componentes da parede celular

2.1.1. Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante da terra e o principal componente estrutural da parede celular vegetal, sendo um polissacarídeo uniforme e linear, que contém β -D-glicopiranosos unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4). O grau de polimerização pode variar de 7000-15000 resíduos de glicose, dependendo da sua origem (FENGEL; WEGENER, 1983; EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ, 1999; ALÉN, 2000).

A celulose possui uma estrutura extremamente estável devido principalmente à orientação equatorial de todos os constituintes da cadeia, fazendo com que a interação entre estes constituintes do anel piranosídico seja mínima (ALÉN, 2000). Os resíduos de glicose, possuem um ângulo de 180° em relação ao anterior e essa conformação se repete a cada dois resíduos de glicose formando a celobiose, a unidade de repetição da celulose, como demonstrado na Figura 1 (HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009).

Figura 1: Estrutura química da celulose

Fonte: adaptado de Henriksson e Lennholm (2009)

A celulose possui ligações de hidrogênio intra e intermoleculares dentre as quais, as ligações entre a hidroxila do C₆ e a hidroxila do C₂ e entre a hidroxila do C₅ e a hidroxila do C₃. Estas ligações além de estabilizarem a ligação glicosídica conferem rigidez ao biopolímero. Ligações intermoleculares por sua vez, podem ser formadas entre a hidroxila presente no C₆ do resíduo de glicose e a hidroxila presente no C₃ da glicose de outra cadeia

de celulose, tendo como consequência a estrutura supramolecular da celulose. Assim, feixes de moléculas de celulose são agregados uns sobre os outros formando as microfibrilas, que juntas formam as fibrilas as quais formam regiões cristalinas, que são mais ordenadas e regiões amorfas, que são menos ordenadas. A estabilidade da celulose e o fato dela ser relativamente inerte durante os tratamentos químicos e solúvel somente em poucos solventes deve-se ao seu alto grau de cristalinidade (FENGEL; WEGENER, 1983; ALÉN, 2000; HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009).

2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo grupo de polissacarídeos mais abundantes na natureza e aproximadamente um terço de todo o carbono renovável da terra (BIELY, 1985). Sua função nas plantas está relacionada com a integridade da parede celular e a coesão das fibras de celulose (COLLINS et al., 2005). Trata-se de um polissacarídeo heterogêneo constituído de açúcares de diferentes estruturas podendo conter hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose), ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico, ácido galacturônico), podendo ainda apresentar grupos acetil, ligados aos grupos hidroxil, em quantidades variadas dependendo da espécie da planta (GÍRIO et al., 2010; TELEMAN, 2009).

As hemiceluloses apresentam um menor grau de polimerização que a celulose, em geral de 80-200 e característica amorfa (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ, 1999; SAHA et al., 2003). Pode apresentar grupos pendentes na sua cadeia principal os quais, determinam as diferenças de solubilidade, a interação física da molécula com outros componentes da matriz celular, sua degradabilidade por enzimas. Estas diferenças, aliadas ao grau de polimerização, massa molar e estrutura macroscópica as tornam menos estáveis térmica e quimicamente (ALÉN, 2000; SPIRIDON; POPA, 2008; TELEMAN, 2009).

O tipo e a concentração de hemiceluloses em cada espécie vegetal dependem da planta de origem, do tipo de tecido, estágio de crescimento e condições e temperatura de estocagem (ALÉN, 2000; TELEMAN, 2009).

As hemiceluloses são usualmente classificadas em quatro grupos de polissacarídeos estruturalmente distintos: xilanas, mananas, xiloglucanas e β -glucanas mistas. As xilanas são constituídas por uma cadeia principal homopolimérica de unidades de D-xilose. Essa cadeia principal pode estar ligada a arabinose, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido acético, ácido ferúlico, entre outros. As xilanas são classificadas pelo grau e natureza das ramificações, em

homoxilanas, glucuronoxilanas e arabinoxilanas. (EBRINGEROVÁ, 2006; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; KULKARNI et al., 2012; PENG et al., 2012).

A hemicelulose presente em maior proporção no bagaço de cana-de-açúcar é uma arabinoxilana, do tipo (glucurono)arabinoxilana, representando cerca de 20-30% dos constituintes da parede celular (LOH et al., 2013). A Figura 2 mostra o esquema de uma possível estrutura química da 4-O-metil-glucurono arabinoxilana, que possui um esqueleto principal constituído de D-xilopiranoses unidas por ligações β -1,4, contendo resíduos de ácidos 4-O-metilglucurônicos e L-arabinofuranosil ligados ao esqueleto principal por ligações α -1,2 e α -1,3, podendo conter ligações éster com o ácido cumárico e ferúlico (EBRINGEROVÁ et al., 2006; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura de uma 4-O-metil-glucurono arabinoxilana.

Fonte: Buckeridge e De Souza (2014)

A relação molar entre os constituintes da xilana pode variar, dependendo do método de isolamento a partir da parede celular. Para o bagaço de cana de açúcar, Brienzo et al. (2009) encontraram uma relação molar entre metilglucurônico/ xilose/ arabinose de 1:9:0,8, quando a xilana foi extraída com NaOH 1 M, 25° C, por 18 horas. Sun et al. (2004a) por sua vez, encontraram uma proporção de 1:7:0,3, quando a extração foi realizada com NaOH 0,5M, a 55° C, por 2 horas.

Algumas propriedades das hemiceluloses sejam químicas, físicas ou físico-químicas, como solubilidade em meios aquosos, reologia, tensão superficial e comportamento térmico,

são definidas por diferenças observadas nos grupos pendentes presentes e no padrão de substituição (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; DEUTCHMANN et al., 2012).

A determinação da massa molar das hemiceluloses pode variar dependendo da matéria-prima, do método de extração, da pureza e do método de detecção, dentre outros fatores. Por exemplo, Bian et al. (2012) realizaram a extração da hemicelulose do bagaço deslignificado, com 10% KOH, variando a temperatura de 20° C à 50° C, por 10 h e obtiveram xilanas com diferentes tamanhos. As massas molares encontradas variaram de 68.400-93.300 g/mol, com o aumento da temperatura. Brienzo (2008), também realizou extração da xilana de bagaço de cana-de-açúcar e comparou as massas molares das xilanas obtidas por diferentes processos extrativos. A xilana com maior massa molar (41.189 g/mol) foi extraída com NaOH 1M, 25° C, por 18 horas. Quando empregou 4% de H₂O₂, em pH 11, à 40° C, por 10 horas, a massa da xilana obtida reduziu para 22.185 g/mol.

Dentre as propriedades físicas, a solubilidade em água é o parâmetro mais importante no isolamento da xilana da matriz da parede celular e ela depende das interações cadeia-cadeia e cadeia-solvente (FENGEL; WEGENER, 1983). O grau de substituição é considerado o fator mais determinante nesta solubilidade pois, um alto grau de substituição das xilanas diminui a ocorrência de interações intermoleculares através das ligações de hidrogênio, entre os resíduos de xilose da cadeia principal, resultando em elevada solubilidade (SAULNIER et al., 2007; PENG et al., 2012; SRNDOVIC, 2012).

Outros fatores estruturais podem influenciar a solubilidade das xilanas, como, massa molar e o padrão de substituição. Em geral, a xilana é mais solúvel em água quanto menor a sua massa molar (SAULNIER et al., 2007).

Outra forma de avaliar a solubilidade das xilanas em meio aquoso é através da relação molar entre arabinose e xilose. No bagaço de cana-de-açúcar, essa relação é de aproximadamente 1:12 (ROCHA et al., 2015) e diminui com os processos de extração de xilana que em geral removem parte dos grupos arabinosil (CHIMPHANGO; VAN ZYL; GÖRGENS, 2012). Andrewartha e colaboradores (1979) demonstraram que a remoção enzimática de resíduos de arabinose de uma arabinoxilana de farelo de trigo diminuiu a sua solubilidade. Os resíduos de arabinose são responsáveis por manter a molécula numa conformação estendida e após a remoção dos mesmos, a molécula se torna mais flexível e a sua viscosidade em solução diminui. Após a desramificação, os resíduos de xilose que compõem as cadeias principais podem se unir e formar ligações intercadeias estáveis, formando agregados insolúveis. Este efeito já havia sido reportado por Bishop et al. (1953) e foi posteriormente confirmado por Sternemalm, Hoije e Gatenholm (2008).

Sternemalm, Hoije e Gatenholm (2008) avaliaram o efeito do conteúdo de arabinose nas propriedades de um filme de xilana preparado a partir de uma arabinoxilana de centeio; os autores verificaram a formação de agregados quando a relação arabinose/xilose encontrava-se entre (0,23-0,31) e que a formação de precipitado ocorreu quando a relação era de (0,1), evidenciando uma correlação positiva entre os resíduos de arabinose e a capacidade de ligação de água à xilana.

A identificação das hemiceluloses pode ser realizada não somente pela análise da sua composição química, mas também, a sua identidade pode ser determinada através da análise do espectro de infravermelho da amostra. O espectro de infravermelho é uma ferramenta de suma importância na investigação de grupos funcionais, análise estrutural e identificação de um dado material. Esta análise é realizada através dos átomos que formam a molécula, que interagem entre si proporcionando vibrações intramoleculares, que variam de acordo com a estrutura, composição e modo de vibração. A presença de bandas características de grupos funcionais presentes na molécula nos permite, através do exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis, realizar a identificação das estruturas. Especificamente para hemiceluloses, pode-se inferir a presença de bandas de deformação axial de C=O em ésteres (1735 cm^{-1}), vibrações do anel glicosídico, deformação angular C-O-H, deformação axial C-O e C-O-C (1415 cm^{-1}) e deformação angular C-H do carbono anomérico (895 cm^{-1}). A utilização desta ferramenta é de suma importância pois, há confirmação das ligações que constituem a sua estrutura, sendo possível identificar a molécula e podendo também ser utilizada em conjunto com outras ferramentas para trazer informações quanto a pureza da amostra (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE; 2007).

2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa e hidrofóbica, com estrutura química complexa, formada por uma estrutura irregular de unidades fenilpropanóides que se encontra quimicamente ligada à hemicelulose (ALÉN, 2000; HENRIKSSON, 2009).

Existem vários estudos sobre a via de síntese de lignina envolvendo a marcação da mesma com carbono radioativo (^{14}C). Nestes, comprovou-se que a reação se processa através do acoplamento de várias unidades fenilpropanóides (denominados monolignóis ou, monômeros de lignina) que sofrem reações oxidativas envolvendo a estabilização de fenóxi radicais por ressonância, que levam a formação da macromolécula. Na Figura 3, pode-se observar a estrutura de uma lignina guaiacil (ALÉN, 2000; HENRIKSSON, 2009).

Figura 3: Estrutura sugestiva de lignina-guaiacil, presente em coníferas.

Fonte: Henriksson (2009)

A classificação das ligninas se baseia no teor de monolignóis presentes, como demonstrado na Tabela 1. As diferenças na estrutura química destes monolignóis está no grau de metoxilação (Figura 4). O álcool p-cumarílico não apresenta o radical metoxila em sua estrutura, o álcool coniferílico apresenta uma metoxila e o álcool sinapílico apresenta duas metoxilas. Quando incorporados a lignina esses álcoois são chamados de p-hidroxifenilpropano (H), guaicilia (G) e siringila (S). A composição da lignina pode variar entre os diversos grupos: em gimnospermas predomina o tipo G, em angiospermas encontra-se guaiacila-siringila (GS) e em gramíneas destaca-se a lignina do tipo guaiacila-siringila-p-hidroxifenila (GSH) (HENRIKSSON, 2009).

Tabela 1: Composição química dos monolignóis (monômeros de lignina) em diferentes plantas.

Planta	Álcool p-cumarílico (%)	Álcool coniferílico (%)	Álcool sinapílico (%)
Coníferas-Gimnospermas	<5	>95	Traços ou nenhum
Eucotiledônea-Angiospermas	0-8	25-50	46-75
Monocotiledônea- Gramíneas	5-33	33-80	20-54

Fonte: adaptada de Henriksson (2009)

Figura 4: Estrutura química dos monolignóis (a) álcool p-cumarílico, (b) álcool coniferílico, (c) álcool sinapílico.

Fonte: Henriksson (2009)

Na planta, a lignina tem papel de suporte estrutural, além de conferir impermeabilidade e resistência contra o ataque de microorganismos e ao estresse oxidativo. Todas as propriedades apresentadas tornam a desconstrução da biomassa lignocelulósica e a degradação da lignina uma tarefa difícil (FENGEL; WEGENER, 1983).

2.2. Interações entre a hemicelulose e a lignina

A liberação das hemiceluloses da matriz celular é restringida, entre outros fatores, pela presença da lignina, uma vez que ambas estão intimamente associadas. Diversos estudos demonstram que existem interações físicas e químicas como ligações de hidrogênio, forças

de Van der Walls, e ligações do tipo éster ou éter, que formam uma espécie de “rede” entre os componentes da parede celular. Dentre as ligações covalentes formadas entre a lignina e os polissacarídeos conhecidas como complexos lignina-carboidratos (LCCs), contribuem ainda mais para recalcitrância da parede celular (SCALBERT et al., 1985; ALÉN, 2000; EBRINGEROVÁ, 2006).

Um exemplo de LCC ocorre entre o ácido hidroxicinâmico e um resíduo de arabinose da cadeia lateral de uma hemicelulose, através de ligação éster. Na outra extremidade está eterificada com a lignina, conforme demonstrado na Figura 5. Esta ligação pode ocorrer através da ligação do ácido à lignina na posição α (5a) ou β (5b), sendo aquela a mais prevalente em gramíneas (LAM; KADOYA; IYAMA, 2001). Outra ligação que pode existir entre a lignina e a hemicelulose é a ligação éster entre a lignina e o carbono 6 de um resíduo de ácido urônico (SUN; TOMKISSON, 2004). Ainda, os ácidos ferúlicos e p-cumáricos podem se ligar às glucurono-arabinoxilanas através de ligações éster com o carbono 5 do grupo arabinosil (XU et al., 2005; HIMMEL et al., 2007; BIAN et al., 2012).

Figura 5: Esquema representativo de uma ligação α éter (a) e β éter (b) formadas entre lignina e hemicelulose através de um hidroxicinamato.

Fonte: Lan, Kadoya e Iiyama, 2001

2.3 Pré-tratamentos

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos visa romper as interações existentes entre os constituintes da parede celular e a sua separação através de operações que visam a redução do tamanho das partículas da biomassa, geração limitada de produtos de degradação da celulose e da hemicelulose, tudo isso com o consumo mínimo de energia e à baixo custo. Estas propriedades, aliadas a outras como a reutilização de reagentes e recuperação dos componentes solubilizados, para geração de produtos com elevado valor agregado, são parâmetros a serem avaliados para a escolha do pré-tratamento adequado (MOSIER et al., 2005; GALBE; ZACCHI, 2012).

Os métodos de pré-tratamento aplicados à biomassa lignocelulósica podem ser físicos, biológicos, mecânicos, químicos ou ainda combinar dois ou mais destes efeitos (PANDEY et al., 2000; HIMMEL et al., 2007).

A abordagem biológica de pré-tratamento utiliza microrganismos que possuem a capacidade de degradar a lignina, através da produção de enzimas extracelulares. Em geral, são empregados fungos de degradação branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia subserialis*, que são capazes de metabolizar a lignina em uma variedade de materiais lignocelulósicos, no intuito de disponibilizar os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica (HIMMEL et al., 2007; ISROI et al., 2011).

Os pré-tratamentos mecânicos utilizam a moagem, trituração ou o refinamento e tem como objetivo a diminuição do tamanho da partícula e, dependendo da intensidade do processo, podem alterar a cristalinidade da celulose (HIDENO et al., 2009; ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2014). A redução do tamanho da partícula aumenta a área superficial, o que promove uma melhora na sacarificação enzimática.

Os pré-tratamentos químicos por sua vez, solubilizam um ou mais componentes da biomassa. O tratamento com ácido sulfúrico diluído promove a hidrólise da fração hemicelulósica, com liberação de oligômeros e monômeros (HIMMEL et al., 2007). Na literatura são reportados inúmeros trabalhos visando otimizar o pré-tratamento com ácido diluído devido principalmente ao seu baixo custo e possibilidade de aplicação em larga escala (SHUAI et al., 2010; SHEKIRO III et al., 2014). A maior solubilização de hemiceluloses neste pré-tratamento em relação à celulose ocorre porque a taxa de hidrólise das hemiceluloses é maior que a da celulose, que possui estrutura cristalina. (FENGEL; WEGENER, 1983).

Em meio alcalino ocorre solubilização da lignina e hemicelulose, e quase não há solubilização de celulose (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). Entretanto, o rendimento de recuperação dos carboidratos não é total devido à ocorrência de reações de *peeling*. As reações de *peeling* ocorrem em temperaturas acima de 100° C ou em altas concentrações de álcali (HENRIKSSON, 2009). A reação tem início no terminal redutor do polissacarídeo, que sofre isomerização, gerando um próton levemente ácido ligado ao carbono 3, que ao reagir, libera o monômero (Figura 6). Além disso, a reação de *peeling* libera ácidos, como o ácido isosacarínico, que pode modificar o pH do licor (HENRIKSSON, 2009). Portanto, a estabilização da cadeia polissacarídica é necessária para prevenir a perda de açúcares por esta reação. A estratégia utilizada é a adição de agentes que reduzam ou oxidem o grupo carbonil a grupos relativamente estáveis como o boro hidreto de sódio (NaBH_4), polissulfito e a antraquinona (AQ) (AKGÜL; ÇÖPÜ, TEMİZ, 2007; HENRIKSSON, 2009; WANG et al., 2015).

Figura 6: Mecanismo da reação de *peeling* em uma glucomanana.

Fonte: Wang et al. (2015)

2.3.1. Pré-tratamento químio- termomecânico

O pré-tratamento químio-termomecânico (CTM) é composto de uma etapa de cozimento empregando reagentes químicos, ácidos ou alcalinos seguido de uma etapa de refino do material pré-tratado (ZHU et al., 2009; MENDES et al., 2011).

O pré-tratamento com sulfito foi largamente empregado em madeiras, para produção de polpas celulósicas por muitos anos, mas a partir de 1950, o emprego deste pré-tratamento diminuiu com a introdução da polpação kraft. As polpas kraft apresentam melhores propriedades mecânicas, maior recuperação de produtos químicos utilizados no processo,

menor gasto de energia e tempos de cozimento. Entretanto, o processo utilizando sulfito ainda apresenta algumas vantagens frente à polpação kraft, como a maior alvura das polpas não branqueadas, maior rendimento e não apresenta o problema da emissão de odores (ALÉN, 2000).

No pré-tratamento sulfito, ocorrem dois tipos de reações na lignina: sulfonação e clivagem das ligações no carbono α e β da lignina. A reação tem início com a desprotonação do OH fenólico, gerando uma estrutura denominada metileno quinona, pela clivagem no carbono α . Além disso, os íons sulfito presentes no meio reacional podem reagir com o carbono α da estrutura de lignina sulfonando-a. A seguir, ocorre a clivagem no carbono β das ligações β -o-aril, as mais abundantes da lignina, gerando uma intensa fragmentação da molécula que aliada a sulfonação do carbono β torna a lignina mais hidrofílica, gerando compostos solúveis no meio reacional (Figura 7) (FENGEL; WEGENER, 1983; SJOSTROM, 1993; ALÉN, 2000; HENRIKSSON, 2009).

O conteúdo de espécies sulfúricas no processo sulfito é representado por dióxido de enxofre (SO_2), íons sulfito hidrogênio (HSO_3^-) e íons sulfito (SO_3^{2-}) em proporções dependendo do pH do licor de cozimento (ALÉN, et al., 2000). Pelo equilíbrio químico, em meio ácido ($\text{pH} < 4$) observa-se maior concentração de SO_2 , enquanto que para meio neutro e alcalino ($\text{pH} > 8$), há maior predominância de HSO_3^- e SO_3^{2-} , respectivamente (SJOSTROM, 1993).

Zhu e colaboradores (2009) realizaram o pré-tratamento químio-termomecânico de madeira utilizando sulfito em meio ácido, seguido de refinamento do material, um processo que foi denominado SPORL (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose). Os resultados mostraram uma quase completa hidrólise das hemiceluloses, deslignificação parcial e sulfonação da lignina residual, favorecendo as etapas seguintes de diminuição do tamanho de partícula e hidrólise enzimática. Além disso, os fragmentos de lignina formados se ligam espécies sulfônicas do meio formando os lignossulfonatos, estruturas anfipáticas formadas por uma cadeia aromática contendo grupos de ácidos sulfônicos realocados próximos a superfície da molécula, que facilitam a interação com o meio aquoso (ZHU et al., 2009; WANG et al., 2013a; WANG et al., 2013b).

Quando a condição empregada para o pré-tratamento sulfito é alcalino as reações mais importantes ocorrem com a lignina. O processo sulfito promove maior quebra das ligações beta-O-aril (ligações mais abundantes na lignina) que a polpação soda, pois os íons sulfito são melhores nucleófilos do que os íons hidroxila. Nesse sentido, o processo sulfito

permite maior despolimerização e, conseqüentemente, maior solubilização da lignina do que o processo que utiliza apenas álcali (HENRIKSSON, 2009).

Figura 7: Mecanismo de sulfonação da lignina em meio neutro ou alcalino.

Fonte: Henriksson (2009)

Entre os polissacarídeos, as hemiceluloses são as mais susceptíveis ao tratamento sulfito alcalino. Há remoção dos grupos acetil, devido a ocorrência de reações de saponificação e dissolução de parte da hemicelulose principalmente das frações de baixa massa molar, que são mais lábeis. Em temperaturas elevadas, pode ocorrer perda de monômeros dos polissacarídeos, devido principalmente a ocorrência de reações de *peeling* (ALÉN, 2000). Além disso, há diminuição da cristalinidade da celulose e as ligações éster entre os ácidos hidroxicinâmicos e a hemicelulose ou lignina são rompidas (MENDES et al., 2011).

A utilização deste pré-tratamento, prévio à hidrólise enzimática tem alcançado altos rendimentos de açúcares (MENDES et al., 2011, MENDES et al., 2013, LAURITO-FRIEND et al., 2015). Como resultado do pré-tratamento observa-se baixa remoção de hemiceluloses, quando comparada com outros pré-tratamentos que removem associadamente a lignina, como por exemplo na polpação kraft. Além disso, o pré-tratamento químico-termomecânico empregando sulfito alcalino preserva a fração celulósica, que sofre pouca ou nenhuma remoção dependendo da carga de reagentes e da temperatura empregada, tendo como efeito na celulose a diminuição da sua cristalinidade (HENRIKSSON, 2009).

Mendes et al (2011) avaliaram o pré-tratamento químico- termomecânico do bagaço de cana-de-açúcar, com sulfito em meio alcalino e observaram através de microscopia eletrônica alterações físicas na fibra, provavelmente devido a remoção parcial de lignina e hemicelulose. Além disso, houve um inchamento da fibra e da capacidade de retenção de água, características que promoveram aumento da hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose.

2.4 Extração de xilanas

Diversos métodos têm sido investigados para a extração de xilanas de materiais lignocelulósicos. Estes métodos se baseiam na diferença de solubilidade das xilanas em ácido, água, álcool e solventes alcalinos e diferem entre si quanto ao rendimento, pureza, grau de polimerização e o padrão de substituição das xilanas extraídas. Portanto, o método de extração deve ser selecionado de acordo com as características da xilana que se deseja obter (SUN et al., 2004; 2010; PENG et al., 2012; ZHANG; SMITH; LI, 2014).

A extração de xilanas com água foi realizada por diversos autores (CYRAN; COURTIN; DELCOR, 2003; GANGULI; TURNER, 2008). Os baixos rendimentos de extração observados nestes trabalhos (inferiores a 2%) demonstram que a utilização da água, mesmo com altas temperaturas não é capaz de clivar as ligações cruzadas entre as xilanas e os componentes da parede celular. Para tentar aumentar esse rendimento, alguns tratamentos mecânicos foram combinados à altas temperaturas (200-600° C) e pressão (5-40 MPa).

As xilanas são facilmente solubilizadas e hidrolisadas em água, em temperaturas acima de 180° C. Mok e colaboradores (1992) determinaram que 100% das xilanas de vários tipos de madeira e biomassa herbácea foram hidrolisadas a 230° C, 34,5 MPa, por 2 minutos, demonstrando que as xilanas são seletivamente removidas nestas condições. Entretanto, a taxa de degradação de açúcares por este processo é elevada. Sasaki, Adschiri e Arai (2003) realizaram a quantificação dos produtos de decomposição da xilose nas condições de 360-420° C, pressão de 25-40 MPa e tempo de residência de 0,1-2,5 segundos. Os produtos encontrados foram glicolaldeído, gliceraldeído, piruvaldeído e diidroxiketona.

A extração da xilana em meio aquoso, pode ser realizada através da explosão a vapor. Neste método, a biomassa é tratada por curtos períodos de tempo em um reator com vapor saturado, a alta pressão e temperatura, seguida da descompressão súbita. Esta descompressão quebra a estrutura lignocelulósica e a lignina é prontamente despolimerizada e as hemiceluloses são rapidamente hidrolisadas. Como resultado, ocorre a degradação e

diminuição do grau de polimerização das xilanas extraídas devido às altas temperaturas e pressão empregadas no processo, o que limita a utilização das hemiceluloses extraídas através desta metodologia (CARA et al., 2006; PENG et al., 2012; ZHANG, SMITH, LI, 2014).

A extração de xilanas pode ser realizada em meio ácido, resultando em maior clivagem da cadeia e formação de xilose e xilo-oligômeros. Vena et al. (2013) estudaram o efeito da pré-extração de hemiceluloses com ácido diluído nas condições de cozimento, rendimento e propriedades da polpa kraft e soda-antraquinona de cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis*. Neste trabalho, um elevado rendimento de extração de xilana não foi vantajoso pois, a presença de xilana na polpa acima de 80%, melhorou ou manteve inalteradas algumas de suas propriedades como viscosidade, manutenção do número kappa e viscosidade da polpa.

2.4.1 Extração alcalina

O tratamento com álcali é um dos processos mais eficientes em termos de rendimento de xilana (ZHANG; SMITH; LI, 2014; AGUEDO et al., 2014). O tratamento com álcali atua clivando diversos tipos de ligações existentes entre as xilanas e os componentes da parede celular. Há a clivagem das ligações de hidrogênio com a celulose e das ligações éster, formadas através dos ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico e o ácido ferúlico) com a lignina e parte da hemicelulose é solubilizada. Além disso, parte da hemicelulose é solubilizada como consequência da ionização dos grupos laterais de ácidos urônicos carregados negativamente (GATENHOLM; TENKANEN, 2003; ZHANG; SMITH; LI, 2014).

García et al. (2013) estudaram as condições de extração a frio de arabinoxilanas de palha de trigo, através da combinação de diferentes concentrações de NaOH (80,100,120 g/L), tempo (30,60 e 90 minutos) e da temperatura (20,30,40° C), numa razão líquido-sólido de 15:1, com subsequente precipitação em etanol. Na condição otimizada (100 g/L de NaOH, 40° C, 90 minutos), o rendimento de extração obtido foi de 56% com base no material sólido resultante. Após precipitação em etanol, foram recuperadas 39,4% das hemiceluloses em relação ao seu teor inicial.

O tratamento alcalino solubiliza parte da lignina, o que diminui a pureza da xilana isolada (GATENHOLM, TEKANEN, 2003). Existem estudos propondo a utilização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e álcali para oxidar a lignina. Em meio alcalino, o peróxido de hidrogênio é altamente ativo na sua forma de ânion peroxidrila (HOO⁻), uma espécie ativa

do peróxido de hidrogênio que age sobre a macromolécula de lignina decompondo-a em ácidos mono e dicarboxílicos e compostos não fenólicos, e em menor quantidade em ácidos aromáticos e aldeídos (XIANG; LEE, 2000; PENG et al., 2012). O peróxido também quebra algumas ligações resultando em separação da hemicelulose da lignina e na diminuição da massa molar da hemicelulose, quando comparada somente com a extração com álcali (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; ZHANG; SMITH; LI, 2014).

Rabetafika et al. (2013) realizaram um estudo comparativo de três processos de extração alcalina de hemiceluloses de bagaço de pera. Em um deles utilizou-se NaOH 4M, 60° C, durante 18 horas; em outro, utilizou-se 6% de H₂O₂, em pH 11,5 ajustado com NaOH 4M, 60° C, por 18 horas; no último processo empregado, utilizou-se clorito em meio ácido, e o resíduo obtido após deslignificação foi extraído com NaOH 2M, 60° C, por 18 horas. O maior rendimento de xilana foi obtido neste último processo, devido à realização da etapa de deslignificação e consequente maior exposição das xilanas ao álcali. Em todos os três processos foram obtidas uma fração de xilana de baixa massa molar (17,3-22,4 kDa) e de alta massa molar (248-441 kDa). Os elevados valores de massa molar encontrados são atribuídos, de acordo com os autores, ao efeito da agregação das xilanas que apresentam forte tendência de se formarem em solução aquosa.

Hollmann e Lindhauer (2005) realizaram a extração de xilanas de farelo de trigo com 2% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pH 11, 40° C, por 4 horas, em escala piloto. Para obtenção de um produto final mais puro, foi realizada uma etapa de remoção de contaminantes e de xilanas de baixa massa molar com 70% de etanol à 80° C/ 4h e com água à 40° C/ 2h. O rendimento das xilanas extraídas foi de 12,8% após recuperação por precipitação em etanol.

Chimpango, Van Zyl e Görgens (2012) isolaram, caracterizaram e modificaram enzimaticamente xilanas solúveis de madeira (*Eucalyptus grandis*) e de bagaço de cana de açúcar. O rendimento das xilanas extraídas com 13% NaOH (m/v), numa relação sólido-líquido de 1:3, 60° C/ 2h, foi de 28% para o bagaço de cana-de-açúcar e de 12% para a madeira. Quando foi realizada uma deslignificação com clorito de sódio em meio ácido, seguida de solubilização com NaOH 1M, numa relação sólido-líquido de 1:10, a 25° C/ 16h, o rendimento de extração foi de 66% para o bagaço de cana-de-açúcar e de 35% para a madeira.

2.4.2 Extração enzimática

A utilização de enzimas em processos de isolamento de polissacarídeos a partir da matriz lignocelulósica é uma alternativa que objetiva principalmente diminuir o emprego de reagentes químicos nos processos, em geral com a vantagem de se poder obter um produto final mais puro, com menor teor de lignina ou outros contaminantes (ZHANG et al., 2008; HAKALA et al., 2013). O foco dos estudos de isolamento de xilana empregam a utilização de endoxilanases e outras enzimas do complexo hemicelulolítico.

Numerosas xilanases foram isoladas de bactérias, fungos e plantas, sendo possível, através de técnicas de manipulação genética clonar e aumentar a expressão destas enzimas (PUCHART; BIELY, 2008). As principais aplicações tecnológicas das xilanases são na indústria de celulose e papel, na etapa de biobranqueamento de polpas químicas (BUCHERT et al., 1994; JUTURU; WU, 2012); na produção de etanol celulósico, com a finalidade de hidrolisar a xilana em xilose para ser fermentada a etanol (SARKAR; ALVAREZ; SALDANHA, 2012); na fabricação de pães, melhorando algumas propriedades como volume, estrutura e consistência (BUTT et al., 2008).

As enzimas mais comumente envolvidas na solubilização de xilanas são endoxilanases (E.C. 3.2.1.8), que atuam clivando as ligações glicosídicas β - (1,4) da cadeia principal de xilana, diminuindo o grau de polimerização deste substrato. A xilana não é clivada de maneira randômica, o local de ligação da enzima depende da estrutura da xilana, do tamanho da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes (Figura 8) (POLIZELI et al., 2005).

As endo β -1,4 xilanases são classificadas como glicosil hidrolases (GH) pela base de dados CAZY de enzimas ativas em carboidratos (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Esta classificação é realizada através de famílias em que, proteínas da mesma família possuem sequências de aminoácidos do sítio catalítico e estruturas terciárias similares. Desta forma, as endoxilanases são encontradas nas famílias 5, 8, 10, 11, 16, 30, 43 e 62, sendo as da família 10 e 11 as mais descritas na literatura (BIELY et al., 1985; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

As xilanases da família 10 apresentam em geral massa molar maior que 30 kDa e ponto isoelétrico baixo, menor especificidade por diferentes xilanas, podendo apresentar atividade cruzada com a celulose. As xilanases da família 11, apresentam baixa massa molar e ponto isoelétrico alto, agem exclusivamente sobre a xilana. O produto principal de hidrólise

de xilana por xilanases da família 11 é maior que o produto obtido com xilanases da família 10 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; FENEL; ZITTINGA; KANTELINEN, 2006).

A reação de hidrólise catalisada por estas enzimas ocorre através de um mecanismo ácido-base envolvendo dois resíduos de aminoácidos. O primeiro resíduo atua como catalisador e protona o oxigênio da ligação glicosídica. O segundo resíduo atua como nucleófilo ao qual, no caso de enzimas com mecanismo de inversão, interage com o oxocarbonium intermediário formado promovendo a formação de um íon OH^- a partir de uma molécula de água (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

Figura 8: Local de clivagem da endo-xilanase (GH 10) na glucurono-arabinoxilana.

Fonte: adaptado de Polizeli et al (2005)

Há poucos trabalhos na literatura abordando a uso de enzimas como coadjuvantes a outros processos de extração de xilanas. Aguedo et al. (2014) realizaram a extração e caracterização das frações isoladas de arabinoxilanas de farelo de trigo com xilanases. A extração resultou em baixos rendimentos de extração (8%) e massa molar média (5-12.5 kDa). Os autores concluem que apesar da utilização de enzimas ser interessante do ponto de vista ambiental o seu rendimento foi muito baixo se comparado com os processos hidrotermal e alcalino, mas que, dependendo da arabinoxilanas que se deseja obter que estes processos podem ser combinados para obtenção do máximo rendimento de extração.

Rémond et al. (2010) estudaram o efeito do pré-tratamento de palha de trigo com amônia e endo-xilanase purificada de *Thermobacillus xylanilyticus*. Obteve-se apenas 22% de rendimento de hidrólise de hemicelulose com palha não tratada, uma solubilização de xilana 2,5 vezes menor, devido à baixa acessibilidade das enzimas à xilana. Os autores verificaram que a máxima solubilização de xilana foi de 56% após 6 horas de incubação,

empregando 350 UI de xilanases por grama de polpa, a 2% de consistência. O rendimento de xilana da polpa a 20% de consistência foi similar (57%), quando estenderam o tempo de hidrólise para 24 horas. A hidrólise da polpa com celulasas foi facilitada após a remoção enzimática da xilana.

É possível também extrair as xilanas por um ou dos passos sucessivos com um agente alcalino. Hakala et al. (2013) estudaram este procedimento para hidrólise das xilanas de uma polpa kraft comercial. Foram empregadas xilanases e/ ou endoglucanases em tratamentos prévios ou entre sucessivas extrações alcalinas. As polpas foram incubadas com xilanases e endoglucanases previamente a uma extração alcalina com NaOH 1M, na consistência de 5,5%, por 2 horas. O mesmo tratamento quando realizado entre duas etapas de extração alcalina resultou em 55% de extração de xilana na primeira extração e apenas 7% na segunda extração. No entanto, apesar do baixo rendimento, a xilana recuperada apresentou uma massa molar maior, 41,3kDa contra 36,3 kDa, obtidas no primeiro passo. Adicionalmente, na primeira extração foi recuperado cerca de 10% de xilo-oligossacarídeos, um produto de interesse que apresenta um elevado valor comercial na indústria alimentícia.

2.5 Hidrólise enzimática da celulose

O termo “celulasas” é uma denominação genérica clássica utilizada para um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente hidrolisando a celulose a partir da parede celular. Este complexo enzimático compreende as exoglucanases (celobiohidrolases), endoglucanases e as β -glicosidases.

As endoglucanases atuam clivando randomicamente as regiões internas da cadeia de celulose, preferencialmente nas regiões amorfas, diminuindo o grau de polimerização da mesma. Algumas endoglucanases podem ser processivas, agindo por clivagens consecutivas de uma única cadeia polissacarídica através do sítio ativo (HORN et al., 2012)

As exo-1,4-glucanases ou celobiohidrolases são enzimas processivas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas próximas aos terminais da molécula de celulose, liberando celobiose e algumas celodextrinas (ZHANG et al., 2006). Podem ser classificadas em dois grupos, CBH1 e CBH2, sendo que a primeira atua nas extremidades redutoras da celulose, e a segunda, nos terminais não redutores (TEERI et al., 1997). As celobiohidrolases são essenciais para a degradação efetiva da maior parte da celulose cristalina. Por fim, as β glicosidases convertem a celobiose (dímero de glicose) em glicose (Figura 9) (HORN et al., 2012).

Figura 9: Enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose. Enzimas hidrolíticas: endo-glucanases (EG), exo-glucanases (CBH1, CBH2), β -glicosidase. Enzimas oxidativas: mono-oxigenases líticas (AA9).

Fonte: adaptado de Horn et al. (2012)

Uma das propriedades destas enzimas é a atuação em sinergismo, alvo de diversos estudos na literatura que demonstram que a eficiência de hidrólise destas enzimas é muito maior quando elas são utilizadas conjuntamente. Tais estudos demonstram que as enzimas que tem ação endo atuam gerando novos terminais redutores e não redutores para a ação das enzimas que possuem ação exo, as quais, liberam celobiose que é convertida em glicose, pelas β glicosidases (HORN et al., 2012).

Além das enzimas que atuam clivando hidroliticamente a celulose foram descobertas enzimas que atuam através de um sistema enzimático oxidativo. Dentre estas, as monooxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (LPMOs) são uma nova classe de enzimas com ação oxidativa em polissacarídeos. Dentre estas temos a AA9 e AA10 (HEMSWORTH; DAVIES; WALTON, 2013). As enzimas oxidativas ao promoverem a clivagem oxidativa da celulose atuando em sinergismo com as celulasas também aumentam a eficiência de hidrólise da celulase. O sinergismo entre estas enzimas e as celulasas clássicas são interessantes porque podem diminuir as cargas de enzimas e o tempo de hidrólise gerando uma importante redução de custos no processo (HU et al., 2014).

2.5.1 Fatores que limitam a hidrólise da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é limitada por uma série de fatores que podem estar relacionados com o substrato, tais como características físicas, químicas ou morfológicas ou a com a enzima, como sua atividade, inibidores, estabilidade térmica e propriedades de adsorção (SUN et al., 2016).

Com relação aos fatores ligados ao substrato, a própria matéria-prima em questão, pode apresentar uma complexidade estrutural que restringe o acesso das enzimas à celulose principalmente quando se trata de substratos lignocelulósicos. A cristalinidade da celulose, a área superficial, o tamanho de partículas, a presença de outros componentes (xilana, lignina), a porosidade do material e grau de polimerização são fatores determinantes na conversão química e biológica da celulose. Especificamente, a estrutura cristalina da celulose é recalcitrante a hidrólise enzimática, pois as celulasas geralmente possuem um tamanho grande (3-18nm), dificultando o acesso das enzimas nessa estrutura altamente compactada resultando em uma baixa hidrólise principalmente dos cristais da superfície, em contrapartida a parte amorfa que é mais facilmente hidrolisável (YANG; WYMAN, 2004; SUN et al., 2016).

Entre os citados, acredita-se que a área superficial acessível da celulose seja uma das mais cruciais para os substratos lignocelulósicos (SINITSYN; GUSAKOV; VLASEN, 1991; ARANTES; SADDLER, 2011; SANTI-JUNIOR et al., 2013; SUN et al., 2016).

A influência da porosidade de amostras de bagaços de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática da celulose foi estudada por Santi-Junior et al (2013). Os autores mostraram que a secagem diminui a acessibilidade das enzimas à celulose devido ao colapso das fibras de celulose. No estudo envolvendo a remoção seletiva e gradual da lignina do bagaço, foi observado aumento do volume e da área superficial dos poros, levando a um aumento na eficiência de hidrólise enzimática da celulose. Além desse efeito, a lignina pode diminuir a eficiência da hidrólise enzimática através de outros mecanismos. Ela pode inibir diretamente a atividade catalítica das enzimas, pode promover adsorção inespecífica das celulasas, atuar como barreira física diminuindo o acesso ao substrato e ainda, o tipo e a estrutura e sua distribuição ao longo da parede celular podem influenciar na taxa de hidrólise da celulose pelas celulasas (JUNG et al., 2013; VAN DYK; PLETSCHEKE, 2012).

Varnai et al (2010) avaliaram a restrição exercida pela lignina e a hemicelulose à hidrólise enzimática de serragem de madeira (*spruce*) pré-tratado a vapor e mostraram que a lignina foi o fator que mais restringiu a hidrólise.

A presença de complexos lignina-carboidratos (LCCs) também podem ter influenciado nesse efeito pois dependendo do pré-tratamento aplicado, principalmente em solução aquosa, os LCCs podem formar estruturas em forma de micela, nas quais a lignina hidrofóbica pode se ligar no centro e os polissacarídeos ficariam dispostos na superfície tornando-a mais atrativa a adsorção improdutiva das enzimas (ZENG et al., 2014)

A adsorção é um fenômeno essencial para que ocorra a interação entre as enzimas e o substrato e promova uma maior taxa de hidrólise desse substrato. Diversos fatores afetam a adsorção, algumas características do substrato como sua complexidade, presença de lignina, pré-tratamento empregado, área superficial e volume de poros (BOUSSAID; SADDLER, 1999; VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Apesar de ser um fenômeno essencial, a adsorção de enzimas à outras moléculas, que não o substrato, pode afetar a eficiência de hidrólise da celulose através da diminuição da quantidade de enzima disponível para se ligar a celulose. Neste contexto, a presença de lignina nos substratos lignocelulósicos tem-se mostrado como a principal responsável por esse fenômeno. Boussaid e Saddler (1999) demonstraram que altos níveis de adsorção improdutiva foram encontrados na hidrólise de substratos lignocelulósicos, especificamente à lignina o que levou a uma diminuição da eficiência de hidrólise e ao aumento da quantidade de enzima requerida para sobrepor esse fenômeno.

A hemicelulose, de maneira similar à lignina, também pode limitar a hidrólise da celulose por diminuir o acesso ao substrato. Mussato et al (2008) avaliaram como a remoção de lignina e hemicelulose influenciariam na hidrólise enzimática da celulose de bagaço de malte, destacando o efeito negativo da hemicelulose, uma vez que quando houve remoção de 86,5% desta e apenas 14% da lignina, a conversão de celulose aumentou 3.5 vezes em relação ao material não tratado.

Reiterando o efeito negativo da hemicelulose, Cortez et al. (2014) mostraram que a remoção de hemicelulose teve maior efeito na conversão de celulose que a lignina pois, os bagaços de dois híbridos de cana de açúcar (87 e 140) avaliados que continham teores semelhantes de lignina, mas diferentes teores de hemicelulose apresentavam diferenças na conversão enzimática da celulose. Os autores atribuíram esse efeito ao fato de que a hemicelulose residual recobre as fibras de celulose limitando o acesso ao substrato alvo.

A remoção prévia de hemicelulose tem sido reportada como um procedimento que promove melhoras na conversão de celulose, em comparação ao substrato sem pré-tratar. Liu et al. (2016) avaliaram a utilização de técnicas auxiliares, tais como, irradiação por micro-ondas e utilização de líquidos iônicos, para reforçar a eficiência do pré-tratamento

com álcali em bagaço de cana de açúcar na sacarificação enzimática da celulose. Como resultados, a conversão de glucana foi superior a 90% pois, o pré-tratamento com álcali promoveu remoção de lignina e hemicelulose, o que aumentou a área superficial acessível da celulose.

2.6 Considerações sobre a Revisão Bibliográfica

O interesse na obtenção de xilana sofreu um incremento acentuado nos últimos anos, com o desenvolvimento de métodos eficientes no seu isolamento que levam à sua obtenção em condições de elevada pureza e rendimento.

Uma fonte de baixo custo de xilana é o bagaço de cana-de-açúcar. Tradicionalmente, as xilanas podem ser isoladas por extração alcalina e recuperadas por neutralização ou recuperação com etanol. No entanto, apesar do vasto trabalho que tem sido desenvolvido sobre o assunto, o isolamento de xilanas a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e do licor obtido após o pré-tratamento ainda carecem de maiores estudos científicos.

Desta forma, foram apresentadas informações sobre alternativas de isolamento e caracterização de xilanas para produção de bioprodutos e a integração de processos visando a utilização da celulose residual para obtenção de açúcares solúveis.

3.OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver um novo conceito para aproveitamento de xilanas, através da sua remoção por método químico ou enzimático a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, avaliando-se as suas características físico-químicas e a degradabilidade enzimática da celulose residual.

Objetivos específicos

- Avaliar métodos de isolamento de xilanas residuais do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino e do licor;
- Investigar metodologias de caracterização e utilização das xilanas;
- Avaliar a conversão enzimática da celulose residual para produção de glicose, com vistas à produção de etanol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi cedido pela Usina Filial Onda Verde, de Caeté/SP. O bagaço foi seco ao ar até cerca de 10% de umidade, ensacado e estocado em temperatura ambiente até a sua utilização.

4.2 Pré-tratamento

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Mendes et al. (2011) e consistiu na introdução de seiscentos gramas de bagaço (massa seca) em um reator de aço inox, com abertura para saída e retirada de ar onde, uma bomba de vácuo foi conectada na abertura do reator e, acionada por 30 minutos. Após este tempo, com o auxílio de uma mangueira, foi adicionada ao reator uma solução sulfito alcalino em água destilada, preparada com 5% (m/m) de NaOH e 10% (m/m) de Na₂SO₃, numa razão sólido/líquido de 1:10 (p/v). Após este procedimento, fez-se novamente vácuo no reator por 15 minutos, de modo a permitir a impregnação da solução no bagaço, antes de transferi-lo para uma autoclave. O pré-tratamento foi então conduzido à 121 °C, por 120 minutos.

Após a etapa de cozimento, esta suspensão foi filtrada para remoção do licor, que foi recirculado três vezes, para retenção dos finos. O licor foi coletado e armazenado à 4° C, enquanto que o bagaço foi lavado com água até pH 7,0. O bagaço foi centrifugado por 30 minutos e a água foi coletada e utilizada para diluir o bagaço pré-tratado para um volume de 25 L (2,4% de consistência) para ser refinado no aparelho Regmed MD-300 com uma distância entre os discos de 0,1 mm e consumo de energia de 250 W. Após o refino, a polpa obtida foi filtrada a vácuo, e o licor foi recirculado para retenção dos finos, até não ser observada turbidez. A polpa foi seca em temperatura ambiente até cerca de 70% de umidade e foi denominada de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e lavado (BLA).

Alternativamente, o bagaço após autoclavagem não foi lavado, e teve seu volume completado para 25 litros com adição de água para que fosse realizada a etapa de refino do bagaço pré-tratado, sob as mesmas condições anteriormente mencionadas. Este bagaço foi denominado bagaço pré-tratado com sulfito alcalino não lavado (BNL).

4.3 Métodos de extração das xilanas

4.3.1. Extração de xilana pelo Método de Lopez

Para este procedimento de extração foram utilizados 100 g dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (10% Na_2SO_3 e 5% NaOH), lavado (BLA) e não lavado (BNL). Foi empregado o método descrito por De Lopez, Tissot e Delmas (1996), cujo procedimento consistiu em utilizar NaOH 13% (m/m) e na relação sólido-líquido de 1:3, levando em consideração a umidade dos bagaços pré-tratados (Figura 10).

A reação foi realizada dentro de sacos plásticos, para permitir uma melhor homogeneização da solução de NaOH no bagaço, em razão da alta consistência e foi conduzida em banho-maria à 60° C, por 2 horas. Após o tratamento, o material foi filtrado e lavado com 400 ml de água quente (60° C). O procedimento de lavagem foi repetido três vezes, os volumes dos líquidos resultantes foram reunidos e foi realizada a correção do pH para 5, com ácido acético glacial. O material foi concentrado em roto-evaporador até a redução de cerca de um terço do volume inicial.

Após esta etapa, foi adicionado etanol (95%) na relação 2:1 (etanol:filtrado) e esta solução foi deixada por uma noite em geladeira à 4° C, para precipitação das xilanas. O precipitado foi recuperado por centrifugação (2055 x g, 10 min), lavado com etanol 95% e centrifugado novamente. O resíduo obtido foi congelado a -60° C em ultrafreezer, liofilizado para secagem completa e pesado para determinação do rendimento da extração.

Figura 10: Fluxograma de extração de xilana pelo método de Lopez.

Fonte: arquivo pessoal.

4.3.2. Extração de xilana pelo Método de Hoije

Para este procedimento, o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BLA) e não lavado (BNL) foram processados seguindo o método de Høiye et al. (2005) (Figura 11). Para 100 g de bagaço foi utilizado 1L de HCl 0,05M, para remoção de impurezas (compostos solúveis gerados no pré-tratamento e possíveis contaminantes presentes). Após 16h de incubação, o material foi centrifugado (2055 g, 15 minutos), o sobrenadante foi descartado e ao bagaço livre de contaminantes, foi adicionado 1L de água destilada, sendo o pH da solução corrigido para pH 4,0 através da adição de ácido acético glacial. Parte da lignina do bagaço pré-tratado foi removida por adição de 22 gramas de clorito de sódio (80% de pureza) e esta solução foi transferida para o banho-maria à 75° C, por 2 horas.

Após a deslignificação parcial, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e centrifugada (2055 x g, 15 minutos). Os sólidos foram lavados com água destilada e centrifugados novamente nas mesmas condições descritas. Ao resíduo foi adicionado 1L de NaOH 1M, contendo 0,5% de NaBH₄ e incubado à 25° C, por 16 horas. O material foi filtrado e o pH do líquido solubilizado foi ajustado para 7,0 com adição de HCl (37% m/m). Após neutralização, a solução foi concentrada em rotoevaporador até cerca de um terço do volume inicial e dialisada em membrana de acetato de celulose, com corte de 12 KDa, contra água deionizada à 4° C, por cerca de 24 horas, sendo posteriormente congelada em ultrafreezer a - 60° C, liofilizada e pesada para cálculo do rendimento de extração.

Figura 11: Fluxograma de extração de xilana pelo método de Höije.

Fonte: arquivo pessoal.

4.3.3. Extração enzimática

O experimento foi conduzido com os bagaços pré-tratados lavado (BLA) e não lavado (BNL), na consistência de 5% (p/v) dentro de elenmeyers de 250 mL, com agitação recíproca de 120 rpm. Foi utilizado o preparado comercial de xilanase de *Bacillus licheniphormes*, Luminase PB-100, produzido pela empresa Verenium, com atuação de 40 a 70° C e entre pH de 5 a 8,5.

A reação foi conduzida com 8UI de xilanase por grama de bagaço pré-tratado, 5% de consistência em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8 e 0,01% de azida de sódio (m/v) (REINOSO, 2014). A incubação foi realizada a 50° C, durante 24h e após este tempo, as amostras foram fervidas por 5 min com finalidade de interromper a hidrólise. O hidrolisado foi então submetido a um processo de filtração a vácuo, utilizando papel de filtro para separação do sobrenadante e do sólido residual. A seguir, o sobrenadante foi liofilizado e pesado para verificar o rendimento de sólidos.

Figura 12: Fluxograma de extração de xilana utilizando xilanase.

Fonte: arquivo pessoal.

4.4. Precipitação de hemiceluloses do licor resultante do pré-tratamento com sulfito alcalino

As xilanas, presentes no licor sulfito alcalino, foram precipitadas no meio utilizando-se etanol. Este processo foi realizado adicionando-se etanol 95% em 100 mililitros de licor na proporção de 2:1. A solução foi homogeneizada e em seguida deixada em repouso durante 16 h para decantação do precipitado. Ao término desse tempo, a solução foi centrifugada a 4000 g, por 15 minutos, e o sobrenadante foi removido e o precipitado remanescente foi lavado com mais duas dosagens de etanol (200 ml em cada), centrifugado novamente sendo o sobrenadante removido. As xilanas precipitadas foram liofilizadas para a secagem e determinação do rendimento de sólidos.

4.5. Pós-hidrólise dos açúcares solúveis das xilanas isoladas com xilanase e do licor

Para avaliar o rendimento de xilana foi realizada a pós-hidrólise do material recuperado do licor e da extração com xilanases de acordo com a metodologia de Sluiter (2008). Uma alíquota de 200 µl da xilana foi diluída em 1,0 ml de água destilada. A seguir, foi determinado o pH desta solução e adicionado uma alíquota de 10µl de HCl concentrado com a finalidade de diminuir o pH. Dependendo do pH obtido, foi adicionado um volume de H₂SO₄ 72% (tabelado) para obter uma concentração final de 4% de H₂SO₄. Após este procedimento, os volumes das soluções foram ajustados para 2 ml em balão volumétrico e a seguir, foram transferidas para frascos de vidro rosqueado e autoclavados à 121° C, 1 atm, por 60 minutos.

Como controle foi utilizada 5ml de uma solução de xilose a 0,15 g/l, sendo que metade foi autoclavada nas mesmas condições do ensaio e outra metade não foi autoclavada, a fim de comparar a concentração de xilose entre os procedimentos.

As concentrações de açúcares monoméricos (glicose, xilose, arabinose) e o acetil, presentes na fração solúvel foram determinadas por HPLC (WATERS) provido de amostrador automático e detector de índice de refração. As análises dos açúcares foram realizadas a 35° C em uma coluna HPX87H (BioRad) com fase móvel composta por 0,005 mol/L de ácido sulfúrico e um fluxo de 0,6 ml/ min. Os açúcares foram quantificados levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise: 0,9 para a celulose, 0,88 para a xilana e arabinosil. As áreas dos cromatogramas foram convertidas em concentração

utilizando curvas de calibração previamente construídas utilizando soluções padrão de glicose, xilose, arabinose e ácido acético.

4.6. Cálculos de Rendimento

4.6.1. Rendimento de sólidos

A rendimento de sólidos foi calculado relacionando-se a massa (em gramas) recuperada da extração pela quantidade xilana presente no bagaço pré-tratado, segundo a equação 1.

$$RS = \frac{m_{(g)} * 100}{F * m_{bag}} \text{ Eq. (1)}$$

RS= rendimento de sólidos (%)

$m_{(g)}$ = massa obtida (g)

m_{bag} = massa inicial do bagaço pré-tratado submetido a extração (g)

F= porcentagem de xilana presente no bagaço.

4.6.2. Rendimento de xilana

O rendimento de xilana foi calculado relacionando a quantidade de xilana (xilose, arabinosil e ácidos urônicos) obtida (em gramas), pela quantidade de xilana no bagaço submetido a extração (também em gramas), segundo a equação 2.

$$RX = \frac{(m_{xil} - m_{con}) * 100}{F * m_{bag}} \text{ Eq. (2)}$$

RX= Rendimento de xilana (%)

m_{xil} = massa de xilana (g)

m_{cont} = massa de contaminantes (lignina, acetato de sódio)

m_{bag} = massa inicial do bagaço pré-tratado submetido a extração (g)

F= porcentagem de xilana presente no bagaço.

4.7 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina

A análise da composição química, dos bagaços e das xilanas obtidas através das metodologias químicas de extração, foi realizada de acordo com Ferraz et al., (2000), onde foram analisados os teores de açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose), acetil e lignina presente nas amostras.

O procedimento de caracterização química foi realizado da seguinte maneira: três gramas do bagaço moído (25 mesh) foram inicialmente extraídos com 95% de etanol por 6 h, em um aparelho Soxhlet. Esta etapa do procedimento não foi realizada com as xilanas.

A seguir, após a secagem do material ao ar, transferiu-se 300 mg da amostra (massa seca) para tubos de ensaio. A estes, foi adicionado 3 ml de ácido sulfúrico 72%. Os tubos foram colocados em um banho maria a 30° C, por 1 h, sendo homogeneizada a cada 15 minutos com o auxílio de um bastão de vidro. A seguir, esta suspensão foi transferida para um erlenmeyer de 250ml e foi adicionado 79 ml de água destilada para reduzir a concentração final do ácido para 4% m/m e em seguida foi autoclavada à 121° C, 1 atm, por 1 h.

O material resultante deste tratamento foi resfriado, vertido em filtro de vidro poroso (número 3), previamente tarado, e seco até massa constante, a 105 °C. A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria e a solúvel por espectrofotometria a 205 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm.

As concentrações de açúcares monoméricos (glicose, xilose, arabinose) e o acetil, presentes na fração solúvel foram determinadas por HPLC conforme descrito no item 4.5.

4.8 Determinação de ácidos urônicos

A determinação de ácidos urônicos foi realizada através do método do ácido sulfúrico-carbazol (Li et al. 2007). As xilanas isoladas dos bagaços pré-tratados hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (item 4.7) e este hidrolisado foi utilizado para a dosagem destes ácidos. Um volume de 400µL dos materiais solúveis em ácido foi adicionado em um tubo de ensaio, seguido da adição de 80µl de uma solução de ácido sulfâmico 4M. A seguir, foi adicionado 2,4 ml de ácido sulfúrico concentrado e quando esta mistura atingiu a temperatura ambiente, foi adicionado 0,1 ml de solução carbazole (0,1% m/v em etanol). O tubo foi então homogeneizado em vórtex, fechado com filme de polietileno e a mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 100° C, por 20 minutos, seguida de resfriamento

em banho de gelo. Após resfriamento foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525 nm, a qual foi convertida em concentração de ácido urônico através da curva analítica do ácido glucurônico (0,1-1,3 $\mu\text{mol/ml}$).

Para validar o método colorimétrico de determinação de ácidos urônicos foram realizados experimentos utilizando uma xilana comercial de *beechwood* (Megazyme, Lote: 141101a). A partir do valor de ácido glucurônico obtido pelo método de Li et al. (2007) e do valor fornecido pelo fabricante (9,4%) foi determinado um fator de correção de 0,4. Este fator foi usado para corrigir os dados de teor de ácidos urônicos obtidos nas amostras de xilanas recuperadas dos bagaços pré-tratados.

4.9 Determinação de ácidos hidroxicinâmicos

Utilizou-se 50 mg de bagaço (massa seca) e 0,5 mg de antraquinona em reatores de aço inoxidável de volume útil de 80 ml. Ao reator, foi adicionado 4 mL de uma solução de NaOH 4M. Os reatores foram fechados e colocados em banho de silicone a uma temperatura constante de 170° C, durante 2 horas. Após este tempo foram resfriados e a mistura foi acidificada até pH 2. O volume da suspensão foi ajustado para 25 ml em balão volumétrico e mantida em repouso a 4° C por 12 horas (GRABBER et al., 2000).

Ao final do tempo de repouso, uma pequena alíquota do sobrenadante foi coletada e filtrada em membrana de 0,45 μm . Para quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cumáricos e ferúlico), as amostras filtradas foram analisadas em um cromatógrafo AKTA (GE), utilizando uma coluna ODS Hypersyl da Thermo Scientific. Utilizou-se um fluxo de 0,8 ml/min de uma fase móvel contendo acetonitrila:água (1:4 v/v) com 1% de ácido acético e um detector UV ajustado em 315 nm.

4.10 Análise de açúcares por cromatografia de camada delgada

A análise de açúcares por cromatografia em camada delgada (TLC) foi realizada em placas de sílica gel 60 F254 (Merck) empregando como eluente uma mistura contendo acetato de etila: ácido acético: propanol: ácido fórmico: água (25: 10:5:1:15) (PUCHART; BIELY, 2008).

As amostras e padrões foram aplicados a 1 cm da parte inferior da placa a uma distância de 0,5 cm uma da outra. Foram feitas aplicações sucessivas de 1 μL na placa e, a

seguir, deixou-se secar a placa em temperatura ambiente antes de se iniciar a corrida cromatográfica. Um béquer foi utilizado como cuba, devidamente tampado com plástico filme para acondicionar o eluente e a placa.

A placa foi introduzida na posição vertical, e após o eluente ascender ao topo da placa, a mesma foi retirada e seca com o auxílio de um secador elétrico até completa evaporação do eluente. Para o preparo da solução reveladora foram utilizados 1,8 g de N(1-Naftil)-etileno diamina dihidroclorato em 200 mL de etanol, sob agitação magnética constante para dissolução, seguida da adição lenta de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. A revelação das amostras foi realizada pela aplicação da solução reveladora na placa de sílica, a mesma, foi deixada secar ao ambiente e posteriormente em estufa a 100°C por aproximadamente 5 min. Após o aparecimento das manchas, a placa foi digitalizada.

4.11 Determinação dos teores de furanos e fenólicos do licor

As concentrações de furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido furóico) e fenólicos de baixa massa molar (ácidos gálico, vanílico, p-cumárico, siríngico e ferúlico; álcool vanilil e vanilina) foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando um detector UV (a 276 nm) e coluna Waters Spherisorb C18 5 µm ODS2 4,6 x 100 mm sob as seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL e detector UV a 276 nm. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.12 Determinação da massa molar aparente das xilanas

A massa molar de xilo-oligômeros foi determinada por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), utilizando uma coluna empacotada com resina de poliácridamida Biogel P2 (100 x 1,5 cm – Bio Rad), com faixa de separação de 800-1800 g/mol, utilizando como eluente o tampão fosfato 50 mM pH 8,0. Um volume de 500 µL de xilanas com um fluxo de 0,34 mL/ minuto dissolvidos no eluente foi aplicado na coluna. A coluna foi calibrada com glicose (180g/mol), maltose (340g/mol), rafinose (504 g/mol), vitamina B12 (1355g/mol), dextrana T3.5 (3500 g/mol) e dextrana T6 (6000 g/mol) respectivamente.

A massa molar das xilanas poliméricas foi determinada por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), utilizando a coluna empacotada com a resina de poliacrilamida Biogel P30, com faixa de separação de 2.500-40.000 g/mol. O fluxo utilizado foi de 0,3ml/min e, 400 µL das xilanas foram aplicadas na coluna. Para esta coluna, a curva de calibração foi construída utilizando glicose (180 g/mol), vitamina B12 (1355 g/mol), lisozima (14300 g/mol), anidrase carbônica (29000 g/mol), álcool desidrogenase (150000 g/mol).

Para ambas as colunas os dados da calibração foram linearizados em uma equação do tipo $\log M = a + bVe$, onde M é a massa molar e Ve o volume de eluição, a e b representam os coeficientes da equação. A detecção dos xilo-oligossacarídeos e xilanas eluídos da coluna foi realizada pelo método do fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A área dos cromatogramas correspondente aos picos foi dividida em n áreas parciais. Cada área parcial será aproximada à área de um trapézio, sendo que cada incremento de volume de eluição a massa molar (M_i) foi calculada pela curva de calibração. A massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) foram calculadas através das seguintes equações 3 e 4:

$$M_w = \frac{\sum \text{Área} M_i}{\sum \text{Área}_i} \quad \text{Eq.(3)}$$

$$M_n = \frac{\sum \text{área}_i}{\sum \frac{\text{Área}_i}{M_i}} \quad \text{Eq.(4)}$$

A dispersividade ($\bar{D}$) foi calculada pela relação M_w/M_n .

4.13 Solubilidade das xilanas em água

A solubilidade das xilanas foi analisada na concentração de 5% (m/v), a 60° C, com agitação de 120 rpm, por 6 horas. As soluções de xilana foram centrifugadas a 23600 x g, por 20 minutos e retirada uma alíquota de 200 µl do sobrenadante e análise dos açúcares solúveis por HPLC conforme descrito no item 4.5.

A solubilidade da xilana de *beechwood* (Megazyme, Lote: 141101a) foi determinada e a ela foi atribuída o valor de 100% de solubilidade. A solubilidade relativa das xilanas extraídas dos bagaços pré-tratados foi calculada em relação a esta xilana.

4.14 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada para as xilanas isoladas dos bagaços pré-tratados e com a xilana de *beechwood* (Megazyme, Lote: 141101a).

As amostras de xilanas foram moídas a 25 mesh e cerca de 1 mg foi homogeneizada com KBr. Os espectros de IR foram obtidos utilizando um equipamento Perkin Elmer-Spectrum GX, a partir de 32 scans, na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . Foi selecionada a região de 800-1800 cm^{-1} a qual corresponde à região utilizada para xilanas extraídas em meio alcalino. A linha base foi corrigida em regiões próximas a 4000, 2400 e 800 cm^{-1} , e o espectro foi normalizado em 1050 cm^{-1} .

Com a finalidade de avaliar o teor de ácidos urônicos das xilanas por FT-IR utilizou-se amostras de xilana de *beechwood* (Megazyme, Lote: 141101a). À xilana foram adicionadas concentrações conhecidas de ácido glucurônico 2,5%; 5%; 10% e 15% (m/m) e analisado o incremento da banda em 1735 cm^{-1} . As absorbâncias foram relacionadas com a concentração de ácido glucurônico presente em cada amostra em uma curva de calibração.

4.15 Determinação de atividade enzimática

4.15.1 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada de acordo com o método de BAILEY; BIELY e POUTANEN (1992), com adaptações na metodologia. Foram adicionados 0,9 mL de xilana 1 %, preparada em tampão fosfato 50mM, pH 8,0 e 0,1 mL de solução enzimática em tubo de ensaio que foi incubado a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi colocado em banho com água fervente, por 5 minutos. Após o resfriamento, realizou-se a leitura da absorbância da reação a 540 nm, para determinação dos açúcares redutores presentes (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi) (MILLER, et al. 1969).

Foi feito um controle para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes da adição da enzima, para descontar os açúcares redutores presentes. A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 16 e 20 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 μmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

4.15.2 Celulases totais

Para a determinação da atividade de celulases totais foi adotada a metodologia descrita por Ghose (1987). Em tubos de ensaio de 25 mL, adicionou-se tiras de 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8). Para dar início à reação, foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas. Após o tempo de 60 minutos, as reações foram interrompidas com 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e fervidas durante 5 minutos. Logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a leitura da absorbância foi feita à 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de glicose liberada no meio foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose.

Para o cálculo da atividade de celulases totais (FPU), primeiramente foi estimada a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose. Para isso, foi plotado um gráfico da concentração do extrato enzimático em relação à massa de glicose liberada na reação. Após encontrar a diluição enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose (uma diluição enzimática de 1/200 equivale a 0,005), a atividade enzimática foi determinada pela Equação 5.

$$\text{FPU/ml} = \frac{0,37}{\text{Diluição correspondente a liberação de 2 mg de glicose}} \quad \text{Eq.(5)}$$

Uma unidade de papel de filtro (FPU) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto. O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 μmol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra e o tempo de reação, conforme se segue:

$$2 \text{ mg de glicose} = 11,11 \mu\text{mol de glicose}$$

$$2 \text{ mg de glicose} = 11,11 \mu\text{mol de glicose} \times (1/60 \text{ min.}) \times (1/0,5 \text{ mL})$$

$$2 \text{ mg de glicose} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1})$$

4.15.3 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com base na metodologia de Tan; Mayers e Saddler (1987) empregando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (SIGMA) como substrato. As reações foram conduzidas a 50°C, adicionando-se 0,4 mL de solução

0,1% pNPG, preparado em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, a 0,1 mL do extrato enzimático diluído no mesmo tampão. Após 15 minutos, foi adicionado 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%, para interromper a reação, e a absorbância da amostra foi determinada a 410 nm. O controle de reação foi preparado de maneira semelhante, adicionando-se, no entanto, a solução de bicarbonato antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de pNP (p-nitrofenol) liberado utilizando uma curva de calibração de pNP (0 – 0,5 mmol / mL).

4.16 Ensaios de hidrólise dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados

Os bagaços pré-tratados com sulfito alcalino e os resíduos de celulose obtidos após foram secos ao ar e moídos (25 mesh) para realização da hidrólise enzimática.

A hidrólise foi realizada a uma consistência 5% (m/v). As reações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 ml, com agitação recíproca de 120 rpm, a 45° C, por 72 horas. Os bagaços foram hidrolisados com 5 FPU/ g de glucana de celulasas (Celluclast- Sigma) e 10 UI/ g de glucana de β -glicosidase (Novozyme 188- Sigma). A hidrólise foi conduzida utilizando-se tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida 0,01% (m/v). Alíquotas de 700 μ l foram retiradas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 h, e estas alíquotas foram em seguida fervidas por 5 min. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 24.150 g por 15 minutos. Os carboidratos presentes no sobrenadante foram analisados por HPLC, conforme descrito no item 4.6. A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada utilizando-se a massa de glicose obtida após a hidrólise dividida pela massa de glucana presente no bagaço, de acordo com a Equação 6. A hidrólise enzimática de xilana (CEX) foi acompanhada pela análise de xilose e a conversão de hemicelulose calculada de acordo com a Equação 7.

$$CEC = \left(\frac{\text{Glicose}}{\text{Glicose potencial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

$$CEX = \left(\frac{\text{Xilose}}{\text{Xilose potencial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução sulfito alcalino (10 % Na_2SO_3 e 5% NaOH), seguido do refino, produziu materiais com rendimentos de sólidos de 75,8% e 88,6% dependendo se o bagaço foi lavado ou não após o seu processamento (Tabela 2). Essa diferença observada nos rendimentos é coerente, uma vez que o pré-tratamento favorece reações de degradação e sulfonação, principalmente da lignina, gerando compostos mais solúveis em água, em especial os lignossulfonatos, resultando em um rendimento em massa menor na condição em que o bagaço foi lavado (HENRIKSSON, 2009; MENDES et al., 2011, WANG et al., 2013b).

A composição química dos bagaços antes e depois de pré-tratados encontra-se na Tabela 2. O bagaço não tratado apresenta 21,1% de lignina, 40,4% de glucana, 22,4% de xilana, 2,6% de arabinosil e 3,3% de acetil. Esta composição foi similar à encontrada em bagaços de outras procedências, conforme reportado por Laurito-Friend et al. (2015) e Andrade e Colodette (2014), porém com valores de lignina um pouco superiores (24 e 22.5% respectivamente) atribuídos a fatores como a espécie de cana, o tempo de colheita, variações climáticas, dentre outros (MASARIN et al., 2011).

O pré-tratamento com sulfito alcalino removeu 43% de lignina e 8% de xilana do bagaço. Depois da etapa de lavagem do material, observou-se uma maior dissolução da lignina (53%) e de xilana (17,4%), e também uma pequena solubilização de glucana (5%). Em outros trabalhos, utilizando as mesmas condições de pré-tratamento do bagaço de cana, seguido da lavagem do material, foi computada uma remoção de lignina de cerca de 50%, confirmando a reprodutibilidade entre diferentes amostras de bagaço e também a seletividade do pré-tratamento para este componente (MENDES et al., 2011; LAURITO-FRIEND et al., 2015). O processo sulfito promove maior quebra das ligações beta-O-aril que a polpação soda, pois os íons sulfito são melhores nucleófilos que os íons hidroxila. Nesse sentido, o processo sulfito permite maior despolimerização e, consequentemente, maior solubilização da lignina (SJOSTROM, 1993).

Com relação aos polissacarídeos, a maior solubilização de xilana em relação à glucana deve-se a sua menor massa molar e estrutura amorfa (FENGEL e WEGENER, 1983). Além disso, as xilanas têm substituintes de ácidos metil glucurônicos carregados negativamente que tendem a aumentar a repulsão, favorecendo a dissolução (GOMES;

CHIMPHANGO; GÖRGENS, 2015). Entretanto, as xilanas ainda são mais preservadas neste pré-tratamento, quando comparadas a outros pré-tratamentos alcalinos reportados na literatura (YU et al., 2009; GAO et al., 2013).

O bagaço original continha 27,9% de xilana, considerando os teores de xilose, grupos arabinosil e acetil e, após o pré-tratamento 18% de xilana foi solubilizada do bagaço não lavado e 26% do bagaço lavado. Com relação às frações que compõem a xilana essa redução deve-se em parte a quase completa remoção dos grupos acetil (maior que 90% nos dois pré-tratamentos), não tendo sido observada remoção de grupos arabinosil. Considerando ainda que as xilanas podem se apresentar na forma de moléculas agregadas como na forma de moléculas individuais, após o pré-tratamento apenas xilanas individuais e de menor massa molar, mais solúveis em água, devem ter sido removidas pela etapa de lavagem (ALÉN, 2000). O restante das xilanas que fica retida no material tende a se associar através de interações entre as partes não substituídas da cadeia. Além disso, as xilanas podem conter substituintes aromáticos, por exemplo resíduos de lignina ligados covalentemente, favorecendo a interação hidrofóbica e a agregação das xilanas (LINDER et al., 2003).

Em síntese, este pré-tratamento alia a remoção de lignina com a preservação da fração polissacarídica, fatores determinantes para o isolamento de xilanas (REMOND et al. 2010) e para a hidrólise enzimática da celulose residual (JU et al., 2013).

Tabela 2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito alcalino

Bagaço de cana de açúcar	Rendimento ^c (%)	Extrativos (%)	Composição de bagaço (g/100 g em base polpa)					Composição de bagaço (g/100 g em bagaço seco)				
			Glucana	Lignina	Xilana	Arabino sil	Acetil	Glucana	Lignina	Xilana	Arabinosil	Acetil
In natura	100	4,5 ± 0,5	40,4 ± 0,2	21,1 ± 0,4	22,4 ± 0,3	2,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1	--	--	--	--	--
BLA ^a	75,8	2,0 ± 0,2	49,8 ± 0,2	13,2 ± 0,4	24,4 ± 0,2	2,8 ± 0,1	0,3 ± 0,0	38,3 ± 0,3	10,0 ± 0,3	18,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0
BNL ^b	88,6	5,4 ± 0,0	45,2 ± 0,3	13,6 ± 0,2	23,2 ± 0,3	2,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0	42,2 ± 0,3	12,0 ± 0,2	20,5 ± 0,2	2,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0

a: Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e lavado
b: Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e não lavado
c: Rendimento de sólidos após o pré-tratamento

Fonte: arquivo pessoal.

5.2. Extração de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino

A extração de xilana a partir dos bagaços pré-tratados lavado e não lavado foi realizada por dois métodos químicos e um método enzimático. A escolha dos métodos químicos partiu da observação de resultados de maior rendimento de recuperação de xilana na sua forma polimérica, utilizando álcali em temperaturas mais amenas, quando comparada a métodos que utilizam ácidos em altas temperaturas (CELEBIOGLU et al., 2012). Desta forma, optou-se pelos métodos de Höije et al. (2005) e de De Lopez, Tissot e Delmas (1996), originalmente propostos para extração de arabinoxilanas de cascas e palha de cevada, com rendimentos de extração de xilana de 83% e 57%, respectivamente.

O método enzimático usado na extração de xilanas do bagaço foi avaliado na tentativa de se obter um produto final com um maior grau de pureza, tendo em vista que os métodos alcalinos envolvem a degradação e dissolução da lignina residual. Para tanto, o procedimento de extração enzimática foi realizado em meio levemente alcalino assistido por xilanase, com a finalidade de promover clivagens na xilana, reduzir o seu grau de polimerização e aumentar a solubilidade desde a parede celular (SUN et al., 2004).

5.2.1 Comparação do rendimento de extração das xilanas

A Figura 13 representa os rendimentos de cada método usado no isolamento das xilanas a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, antes (BNL) e depois de lavado com água (BLA). Para cada processo foi reportado o rendimento de xilana e o rendimento de sólidos a fim de comparar a pureza dos materiais obtidos na extração. As xilanas isoladas a partir do método de Hoije foram as que apresentaram menor teor de contaminantes, evidenciado pela pequena diferença entre os rendimentos de xilana e de sólidos tanto para as xilanas HLA (61% e 70%) e HNL (56% e 63%) (Figura 13). A diferença entre estes valores pode ser atribuída à limpeza das xilanas que ocorre no processo de diálise por membrana com corte de 12 KDa. O tratamento das amostras com álcali e posterior acidificação geram apreciáveis quantidades de sal. O objetivo da diálise foi a remoção dos sais formados durante a etapa de neutralização do álcali residual com ácido clorídrico. Outro fator que pode explicar essa pequena diferença nos rendimentos é que nesse método realizou-se uma etapa adicional de deslignificação do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, usando clorito em meio ácido. Como em condição alcalina a lignina é dissolvida junto com as

xilanas, é de se esperar uma menor dissolução deste componente em razão da menor concentração de lignina no material de partida.

Figura 13: Rendimento de sólidos (■) e rendimento de xilana (▨) das xilanas extraídas pelos métodos de Hoije (HLA e HNL), Lopez (LLA e LNL) e por Xilanases (XLA e XNL).

Fonte: arquivo pessoal.

Em contrapartida, as xilanas isoladas pelo método de Lopez, apresentaram uma maior diferença entre os rendimentos de xilana e de sólidos a partir dos materiais lavados (57% e 90%) e não lavados (79% e 114%). Por analogia ao resultado de extração de xilanas pelo método de Hoije, as variações observadas nos rendimentos devem-se provavelmente à presença de acetato de sódio e também à presença de lignina presente no material.

As xilanas extraídas com xilanases por sua vez, apresentaram a maior diferença entre os valores de rendimento de sólidos (113% XLA e 105% XNL) e rendimento de xilana (30% XLA e 22% XNL). Nesse caso, os valores elevados de rendimento foram atribuídos à presença de sais de fosfato que constituem o tampão da reação e também à massa de proteínas utilizadas para a hidrólise enzimática.

Em suma, valores próximos entre o rendimento de extração e de xilana evidenciam um menor teor de contaminantes, o que permite concluir que as xilanas isoladas a partir do método de Hoije são as que apresentam menor teor de impurezas dentre as xilanas isoladas.

Na extração da xilana empregando xilanases foi observado um menor rendimento de xilana (22% XNL e 30% XLA) quando comparado à extração realizada pelos métodos alcalinos (maior que 50% para todas as xilanas). Uma das razões para este baixo rendimento pode ser a baixa acessibilidade das xilanases à xilana, devido a estrutura complexa do bagaço

de cana de açúcar e sua baixa porosidade, mesmo depois de pré-tratados. De acordo com Santi-Junior et al. (2013), o volume total de poros acessíveis a uma sonda de 50 Å, correspondente ao diâmetro médio de celulasas (40kDa), variou de 0,32 mL/g em amostras de bagaço *in natura* para 1,0 mL/g em amostras de bagaço com menor concentração de lignina (6%). Concluiu-se que, a presença e distribuição de lignina nos bagaços pré-tratados podem representar uma dificuldade para a penetração das enzimas nas diferentes camadas da parede celular, diminuindo o rendimento de extração da xilana. Além disso, a lignina no bagaço pré-tratado também pode diminuir a eficiência de hidrólise enzimática das xilanas por outros mecanismos como, por exemplo, por adsorção inespecífica da enzima à sua superfície e também através de inibição das enzimas pelos produtos solúveis gerados durante o pré-tratamento, como açúcares e compostos fenólicos (BERLIN et al., 2006; XIMENES et al., 2010). Estes mecanismos de interação lignina-enzima podem explicar o resultado de rendimento de extração ainda menor para o bagaço não lavado (22%) que além de possuir um maior teor de lignina, apresenta maior concentração de compostos como fragmentos de lignina e outros produtos solúveis, gerados durante o pré-tratamento que não foram removidos do substrato.

É importante também ressaltar que a hidrólise da xilana depende da carga e das características bioquímicas das enzimas (como ponto isoelétrico, aminoácidos presentes no sítio ativo, dentre outras) (TABKA et al., 2006). Desta maneira, uma maior extração de xilana poderia ter ocorrido se outras enzimas envolvidas na hidrólise da xilana estivessem presentes ou se houvesse um aumento na carga de enzimas. No entanto, um maior rendimento de hidrólise de xilana poderia aumentar a concentração de oligômeros de baixa massa molar e xilose, inviabilizando as aplicações de xilanas com maior grau de polimerização. Exemplo disso é o processo de deposição de xilanas em polpas celulósicas em que foi determinado que cadeias lineares com pelo menos 15 resíduos de xilose tendem a se aderir melhor às fibras (KABEL et al., 2007).

O maior rendimento de xilana (79%) foi observado para a xilana isolada do bagaço não lavado através do método de De Lopez, Tissot e Delmas (1996). Tal rendimento foi muito superior ao reportado por Chimphango, Van Zyl e Görgens (2012), ao proceder a extração de xilana com esse método, porém diretamente do bagaço *in natura*, alcançando um rendimento de 28%. Um dos fatores que podem explicar os elevados rendimentos obtidos neste trabalho é a realização do pré-tratamento com sulfito alcalino que aumentou a acessibilidade à xilana. Além disso, uma outra razão seria a presença dos lignossulfonatos no bagaço não lavado. Conforme observado por Chandra et al. (2015) quando testaram um

pré-tratamento de madeira (poplar) com H_2SO_4 diluído e este tratamento suplementado com 6% de lignossulfonatos, resultando em uma solubilização de xilana de cerca de 10% maior com a adição destes. Os lignossulfonatos podem ter atuado como surfactantes, aumentando a difusão do álcali nas fibras, aumentando a solubilização de xilana (WEI et al., 2011). É válido ressaltar que a reação ocorreu com uma alta consistência (33%), o que corrobora esta hipótese, pois neste meio os lignossulfonatos estariam presentes em maior concentração (ALÉN, 2000; CHANDRA et al., 2015).

5.2.2 Composição química

A composição química dos materiais extraídos do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino antes e depois de lavado encontra-se na Tabela 3. Dependendo do método de extração empregado, o conteúdo de xilanas no material recuperado variou de 60 a 80%. Estas xilanas possuem grupos arabinosil (7-12%) e ácidos urônicos (4-13%) em sua estrutura. Não foi detectado grupos acetil nas amostras, pois parte desse componente já havia sido removido durante o pré-tratamento sulfito alcalino (Tabela 2). Nas sequências empregadas para isolar as xilanas o restante desses grupos acetil foi removido dos materiais, mesmo na condição alcalina branda empregada no tratamento enzimático.

Todas as xilanas extraídas apresentaram um teor de lignina residual (3-10%), conforme pode ser observado na Tabela 3. As principais formas de interação molecular entre as unidades condensadas da lignina com os carboidratos envolvem ligações éster e éter (JUNG e DEETZ, 1993; MASARIN et al., 2011). Embora na condição do pré-tratamento sulfito alcalino tenha havido a clivagem das ligações éster entre a lignina e a hemicelulose na parede celular, solubilizando xilana e parte da lignina (SUN et al., 2006), as ligações éter glicosídica entre carboidrato-lignina são relativamente mais estáveis. Por este motivo é muito difícil se obter uma xilana pura, sem a presença de lignina (SJOSTROM, 1993; LAWOKO; HENRIKSSON; GELLERSTED, 2003; MASARIN et al., 2011).

Os ácidos hidroxicinâmicos, p-cumárico e ferúlico, estão diretamente envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses (polioses) da parede celular. Assim, o teor de ácidos hidroxicinâmicos foi determinado nas xilanas, isoladas pelos métodos químicos (Tabela 3). Deve-se ressaltar que para as xilanas isoladas com enzimas a concentração de ácidos hidroxicinâmicos não foi determinada, tendo em vista que na escala de tratamento realizada não foi possível recuperar uma massa suficiente para realizar essa análise.

Seria esperado observar no presente trabalho uma menor concentração de ácidos hidroxicinâmicos nas xilanas provenientes dos bagaços pré-tratados e lavados (BLA) (Tabela 3). De fato, seria possível esperar que a ação de lavar o bagaço pré-tratado pudesse solubilizar parte dos ácidos fenólicos livres. No entanto, a análise comparativa entre as concentrações de ácidos hidroxicinâmicos obtidos pelos diferentes métodos, revela um menor teor desses ácidos fenólicos quando isoladas pelo método de Hoije, em razão da pré-deslignificação e da adoção da diálise para as amostras com vistas a remover sais e substâncias de baixa massa molar.

A composição de açúcares das xilanas isoladas encontra-se na Tabela 4. Como se pode observar, a xilose é o açúcar presente em maior proporção em todas as xilanas (73-81 %), seguido de arabinose (8-12 %), ácidos urônicos (5-12 %) e glicose (1-6 %). A proporção de açúcares da xilana extraída é similar à encontrada por Sun, Sun e Sun (2004), que ao isolar a xilana do bagaço de cana-de-açúcar para produzir um derivado esterificado encontrou 81% de xilose e 9% de arabinose.

As relações molares entre xilose/arabinose e xilose/ácido urônico das xilanas mostraram uma ampla variação, dependendo do método de extração. A menor relação molar entre xilose/arabinose e xilose/ácidos urônicos foi encontrada nas xilanas extraídas com xilanases, provavelmente pela ausência de enzimas acessórias no extrato de xilanase comercial que removem os grupos pendentes da xilana. Nas xilanas isoladas por métodos químicos, realizados em condições mais drásticas de pH, carga de álcali e/ou temperatura, observou-se uma maior remoção de ácidos urônicos.

Tabela 3: Composição química (% m/m) dos materiais extraídos dos bagaços lavado (BLA) e não lavado (BNL) por diferentes métodos

Xilanas	Glucana	Xilana	Arabinosil	Ácidos Urônicos	Ácidos hidroxicinâmicos	Lignina	SOMA
HNL	5,23 ± 0,13	61,75 ± 0,81	7,66 ± 0,10	6,54 ± 0,14	0,82 ± 0,02	8,39 ± 0,06	89,86 ± 0,92
LNL	4,40 ± 0,02	64,26 ± 0,23	6,78 ± 0,02	5,69 ± 0,09	1,22 ± 0,13	10,20 ± 0,18	92,55 ± 0,13
XNL	2,21	72,55	11,52	13,31	-	< 4%*	-
HLA	5,81 ± 0,14	60,25 ± 0,06	8,70 ± 0,12	5,25 ± 0,13	0,29 ± 0,02	7,38 ± 0,41	89,21 ± 0,56
LLA	4,74 ± 0,03	62,48 ± 0,21	7,46 ± 0,01	3,69 ± 0,05	1,18 ± 0,01	8,36 ± 0,30	87,91 ± 0,23
XLA	1,15	79,02	11,83	8	-	< 3%*	-

*Lignina detectada por gravimetria, H- método de Hoije; L – método de Lopez; X- método enzimático

Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 4: Composição de açúcares das xilanas isoladas dos bagaços lavado (BLA) e não lavado (BNL) por diferentes métodos

Xilanas	Composição de açúcares (%)				Relação	
	Xilose	Arabinose	Ácidos Urônicos	Glicose	Xil/Ara	Xil/AU
XLA	79	12	8	1	7	10
XNL	73	12	13	2	7	9
LLA	81	8	5	6	10	28
LNL	80	9	6	5	9	21
HLA	80	8	6	6	10	20
HNL	77	10	7	6	8	17

H- método de Hoijs; L- método de Lopez ; X- método enzimático

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.3 Aspecto visual das xilanas

O aspecto visual das xilanas encontra-se na Figura 14. As xilanas isoladas pelo método de Hoijs (HLA e HNL) foram as obtidas com um menor teor de contaminantes (lignina, sais, dentre outros). Estas xilanas, apresentam composição química semelhante e pouca diferença é observada entre elas. A xilana HLA (Figura 14a) tem uma coloração um pouco mais clara quando comparada com a xilana HNL (Figura 14b) e é provável que seja devido a um menor teor de lignina desta xilana (Tabela 3). As xilanas isoladas com xilanases (Figura 14e e 14f) apresentam a coloração mais clara dentre as xilanas. É provável que esta coloração mais clara seja devido ao menor teor de lignina ou ainda devido à presença de sais que apresentam coloração mais clara e foram recuperados em conjunto com esta xilana.

Por outro lado, as xilanas isoladas a partir do método de Lopez (Figura 14c e 14d) (LLA e LNL) apresentaram um aspecto mais heterogêneo com coloração diferente entre elas. A heterogeneidade das xilanas pode ser devido à presença de acetato de sódio residual, formado no processo de neutralização dessa amostra. A xilana LNL apresentou uma coloração marrom mais escura dentre todas as xilanas e, uma das possíveis causas para essa coloração é o maior teor de lignina apresentado por essa xilana (Tabela 3), uma vez que a lignina, dentre outros fatores é uma das responsáveis pelo escurecimento da amostra (HOLIK, 2006).

Figura 14: Aspecto visual das xilanas isoladas pelo Método de Hoije em a e b (HNL e HLA), Lopez em c e d (LLA e LNL) e com xilanases em e e f (XLA e XNL)

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.4 Determinação da massa molar

A distribuição em massas molares de cada xilana encontra-se apresentada nas Figuras 15 e 16 e os resultados em massa molar ponderal média (M_m) e massa molar numérica média (M_n) estão descritos na Tabela 5. É importante ressaltar que as massas molares das xilanas isoladas foram determinadas contra uma curva de calibração de proteínas, portanto os resultados dessa análise devem ser interpretados como relativos ao comportamento hidrodinâmico das xilanas. A precisão do uso de proteínas na determinação da massa molar de xilanas foi comprovada incluindo na calibração da coluna as dextranas com massas molares ponderais médias de 3500 g/mol e 6000 g/mol que eluíram no volume correspondente às suas massas.

O significado físico das massas molares ponderais médias (M_w) ou massa molar numérica média (M_n) é muito importante. M_m é bastante sensível às espécies de massas molares elevadas, enquanto M_n é influenciado muito mais pela quantidade de moléculas. Por exemplo, a presença de massas iguais de moléculas de xilanas com massas molares de 7.000 e 30.000 g/mol, tem-se respectivamente uma M_w de 18.500 g/mol e M_n de 11.344 g/mol. O baixo valor de M_n naturalmente reflete a presença na massa total de um número

muito maior de moléculas pequenas, enquanto que o alto valor de Mw é decorrente do peso ponderal que moléculas de alta massa molar apresentam no cálculo da média (PERISSOTO et al., 2005).

As xilanas isoladas por métodos químicos possuem alta massa molar, pois nas condições de temperatura e concentração de NaOH empregados na extração não seria de se esperar que houvesse hidrólise alcalina das ligações β -glicosídicas (Figura 15). Os cromatogramas também revelaram a presença de compostos que absorvem a 280nm junto com a fração de alta massa molar das xilanas, que são provavelmente complexos de xilana-lignina. A presença desses complexos influencia a determinação da massa molar de xilana, provavelmente superestimando-a.

O perfil de eluição cromatográfica das xilanas isoladas pelo método de Hoije a partir do bagaço pré-tratado lavado apresentou dois picos com massas molares distintas. Deles observa-se que o pico mais intenso corresponde a uma massa molar aparente em torno de 36.000 g/mol e o segundo pico apresenta uma massa de 25.500 g/mol (Figura 15 a). A massa molar ponderal média (Mw), que incorpora todos os subgrupos do cromatograma foi 24.300 g/mol, mostrando uma baixa dispersividade (1,59) (Tabela 5). Quando se utilizou o bagaço pré-tratado não lavado a massa molar ponderal média foi de 24.450 g/mol e foram obtidos três picos principais com Mw de 38.710 g/mol, 26.690 g/mol e 12.900 g/mol, esta xilana também apresentou baixa dispersividade (1,20) (Figura 15 b).

Os valores de massa molar ponderal média encontrados para as xilanas foram similares aos reportados por Hoije et al. (2005) para arabinoxilanas de cascas de cevada. As massas molares ponderais médias foram 39.100 g/mol em solução aquosa e de 35.900 g/mol em dimetoxifenol. Em comparação com xilanas extraídas de bagaço de cana-de-açúcar por outras metodologias verifica-se uma concordância com as massas molares obtidas neste trabalho. Por exemplo, utilizando NaOH 1 M, por 18h, variando a temperatura no intervalo de 20-40° C, Xu e colaboradores (2006) determinaram valores de massas molares ponderais médias entre 35.200 g/mol e 37.400 g/mol. Estes autores verificaram que com o aumento da temperatura, houve um ligeiro aumento na massa molar da xilana obtida e as frações isoladas apresentaram ainda um elevado valor de dispersividade (5,4-5,9).

Gomes, Chimphango e Görgens (2015) utilizaram também o Método de Hoije et al. (2005) para extrair xilanas poliméricas de bagaço de cana de açúcar e obtiveram a massa molar ponderal média de 35.620 g/mol. O maior valor de massa molar encontrado pelos autores é atribuído à presença de contaminação da xilana com frações de alta molar de

lignina. Nesta xilana obtida pelos autores, o teor de lignina (14,85%) é muito maior do que o encontrado no presente trabalho para as xilanas isoladas pelo mesmo método (Tabela 3).

Brienzo (2009) também estudou o isolamento de hemiceluloses de bagaço de cana de açúcar, variando-se a concentração de H_2O_2 de 2-6% (m/m) em pH 11, tempo de reação de 4-16h, temperatura de 20-60° C e presença ou não de 0,5% de sulfato de magnésio. A massa molar ponderal média da xilana obtida na condição otimizada (6% de peróxido, 20° C, 4h) foi de 21.000g/mol, inferior as massas molares ponderais médias obtidas no presente trabalho exceto para a LLA (Tabela 5). Este resultado deve-se provavelmente à ação do peróxido de hidrogênio que pode ter atuado extraíndo fragmentos menores de xilana que se encontravam ligados à lignina ou através da clivagem interna da cadeia de xilana, levando a diminuição da massa molar da xilana.

A xilana extraída do bagaço pré-tratado não lavado pelo método de Lopez (LNL) apresentou três picos com absorbância maiores que 0,1, referentes às massas molares ponderais médias de 31.700 g/mol, 12.897 g/mol e 7.825 g/mol (Figura 15 c). Quando o material de partida foi o bagaço não lavado, a massa molar ponderal média das xilanas de maior incidência correspondem as de 35.030 g/mol, 28.690 g/mol, 21.257 g/mol e 7.825 g/mol (Figura 15 d). O perfil de eluição cromatográfica das xilanas isoladas do bagaço pré-tratado lavado apresentou uma maior dispersividade (1,47) que as xilanas do bagaço pré-tratado não lavado (1,17) (Tabela 5), o que pode ser explicado pela existência de picos com massas molares ponderais médias mais distintas. As massas molares ponderais médias das xilanas correspondem a 19.800 g/mol e 24780 g/mol, para o bagaço pré-tratado lavado e não lavado, respectivamente (Tabela 5). Em comparação com as xilanas isoladas pelo método de Hoijje, que inclui uma etapa de deslignificação com clorito, observa-se um aumento na absorbância a 280 nm, atribuída à presença de lignina nas frações.

De acordo com os perfis de eluição dos açúcares e de detecção de lignina (280nm) é possível concluir que a lignina e a xilana eluíram juntas, considerando que houve uma maior detecção nas frações de maior massa molar. As diferenças das massas molares das xilanas extraídas pelo método de Lopez, entre os materiais lavados e não lavados, pode ser atribuída à presença no bagaço não lavado dos lignossulfonatos, que teriam favorecido a solubilização de xilanas de maior massa molar ponderal média (CHANDRA et al., 2015).

As xilanas isoladas dos bagaços pré-tratados lavados (BLA) e não lavados (BNL), com auxílio de xilanases, foram analisadas de acordo com a eluição na coluna Bio Gel P30 (Figura 16 a-b) e Biogel P2 (Figura 16 c-d). A eluição das xilanas na Bio Gel P30 (faixa de separação 2.500-40.000 g/mol) mostrou um pico de menor concentração e alta massa molar

ponderal média (34.508 g/mol) e uma alta absorção a 280 nm, atribuída a eluição da proteína utilizada na hidrólise (xilanase) ou ainda, a presença de lignina na amostra. A maior fração de xilana caracteriza-se por picos com massas molares ponderais entre 5.370 g/mol e 2.412 g/mol (Tabela 5). As xilanas apresentam um perfil de eluição coerente com o reportado na literatura, visto que as xilanases são capazes de clivar a xilana presente nos materiais lignocelulósicos gerando xilo-oligômeros com grau de polimerização (DP) menor ou igual a 20 (VÁZQUEZ et al., 2000; CARVALHO et al., 2013).

As xilanas eluídas na Biogel P2 (faixa de separação 800-1.800 g/mol) apresentaram vários picos com massas entre 205 g/mol e 3081 g/mol. Para a determinação da massa molar ponderal média destas xilanas foi realizada uma separação em duas frações, a fim de se obter um grau de dispersividade próximo ao obtido com as xilanas extraídas pelos métodos químicos (Tabela 5). No caso das xilanas isoladas de material lavado as massas molares ponderais médias de XLA1 foi 2.900 g/mol e da fração de menor massa, XLA2 foi 540 g/mol (Tabela 5). As frações XLA1 e XLA2 representam, respectivamente, 31% e 65% do total de xilanas solubilizadas. O grau de polimerização para a fração de menor massa molar, considerando apenas a cadeia linear de xilana seria 3 e para a fração de maior massa molar seria 19, no entanto, estas frações contêm grupos pendentes de arabinose e ácidos glucurônicos e provavelmente também ligações covalentes com a lignina, não sendo possível determinar com precisão o grau de polimerização das amostras.

Tabela 5: Massa molar ponderal média (Mm), massa molar numérica média (Mn) e dispersividade (Đ) das xilanas isoladas do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino determinadas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular.

Bagaço	Método de extração	Frações	Mm	Mn	Đ
Lavado	Xilanase	XLA1	2.900	2.480	1,12
		XLA2	540	385	1,40
	Hoije	HLA	24.300	15.290	1,59
	Lopez	LLA	19.800	13.330	1,47
Não Lavado	Xilanase	XNL1	3.700	3.330	1,12
		XNL2	800	610	1,32
	Hoije	HNL	24.450	20.315	1,20
	Lopez	LNL	24.780	21.255	1,17

Fonte: arquivo pessoal

Figura 15: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço lavado pelo método de Hoije (HLA em a e HNL em b) e Lopez (LLA em c e LNL em d). As xilanas obtidas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P30.

Fonte: arquivo pessoal

Com relação às xilanas extraídas do material não lavado por xilanases (XNL), verifica-se uma massa molar ponderal média da fração XNL1 de 3.700 g/mol e de 800 g/mol para XNL2, apresentado baixa dispersividade (Tabela 5). Do total das xilanas solubilizadas, 28% incluem a fração XNL1 com grau de polimerização médio de 24, enquanto a fração XNL2 representa 63% do material com grau de polimerização médio de 5, considerando para o cálculo apenas um polímero linear de xilose.

As xilanas extraídas com xilanases foram analisadas em cromatografia em camada delgada (TLC) com o objetivo de analisar os produtos de hidrólise (Figura 17). Para isso, as amostras foram aplicadas em uma placa de sílica gel e depois da corrida cromatográfica os produtos da hidrólise foram revelados. Foram detectados xilo-oligômeros de grau de polimerização acima de 2 para XLA e acima de 3 para XNL. Não foi detectada a presença

de xilose. Além disso, parte do material aplicado na placa de TLC não saiu da origem, confirmando a presença de xilo-oligômeros de maior massa molar, mais evidentes na fração solúvel XLA (pontos 1 e 2 da Figura 17). Estes dados corroboram com resultados prévios encontrados por Tenkanen et al. (1992) e Hakala et al. (2013), que encontraram xilo-oligossacarídeos de grau de polimerização de 2 a 6, após hidrólise de xilanas com xilanases e também de xilo-oligômeros de maior massa molar.

Figura 16: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço pelo método enzimático, obtida a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P-30 (a,b) e BioGel P2 (c,d). Em (a e c) observa-se a eluição das xilanas obtidas dos substratos lavados e em (b e d) dos substratos não lavados. A extração de xilanas foi realizada 8 UI/ g de xilanase comercial (Luminase) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8, a 50° C, por 24 horas.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 17: Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos resultantes da hidrólise enzimática com 8 U/g de xilanase comercial (luminase), por 24 horas. As amostras foram isoladas do bagaço lavado (1,2) e não lavado (3,4). P: padrão de xilo-oligômeros (X1: xilose, X2: xilobiose, X3: xilotriose e X4: xilotetraose).

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.5 Solubilidade

A solubilidade das xilanas isoladas dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino foi determinada e comparada à solubilidade de uma xilana comercial de *beechwood*, que contém um elevado grau de substituição de ácidos urônicos (9,4%) e outros açúcares (6,9%). Os testes foram realizados em água destilada e incubadas por 6 h a 60° C. O valor de solubilidade da xilana comercial foi utilizado como referência para o cálculo da solubilidade relativa das xilanas isoladas de bagaço (Tabela 6).

As xilanas com maior solubilidade em água destilada foram aquelas obtidas a partir da hidrólise com xilanases (XLA e XNL) (Tabela 6), que apresentaram uma menor massa molar média (Tabela 5) e menor relação xilose/arabinose e xilose/ácidos urônicos (Tabela 4). Comparando a solubilidade das xilanas isoladas pelo método de Hoijs (HLA e HNL) e pelo método de Lopez (LLA e LNL), que apresentaram massas molares aproximadas, os grupos pendentes parecem ter sido o fator determinante para as diferenças de solubilidade em meio aquoso. Neste contexto, quanto menor a relação molar xilose/arabinose e

xilose/ácido glucurônico da xilana, maior a sua solubilidade em água, pois um maior grau de substituição, especialmente no caso de xilanas poliméricas, diminui a interação inter e intra cadeias de xilose (LINDER et al., 2003; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Além disso, também é reportado que a substituição com resíduos de ácidos urônicos carregados exerce uma maior influência na solubilidade do que a substituição com grupos arabinosil (GOMES; CHIMPHANGO; GÖRGENS, 2015)

A presença de lignina também diminui a solubilidade de xilanas em meio aquoso (WESTBYE et al., 2007). De fato, as xilanas menos solúveis foram as obtidas através do método de Lopez (LNL e LLA) seguida da xilana obtida através do método de Hoije (HNL), que possuem um maior teor de lignina que as demais xilanas.

Tabela 6: Solubilidade em água e solubilidade relativa das xilanas isoladas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino a partir dos métodos de Lopez (LLA e LNL), Hoije (HNL e HLA) e enzimático (XNL e XLA).

Xilanas	Solubilidade em água (%)	Solubilidade relativa (%)
LNL	14	18
HNL	22	29
XNL	40	70
LLA	8	11
HLA	16	21
XLA	19	31
<i>Beechwood*</i>	57	100

* xilana comercial adquirida da Megazyme, Lote: 141101a.

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A Figura 18 mostra o espectro infravermelho para as xilanas extraídas do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino tendo-se como comparação uma xilana comercial (xilana de *beechwood*- Sigma). Como referência para esta análise, a Tabela 7 apresenta as principais atribuições para as bandas de absorção no infravermelho características das xilanas.

Tabela 7: Principais atribuições para as absorções no infravermelho de xilanas

Absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
1735	Vibração C=O (glucurônico, ferúlico ou para-cumárico)
1640	Flexão –OH absorção em água
1423	HCH e OCH
1511	C=C de anéis aromáticos
1165,1092	C-C, C-OH, C-H anel e vibrações de grupos laterais
1038 -1044	C-O-C, C-C, C-O, vibração do anel glicosídico
987	C-C, C-OH, C-H de anel, vibrações de grupos laterais
895	Estiramento e deformação C-O-C, C-C=O e C-CH

Fonte: adaptada de Silverstein et al. (2007) e Fan, Dai e Huang (2012)

Na Figura 18, verifica-se uma absorção a 895 cm⁻¹ presente em todas as xilanas, referentes ao estiramento e deformação das ligações C-O-C, C-C-O e C-CH no caso das hemiceluloses, as ligações β-glicosídicas entre as xilanopiranosos da cadeia principal. As bandas entre 1175 e 1000 cm⁻¹ refletem o estiramento das ligações C-O, C-C, C-OH e C-O-C, presentes em abundância nas xilanas, com maior intensidade em 1050 cm⁻¹. As absorbâncias a 987 e 1065 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C-O-C, C-OH e C-H presentes em anéis aromáticos e grupos laterais, correspondendo nas hemiceluloses aos grupos arabinosil. A absorbância à 1640 cm⁻¹, refere-se a flexão da ligação O-H referente a absorção da molécula em água, tratando-se de xilanas solúveis em água. A banda em 1510 cm⁻¹ refere-se ao estiramento de ligações C=C presentes em anéis aromáticos, que representam neste caso, pequenas quantidades de lignina presente nas xilanas, correspondente a oxidação do nitrobenzeno. A banda em 1735 cm⁻¹ por sua vez, se refere à vibração de estiramento de ligações do tipo carbonila (C=O), presentes nos ácidos glucurônicos e nos ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e cumárico). A análise de espectros de hemiceluloses extraídas de materiais lignocelulósicos serviram de parâmetro para realizar esta análise (EBRINGEROVÁ et al., 1992; XU et al., 2006; PENG et al., 2009; BURANOV; MAZZA, 2010; BIAN et al., 2012; SUKHBATAR et al., 2014)

Estes resultados confirmam o que se pretendia, identificando-se a presença de xilanas nas amostras obtidas a partir do bagaço pré-tratado.

Figura 18: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das xilanas: de *beechwood* (em azul), isoladas pelo Método de Hoiije: HLA (em vermelho), HNL (rosa) e pelo método de Lopez: LLA (em roxo) E LNL (em verde).

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.7. Estimativa por FT-IR da concentração de ácido glucurônico em xilanas

O método comumente empregado na dosagem do teor de ácidos urônicos e utilizado neste trabalho, foi descrito por Li et al. (2007) e trata-se de um método colorimétrico. No entanto, este método, sofre algumas interferências como descreve o próprio autor, que conclui, através do emprego de dois métodos de dosagem do teor de ácidos urônicos (sulfúrico-carbazol e metanólise), que eles não podem ser utilizados isoladamente para dosar ácidos urônicos presentes nas xilanas de polpa kraft.

Considerando que uma banda característica de carbonila (C=O), presente no ácido urônico foi observada a cerca de 1735 cm⁻¹ no espectro de infravermelho das xilanas, procedeu-se a análise quantitativa de ácido glucurônico a partir desta banda. Foi preparada uma curva utilizando a xilana de *beechwood* (9,4% de ácido metilglucurônico), enriquecida com concentrações conhecidas de ácido glucurônico (Figura 19). Uma relação linear foi

estabelecida entre as concentrações utilizadas e as absorbâncias detectadas pelo espectro. A banda de absorbância das xilanas isoladas com álcali a 1735 cm^{-1} foram lançadas na curva de calibração obtida e os resultados do teor de ácidos urônicos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Dosagem do teor de ácidos urônicos (m/m) pelo método colorimétrico (Sulfúrico-carbazole) e através da intensidade de absorção a 1735 cm^{-1} por FT-IR.

Xilanas*	Método	
	Colorimétrico	FT-IR
HNL	6,54	9,31
LNL	5,69	8,87
HLA	5,25	9,09
LLA	3,69	8,67
Xilana de <i>beechwood</i>	9,45	12,1

*xilanas extraídas pelos métodos de Hoijs (HLA e HNL) e Lopez (LLA e LNL)

Fonte: arquivo pessoal.

É possível verificar que o teor de ácido glucurônico foi menor quando analisado pelo método colorimétrico. Isso pode ter ocorrido em função da conversão incompleta dos ácidos glucurônicos à ácido 5-formil-2-furanocarboxílico (FFA), produto de decomposição dos ácidos urônicos, principal composto dosado por este método. Li et al. (2007) demonstraram esse efeito quando dosaram ácido galacturônico e FFA pelo método sulfúrico-carbazol e verificaram uma relação linear diferente para cada um dos compostos, quando a mesma concentração destes foi utilizada. Outros estudos demonstraram que a quantidade de FFA formado é proporcional a quantidade e a velocidade de ácido sulfúrico adicionado e que a taxa e a extensão de formação de FFA depende da configuração estrutural do ácido urônico (SCOTT, 1979; TELEMAN et al., 1996).

Para contornar o problema da concentração de ácido glucurônico determinada pelo método colorimétrico, no presente trabalho foi utilizado um fator de correção para os valores de ácidos urônicos nas xilanas, utilizando uma xilana de *beechwood* como padrão.

Sendo assim, a dosagem de ácidos glucurônicos através do FT-IR apresenta-se como uma alternativa viável para a dosagem destes ácidos nas xilanas. Entretanto, deve-se

ressaltar que poucas amostras foram utilizadas para este método e os testes realizados foram feitos com xilanas isoladas, sendo requeridos outros testes com dosagem em materiais lignocelulósicos e também com diferentes concentrações de ácidos glucurônicos que permitam verificar a sensibilidade do método e a validação da metodologia para este fim.

Figura 19: Curva padrão de ácido glucurônico

Fonte: arquivo pessoal.

5.3. Xilana recuperada do licor alcalino

5.3.1 Composição química do licor alcalino

O licor sulfito foi produzido pelo cozimento do bagaço, sendo constituído principalmente por lignina e seus produtos de degradação e substâncias, tais como, extrativos e cinzas. Neste processo de cozimento, as xilanas foram parcialmente degradadas nos seus oligômeros e xilose e dissolvidas no licor. Estes compostos representam cerca de 21% dos sólidos do bagaço (126 gramas), proveniente de 600 gramas em um volume de 6 litros.

A composição química do licor após o pré-tratamento do bagaço com sulfito alcalino está mostrada na Figura 20. Verifica-se uma maior concentração de ácido acético, proveniente da total remoção deste componente da xilana durante o pré-tratamento sulfito

alcalino (5,87 g/L). A recuperação de acetato do licor negro da polpa kraft tem sido alvo de estudos na literatura que tem alcançado uma recuperação de 65% a 70% de ácido acético através de técnicas como nanofiltração e osmose reversa (AHSAN; JAHAN; NI, 2013; AHSAN; JAHAN; NI, 2014).

Uma pequena parte da hemicelulose foi solubilizada a xilose (0,53 g/l) e arabinose (0,25 g/L) e, além desses compostos, foram detectados baixos teores de furfural e hidroximetilfurfural (<0,01 g/L), evidenciando a baixa degradação de açúcares nas condições do pré-tratamento foi realizado (Figura 20).

Figura 20: Componentes detectados no licor alcalino

Fonte: arquivo pessoal.

Com relação aos compostos fenólicos foi evidenciado um elevado teor de ácido para-cumárico e demais compostos de degradação da lignina, evidenciando sua extensa solubilização no meio (Figura 20).

5.3.2 Recuperação da xilana do licor

O licor sulfito foi submetido a um processo de precipitação com etanol, seguida de centrifugação para isolamento das xilanas presentes. As xilanas são insolúveis em etanol e precipitam na presença desse solvente, decantando após algumas horas em repouso. Esse processo levou a uma recuperação de 90% dos sólidos e dos 26% de xilana solubilizada durante o pré-tratamento sulfito alcalino, foram recuperadas 8,7% em relação a hemicelulose presente no bagaço in natura (sendo 7,7 % da xilana e 8,8% do grupo

arabinosil). A análise dos carboidratos do precipitado indica que as xilanas são o polissacarídeo predominante nesta amostra (34% da massa).

A análise da massa molar por cromatografia de permeação em gel revela duas frações, uma de alta massa molar média de 28.660 g/mol e uma de baixa massa molar 7.850 g/mol (Tabela 9). As xilanas dissolvidas no licor sulfito tem menor massa molar que as xilanas que permanecem na polpa após o pré-tratamento, podendo ser devido a uma despolimerização parcial dos polissacarídeos. No entanto, isto não foi encontrado no presente trabalho, conforme pode-se observar na Figura 21. Isto deve-se provavelmente ao método de recuperação utilizado, que recupera xilanas de maior massa molar ou também a presença de lignina eluindo junto com a fração de alta massa molar (XL1), que foi detectada através da leitura de absorbância a 280 nm.

Vários estudos têm sido dedicados à obtenção de xilanas de licores. Na abordagem mais utilizada, é realizada a extração de hemicelulose anterior à etapa de polpação (HELMERIUS et al., 2010; LIU et al., 2011). Liu e colaboradores (2011) realizaram uma pré-hidrólise das xilanas a 170° C por 30 minutos, anterior à polpação kraft. Como resultados, houve dissolução de açúcares, que foram recuperados através de dois métodos: precipitação direta em etanol e acidificação desse licor e posterior precipitação em etanol. Após esta etapa, os autores realizaram a cationização destas hemiceluloses e caracterizaram esses derivados formando concluindo que esta operação foi realizada com sucesso.

Figura 21: Distribuição em massas molares aparentes das xilanas recuperadas do licor sulfito alcalino do bagaço, obtidas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P30.

Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 9: Massa molar ponderal média (Mm), Massa molar numérica média (Mn) dispersividade (Đ) das xilanas isoladas do licor sulfito alcalino (XL1: frações de alta massa molar e XL2: frações de baixa massa molar).

Frações	Mm (g/mol)	Mn	Đ
XL1	28.660	27.500	1,04
XL2	7.850	6.140	1,28

Fonte: arquivo pessoal.

5.4 Degradabilidade enzimática da celulose residual

5.4.1 Composição química do material residual

Após a remoção de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, por diferentes métodos, os sólidos residuais foram quimicamente caracterizados (Tabela 10). Pode-se verificar que houve enriquecimento de glucana, especialmente nos resíduos resultantes da extração química de xilana (68-78%), e em menor proporção para os resíduos obtidos da extração com xilanase (51-54%). Além disso, mesmo depois dos tratamentos, parte das xilanas ainda permaneceu nos resíduos.

O maior teor de xilana foi encontrado nos resíduos dos bagaços submetidos a tratamento com xilanases (22%). Por outro lado, o resíduo após a extração da xilana pelo método de Lopez tem o menor teor de xilana.

Pela comparação dos métodos de extração, verifica-se que as xilanas que permanecem na polpa apresentam diferenças no seu grau de substituição (Tabela 10). O grau de substituição diminui bastante podendo-se concluir que foram isoladas as xilanas mais solúveis.

Tabela 10: Caracterização química e relação xilose/arabinose dos resíduos após extração de xilana dos bagaços lavado (RLA) e não lavado (RNL)

Bagaço	Método de extração	Resíduo	Lignina	Glucana	Xilana	Arabinosil	Relação Xil/Ara
Lavado	Xilanase	RXLA	14,34 ± 0,24	53,92 ± 0,42	21,56 ± 0,14	2,26 ± 0,03	9
	Hoije	RHLA	4,62 ± 0,38	67,74 ± 1,43	16,30 ± 0,42	0,39 ± 0,39	42
	Lopez	RLLA	10,10 ± 0,48	67,58 ± 0,61	19,64 ± 0,23	0,63 ± 0,10	31
Não Lavado	Xilanase	RXNL	15,36 ± 0,24	50,82 ± 0,58	22,09 ± 0,24	2,34 ± 0,02	9
	Hoije	RHNL	7,20 ± 0,72	74,23 ± 0,38	14,74 ± 0,19	0,47 ± 0,07	31
	Lopez	RLNL	10,54 ± 0,41	78,94 ± 0,37	9,21 ± 0,19	0,27 ± 0,01	34

*xilanas extraídas pelos métodos de Hoije (HLA e HNL), Lopez (LLA e LNL) e por Xilanases (XLA e XNL).

Fonte: arquivo pessoal.

5.4.2 Ensaios de hidrólise com celulasas

Os substratos empregados nos estudos de hidrólise enzimática foram os bagaços pré-tratados com sulfito alcalino e os resíduos obtidos após extração de parte da xilana com álcali e xilanases. A composição química e o grau de substituição de cada substrato pode ser encontrada na Tabela 10.

Os ensaios foram feitos com 5 FPU de Celluclast e 10 UI de β -glicosidade por grama de glucana. Essa é uma carga quatro vezes menor à utilizada nos ensaios de Mendes et al. (2011) que utilizaram 10 FPU/ g de bagaço pré-tratado com sulfito e mostraram uma conversão de glucana de 70%, após 72 horas de hidrólise.

As Figuras 22 e 23 mostram a cinética de conversão da glucana e da xilana dos substratos, após 72 horas de hidrólise. Vários trabalhos mostram que a xilana pode atuar impedindo fisicamente a ação das celulasas, portanto, seria possível inferir que a remoção de xilana dos bagaços resultaria num aumento da hidrólise enzimática da glucana (LEU; ZHU, 2013; DING et al., 2015; YANG et al., 2015). De fato, os dados indicam que a remoção de xilana aumentou a conversão da glucana da maioria dos resíduos analisados e, quando isso não ocorreu, a hidrólise foi similar a dos bagaços pré-tratados, utilizados como

controle. A remoção de xilana dos resíduos com xilanases resultou em um pequeno aumento na conversão de glucana após 72 horas de reação, variando de 5 a 8%, dependendo do resíduo. Este resultado deve-se provavelmente ao fato de que para estes substratos, a remoção de xilana com xilanases não foi tão expressiva para gerar acréscimo na hidrólise.

Na Figura 22a, pode-se observar a conversão de glucana até 72 horas de reação, do bagaço lavado e dos resíduos após a extração de parte da xilana pelos diferentes métodos. Pode-se observar que a maior conversão de glucana foi do resíduo em que parte da xilana foi extraída pelo método de Hoije (RHLA) (62%). Esta maior conversão pode ser atribuída ao menor conteúdo de lignina e de xilana dessa amostra em comparação com as demais. Em relação a xilana, o resíduo em que a xilana foi extraída pelo método de Hoije tem 25-50% menos xilana que os demais resíduos e o bagaço lavado (Tabela 10). A xilana é capaz de impedir a ação das celulasas por diversos mecanismos, dentre os quais, a presença de ligações de hidrogênio entre a xilana e a celulose são de fundamental importância na recalcitrância da parede celular (YANG; WYMAN, 2004). Além disso, a própria xilose e os xilo-oligômeros são capazes de inibir as celulasas (HU et al., 2013). Considerando que o teor de celulose dos resíduos extraídos quimicamente é praticamente igual (Tabela 10), as diferenças observadas na sua conversão a glicose reforçam o papel da xilana nesta restrição.

Na Figura 22b estão representadas a conversão de glucana a partir do bagaço pré-tratado não lavado e dos resíduos em que parte da xilana foi extraída por diferentes métodos. É importante ressaltar que após a extração de xilana os resíduos foram lavados antes de conduzir a hidrólise com celulasas sendo a denominação “não lavado” apenas referente ao tratamento empregado no material de partida. A conversão de glucana a partir destes resíduos apresentou perfil semelhante ao obtido a partir dos resíduos originados do bagaço lavado (Figura 22a), com maior conversão de glucana a partir do resíduo em que parte da xilana foi extraída pelo método de Hoije (RHNL) (71%), após 72 horas de hidrólise. No entanto, o resíduo onde parte da xilana foi extraída pelo método de Lopez (RLNL) e que apresenta menor teor de xilana (9,21%), a conversão foi de 41%. Para explicar este resultado considerou-se que uma maior remoção de xilana do resíduo seja responsável pela menor conversão observada pois, diminuiria a acessibilidade das enzimas à celulose, diminuindo a eficiência de conversão da glucana.

Figura 22: Conversão de glucana (a, b) dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (▲) e dos resíduos obtidos após remoção de xilana pelo Método de Hoiye (▲), Lopez (▲) e com xilanases (▲). Em (a) o perfil de conversão dos substratos lavados e em (b) dos substratos não lavados. A hidrólise foi conduzida com Celluclast (5 FPU) e α -Glicosidase (10 UI) por grama de glucana.

Fonte: arquivo pessoal.

Essa consideração baseou-se nos estudos feitos por Yang et al. (2013), que avaliaram a correlação entre a variação da hidrofiliicidade induzida pela remoção de hemicelulose de palha de aveia na conversão de celulose através de sua gradual e sucessiva remoção com concentrações crescentes de NaOH. De acordo com os resultados, os autores concluíram que uma excessiva remoção de hemicelulose pode gerar colapso das multicamadas de celulose, o que restringe a adsorção das celulases à superfície da celulose.

Outra explicação sugerida é a de que as mudanças nos constituintes químicos da hemicelulose devido a sucessivas extrações alcalinas tornaram-na mais hidrofóbica. As celulases por sua vez, possuem módulos de ligação de carboidratos (CBM) que são adsorvidos a princípio em uma superfície hidrofílica, que é importante para iniciar a atividade catalítica da enzima. Desta forma, a diminuição da propriedade hidrofílica em amostras celulósicas pode ter diminuído a atividade da enzima, diminuindo a eficiência de conversão da celulose.

Os resíduos obtidos após extração de parte da xilana pelo método de Hoije apresentaram uma etapa adicional de deslignificação com clorito, o que lhes conferiu menor teor de lignina dentre os resíduos (Tabela 10). A lignina é, de acordo com a literatura, o maior obstáculo que restringe a conversão enzimática dos substratos lignocelulósicos por diversos mecanismos já revisados anteriormente (PAN et al., 2005; BERLIN et al., 2006; MUSSATO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2013; YU et al., 2014). Nos resíduos em que parte da xilana foi extraída pelo método de Hoije, a maior conversão de glucana após 72 horas foi a partir do resíduo não lavado (RHNL). Este resíduo, no entanto, tem teor maior de lignina que o resíduo obtido a partir do bagaço lavado (RHLA). Siqueira et al. (2013) observaram que a remoção de até 60% de lignina empregando um pré-tratamento com clorito de sódio em meio ácido, resultou em um aumento na conversão de celulose, alcançando 80% após 72 horas de hidrólise e que, quando mais lignina foi removida do material, a conversão alcançou um platô, não havendo um aumento na conversão. Relativamente as etapas de deslignificação aplicadas neste estudo desde o bagaço in natura até se obter a xilana, foi observada uma elevada remoção de lignina, o que pode ter feito com que a sua influência na conversão seja muito baixa ou nula. Logo, é importante ter em atenção outros fatores para explicar a maior conversão de glucana do resíduo obtido após extração de xilana pelo método de Hoije, a partir do bagaço não lavado (RHNL) (71%) (Figura 22b) em relação ao do resíduo onde foi empregado o mesmo método de extração de xilana, mas, a partir do bagaço lavado (62%) (RHLA) (Figura 22a). Tanto o maior teor de xilana ou ainda ao maior teor de celulose em RHNL pode ter influenciado, não sendo possível inferir com os experimentos realizados qual dos dois efeitos teve maior importância nos resultados.

Figura 23: Conversão de xilana (a, b) dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino (■) e dos resíduos obtidos após extração de parte da xilana pelo Método de Hoije (■), Lopez (■) e com xilanases (■). Em (a) o perfil de conversão dos substratos lavados e em (b) dos substratos não lavados. A hidrólise foi conduzida com Celluclast (5 FPU) e β -Glicosidase (10 UI) por grama de glucana.

Fonte: arquivo pessoal.

A Figura 23 mostra a conversão de xilana a partir dos resíduos em que parte da xilana foi extraída por métodos químicos e com xilanases e dos bagaços pré-tratados. Seria

esperado para os resíduos que possuem mais xilana maiores conversões pois, haveria maior liberação de xilose na hidrólise. Para tais substratos isto realmente ocorre, entretanto, para o bagaço lavado e os resíduos extraídos com xilanase, a concentração de xilose liberada mesmo sendo maior, resulta em uma menor conversão de xilana a partir destes substratos. Tendo em vista que esses substratos possuem maior conteúdo inicial de xilana.

Os resultados referentes a hidrólise enzimática da glucana dos resíduos obtidos após extração de xilana, mostram que a remoção de xilana aumenta a conversão de glucana até certo ponto. O balanço entre o grau de remoção de xilana e consequente exposição da área superficial acessível da celulose até que não ocorra o colapso das microfibrilas de celulose são determinantes na eficiência da conversão de glucana.

6.CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo é possível reconhecer a importância do bagaço de cana-de-açúcar como matéria prima para obtenção de bioprodutos. Foram preparadas duas amostras de bagaço pré-tratados com sulfito alcalino, não lavado e lavado, que diferiram entre si na composição química. As lavagens com água revelaram-se muito eficientes para arrastar impurezas presente nas amostras. Esta conclusão foi retirada por comparação dos teores de lignina e xilanas entre amostras que se lavaram com água e onde não se fez qualquer lavagem (o rendimento para as amostras lavadas com água foi 15% menor ao das amostras que não foram lavadas).

Dependendo da fonte e do produto final pretendido, a extração e purificação de xilanas e xilo-oligossacarídeos são desafiadoras e requerem diferentes métodos. O rendimento de xilanas isoladas por diferentes métodos variou entre 22-79%. O maior rendimento de xilana foi obtido pelo método de Lopez. A extração de xilanas com xilanases foi ineficiente, atingindo 22% de glucurono- arabinoxilanas, possivelmente devido à baixa acessibilidade das enzimas às xilanas e à inibição da atividade hidrolítica das enzimas por compostos solúveis.

Os sólidos recuperados dos bagaços pré-tratados e do licor sulfito não são constituídos apenas por xilanas. De fato, as xilanas representam a maior parte dos sólidos, no entanto a lignina também está presente.

A análise da composição em monossacarídeos é muito importante para a quantificação dos açúcares constituintes de cada amostra e também avaliar o tipo e o grau de substituição das xilanas.

O teste de solubilidade mostrou que as xilanas foram pouco solúveis em água. A maior solubilidade verifica-se para as xilanas extraídas com xilanases. A solubilidade é importante pois, é um dos parâmetros determinantes na aplicabilidade da xilana isolada.

Após caracterização obtiveram-se xilanas isoladas com álcali com massas molares médias compreendidas entre 19,8-24,7 kDa e xilanas extraídas com xilanases com menor massa molar (0,54-3,7 kDa).

A análise das amostras por espectroscopia de infravermelho permitiu confirmar a existência de xilanas na amostra por comparação das bandas características da xilana comercial de *beechwood* e identificar as suas impurezas.

Foi possível correlacionar em termos quantitativos o teor de ácidos urônicos por FTIR ao observar variações na intensidade da banda a 1735 cm^{-1} com a concentração de ácido glucurônico, confirmando outras técnicas empregadas para sua quantificação.

A xilana isolada do licor apresentou duas frações uma com maior massa molar média (28,7 kDa) e uma de menor massa (7,8 kDa). No entanto, ainda há muitos contaminantes e lignina isolados em conjunto com esta xilana, sendo esta apenas 34% da massa do precipitado obtido.

A hidrólise enzimática da glucana dos resíduos, após extração de xilana pelos métodos propostos, foi aumentada nos resíduos em que a xilana foi extraída pelo método de Hoije, em relação a conversão de glucana dos controles (bagaço pré-tratado com sulfito alcalino). Para os resíduos em que a xilana foi extraída pelo método de Lopez, no entanto, essa melhora não foi observada, pois alguns fatores como maior teor de xilana no resíduo e a vasta remoção de xilana pelo método empregado parecem ter impedido o acesso das celulasas à glucana.

Atualmente têm-se aplicado esforços na procura de formas mais eficazes e econômicas de separar os componentes do bagaço de cana-de-açúcar para ajustar as suas propriedades às exigências dos possíveis mercados. As técnicas de isolamento de xilanas podem ser utilizadas em futuras pesquisas com foco em produtos com características mais específicas de composição química e grau de polimerização. A celulose residual é uma fonte interessante de matéria prima para a produção de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, L.; JAHAN, M. S.; NI, Y. Recovery of acetic acid from the pre-hydrolysis liquor of kraft based dissolving pulp production process: sodium hydroxide back extraction from the trioctylamine/ octanol system. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.52, n.26, p.9720-9275, 2013.
- AHSAN, L.; JAHAN, M. S.; NI, Y. Recovering/ concentrating hemicellulosic sugars and acetic acid by nanofiltration and reverse osmosis from prehydrolysis liquor of kraft based hardwood dissolving pulp process. **Bioresource Technology**, v.155, p.111-115, 2014.
- AKGÜL, M; ÇÖPÜ, Y; TEMİZ, S. A comparison of kraft and kraft-sodium borohydate brutia pin pulps. **Building and Enviroment**, v.42, p.2586-2590, 2007.
- ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In: STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000a. p. 12.
- ANDRADE, M. F.; COLODETTE, J. L. Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 58–64, 2014.
- ANDREWARTHA, K; PHILLIPS, D.R; STONE, B.A; Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v.77, p.191-204, 1979.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, p. 3, 2011.
- BAILEY, M.J.; BIELY, O.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.
- BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p.638-645 2012.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.
- BISHOP, C. T. Crystalline Xylans From Straws. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 793–800, 1953.

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.

BOUSSAD, A.; SADDLER, J.N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. **Enzyme Microbial Technology**, v.24, p.138-143, 1999.

BUCHERT, J. et al. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 65–72, 1994.

BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **BioEnergy Research**, 2014.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 17–25, 2010.

BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in Baking Industry. **Food Technology**, v.46, n.1, p.22-31, 2008.

CARA, C. ; RUIZ, E.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v.41, p. 423-429, 2006.

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

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis.

CELEBIOGLU, H. Y.; CEKEMECELIOGLU, D.; DERVISOGLU, M.; KAHYAOGLU, T; Effect of extraction on hemicellulose yields and optimization for industrial processes. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, v.47, p.2597-2605, 2012.

CHANDRA, R.P.; GOURLAY, K.; KIM, C.; SADDLER, J.N. Enhancing hemicellulosic recovery and the enzymatic hydrolysis of cellulose by adding liginosulfonates during the two-stage steam pretreatment of poplar. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.3, p.986-991, 2015.

CHIMPHANGO, A. F. A; VAN ZYL, W. H.; GÖRGENS, J. F. Isolation, characterization and enzymatic modification of water soluble xylans from *Eucalyptus grandis* wood and sugarcane bagasse. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 1419–1429, 2012.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005

CORTEZ, D. V. et al. Evaluation of cellulosic and hemicellulosic hydrolysate fermentability from sugarcane bagasse hybrids with different compositions. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 0–5, 2014.

CYRAN, M.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Structural features of arabinoxylans extracted with water at different temperatures from two rye flours of diverse breadmaking quality. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.51, p.4401-4416, 2003.

DE LOPEZ, S; TISSOT M.; DELMAS, M. Integrated cereal straw valorization by an alkaline pre-extraction of hemicellulose prior to soda-anthraquinone pulping, case study of barley straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 4, p. 201–211, 1996.

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.

DING, D. et al. How does hemicelluloses removal alter plant cell wall nanoscale architecture and correlate with enzymatic digestibility?. **Bioenergy Research**, v.9, n.2, p.601-609, 2015.

EBRINGEROVÁ, A; HROMÁDKOVÁ, Z. Xylans of industrial and biomedical importance. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 16, n. June 2015, p. 325–346, 1999.

EBRINGEROVA. A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives- biopolymers with properties, 1 Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, v.21, p.542-556, 2000.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2006.

FAN, M.; DAI, D.; HUANG, B. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres, Fourier Transform. *Materials Analysis*, Dr Salih Salih. 2012. Disponível em: www.intechopen.com/books/fourier-transform-materials-analysis/fourier-transform-infraredspectroscopy-for-natural-fibres>. Acesso em: 12 de maio de 2016.

FENEL, F; ZITTINGA, A; KANTELINEN, A. Increased alkali stability in *Trichoderma reesei* endo-1,4-xylanase II b site directed mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 212, p. 102-107, 2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1983. p. 613.

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.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GANGULI, N. K.; TURNER, M. A. A simplified method for extracting water-extractable arabinoxylans from wheat flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.1905–1910.

GAO, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.144, p. 396–400, 2013.

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, 2013,

GATENHOLM, P; TENKANEN, M. Hemicelluloses: Science and Technology. American Chemical Society, 2003.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOMES, K. R.; CHIMPHANGO, F.A.; GÖRGENS, J.F. Modifying solubility of polymeric xylan extracted from *Eucalyptus grandis* and sugarcane bagasse by suitable side chain removing enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v.131, p.177–185, 2015.

GOURLAY, K. et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

HAKALA, T. K.; LIITIÄ, T.; SUURNÄKKI, A. Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 102–108, 2013.

HELMERIUS, J. et al. Impact of hemicellulose pre-extraction for bioconversion on birch Kraft pulp properties. **Bioresource Technology**, v.101, n.15, p. 5996–6005, 2010.

HEMSWORTH, G. R.; DAVIES, G. K.; WALTON, P.H. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, v.23, p.660–668, 2013.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and Carbohydrate Chemistry . In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

HIDENO, A. et al. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology*, v.100, n.10, p.2706-2711, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**. v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.

HÖIJE, A. et al. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 266–275, 2005.

HOLIK, H. Handbook of paper and board, Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim. 505 p, 2006.

HOLLMANN, J.; LINDHAUER, M. G. Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 2, p. 225–230, 2005.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308, 2014.

ISROI et al. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 5224–5259, 2011.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R. D. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1993, p.315-346.

JUNG, J.H. et al. RNA interference suppression of lignin biosynthesis increases fermentable sugar yields for biofuel production from field-grown sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v.11, n.6, p.709-716, 2013.

JUTURU, V; WU, C.J. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1219-1227, 2012.

KABEL, M.A. et al. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.94-105, 2007.

KAMM, B; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.137-145, 2004.

KULKARNI, A. R. et al. Comparison of arabinoxylan structure in bioenergy and model grasses. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 222–229, 2012.

KULKARNI, N; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Microbiology reviews**. V.23, p411-456, 1999.

LAM. T.B.T; KADOYA, K; IYAMA, K. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not position, in grass cell walls. **Phytochemistry**, v.57, p.987-992, 2001.

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.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. **Holzforrschung**, v.60, p.156-161, 2006.

LEU, S.; ZHU, J. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. **Bioenergy Research**, v.6, p. 405-415, 2013.

LI, J. et al. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 11, p. 1442–1449, 2007.

LINDER, A.; BERGMAN, R.; BODIN, A.; GATENHOLM, P. Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. **Langmuir**, v.19, p.5072-5077, 2003.

LIU, Z.; NI, Y.; FATEHI, P.; SAEED, A. Isolation and cationization of hemicelluloses from pre-hydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp process. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.1789-1796, 2011.

LIU, Y.Y et al. Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, p.1-6, 2016.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n.55, p.10, 2011.

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.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

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

MUSSATO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.124-129, 2008.

OH, H.Y et al. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.32, n.10, p. 1945-1959, 2015.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 2012.

PAN, X. et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p. 1069-1079, 2005.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

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, p. 879-903, 2012.

PERISSOTO, Danyella Oliveira. **Estudo comparativo das propriedades químicas de polpas kraft convencionais e MCC de eucalipto**. Tese- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1, p. 34-43. 2008.

RABETAFIKA, H. N. et al. Comparative study of alkaline extraction process of hemicellulose from pear pomace. **Biomass and Bioenergy**, v.61, p. 254-264, 2014.

REINOSO, F.A. **Extração enzimática e caracterização das hemiceluloses do bagaço de cana-de-açúcar**. Qualificação de Doutorado- Escola de Engenharia de Lorena, 2016.

REMOND, C. et al. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.101, p. 6712-6717, 2011

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

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SANTI-JUNIOR, C. et al. The effects of lignin removal and dryins on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v.20, n.6, p. 3165-3177,2013.

SARKAR, S; ALVAREZ, V. H; SALDAÑA, M.D.A. Relevance of ions in pressurized fluid extraction of carbohydrates and phenolics from barley hull. **Journal of Supercritical Fluids**, v.93, p.27-37, 2014.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fracionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 301-304, 2003.

SAULNIER, L. et al. Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 261–281, 2007.

SCALBERT, A. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1359–1362, 1985.

SCOTT, R. W. Colorimetric determination of hexenuronic acids in plant materials. **Analytical Chemistry**, v.51, p.936-941, 1979.

SHEKIRO III, J. et al. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 23, 2014.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES A. M.F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399-402, 2013.

SJOSTROM, E. Wood chemistry fundamentals and applications. San Diego: Academic press, 1993. p.130.

SHUAI, L. et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v.101, n.9, p.3106-3114, 2010.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F; KIEMLE, D.J. Identificação espectométrica de compostos orgânicos, Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINITSYN; A.P.; GUSAKOV,A.V.; VLASEN,E.Y.;. Effect os structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.30, p.43-59, 1991.

SPIRIDON, I.; POPA, V. I. Hemicelluloses : Major Sources , Properties and Applications. [s.d.].

SRNDOVIC, J. S. **Interactions between Wood Polymers in Wood Cell Walls and Cellulose/Hemicellulose Biocomposites**. Thesis for degree of doctor of philosophy.Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology. Göteborg, Sweden, 2011.

STERNEMALM, E.; HÖIJE, A.; GATENHOLM, P. Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 753–757, 2008.

SUKHBAATAR, B. et al. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 196–202, 2014.

SUN, X. F.; SUN, R. C.; SUN, J. X. Oleoylation of sugarcane bagasse hemicelluloses using N-bromosuccinimide as a catalyst. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 8, p. 800–810, 2004.

SUN , R.; TOMKINSON, J.;. Hemicelluloses and their derivatives. In Hemicelluloses: Science and Technology. **American Chemical Society**. p. 2–22, 2004.

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, S; SUN, S; CAO, X; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v.199, p.49-58, 2016.

TABKA, M.G.; HERPOËL-GIMBERT.I.; MONOD, F.; ASHTER,M.; SIGOILLOT, J.C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.897-902, 2006.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689–692, 1987.

TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech**, v.15, p.7-16, 1997.

TELEMAN, A. et al. 4-O-methyl-beta-1-idopyrano-syluronic acid linked to xylan from kraft pulp isolation procedure and characterization by nmr- spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 293, p. 1-13, 1996.

TELEMAN, A. Hemicelluloses. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; POTANEN, K, VIIKARI, L. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*., v.14, p. 566-574, 1992.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, n. 30, p. 1458–1480, 2012.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 185–193, 2010.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 387-393, 2000.

VENA, P. F.; GARCIA-APARICIO.; BRIENZO, M.; GÖRGENS, J. F; RYPSTRA, T. Impact of hemicelluloses pre-extraction on pulp properties of sugarcane bagasse. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 47, p. 425-441, 2013.

WANG, Y. et al. Systematic Isolation and Utilization of Lignocellulosic Components from Sugarcane Bagasse. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 14, p. 2217–2224, 2013a.

WANG, Z. et al. Lignosulfonate-mediated cellulase adsorption: enhanced enzymatic saccharification of lignocellulose through weakening nonproductive binding to lignin. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 156, 2013b.

WANG, Y. et al. Stabilization of Polysaccharides During Alkaline Pre-Treatment of Wood Combined with Enzyme-Supported Extractions in a Biorefinery. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 35, n. 2, p. 91–101, 2015.

WEI, L.; SHRESTHA, A.; TU, M.; ADHIKARI, S. Effects of surfactante on biochemical and hydrothermal conversion of softwood hemicellulose to ethanol and furan derivatives. **Process Biochemistry**, v.46, p.1785-1792, 2011.

WESTBYE, P.; KÖNKE, T.; GLASSER, W.; GATENHOLM, P. The influence of lignin on the self-assembly behavior of xylan rich fractions from birch (*Betula pendula*). **Cellulose**, v.14, n.6, p.603-613, 2007.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.170-176, 2010.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 207–217, 2005.

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.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 86, n.1, p.88-95, 2004.

YANG, H.; CHEN, Q.; WANG, K.; SUN, R. Correlation between hemicelluloses-removal-induced hydrophilicity variation and the bioconversion efficiency of lignocelluloses. **Bioresource Technology**, v.147, p.539-544, 2013.

YANG, H. et al. The Synergic Relationship between xylan removal and enhanced cellulose digestibility for bioethanol production: reactive area, crystallinity and inhibition. **Bioenergy Research**, v.8, p.1847-1755, 2015.

YU, Z. et al. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. **ChemSusChem**, v. 7, n. 7, p. 1942–50, 2014.

ZAKARIA M.R; HIRATA S.; HASSAN M.A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology**, v.169, p. 236-243, 2014.

ZENG, M. et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: Enzymatic hydrolysis (part 1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 390–397, 2012.

ZENG, Y.; ZHAO, S.; YANG, S.; DING, S. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p.38-45, 2014.

ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, R.J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.

ZHANG, J. et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n.12, p.1-13, 2011.

ZHANG, Z.; SMITH, C.; LI, W. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. **Food Research International**, v. 65, p. 423–436, 2014.

ZHU, J. Y. et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–2418, 2009.