UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FELIPE ANDRÉS MONTOYA REINOSO

**Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado
com sulfito alcalino, extração enzimática da hemicelulose e sacarificação
dos polissacarídeos residuais**

Lorena – SP

2017

FELIPE ANDRÉS MONTOYA REINOSO

**Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado
com sulfito alcalino, extração enzimática da hemicelulose e sacarificação
dos polissacarídeos residuais**

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

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

Versão Corrigida

Lorena – SP

Dezembro, 2017

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)

Reinoso, Felipe Andrés Montoya

Caracterização físico-química do bagaço de cana-de
açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, extração
enzimática da hemicelulose e sacarificação dos
polissacarídeos residuais / Felipe Andrés Montoya
Reinoso; orientadora Adriane Maria Ferreira
Milagres - Versão Corrigida. - Lorena, 2017.
152 p.

Tese (Doutorado 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. 2017
Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Pré-tratamento químio-termomecânico. 2. Xilana.
3. Arabinose. 4. Xilanase. 5. Padrão de substituição.
I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira ,
orient.

*Dedico este trabajo a la memoria de mi amado
hijo Martín, a mi incondicional amor y compañera
Maiara, y a toda mi familia. Gracias por la luz en
los momentos de oscuridad.*

Fragmentos do poema: "A Morte Devagar" (Martha Medeiros)

"Morre lentamente quem não troca de ideias, não troca de discurso, evita as próprias contradições... Morre lentamente quem vira escravo do hábito, repetindo todos os dias o mesmo trajeto e as mesmas compras no supermercado. Quem não troca de marca, não arrisca vestir uma cor nova, não dá papo para quem não conhece... Morre lentamente quem evita uma paixão, quem prefere o preto no branco e os pingos nos is a um turbilhão de emoções indomáveis, justamente as que resgatam brilho nos olhos, sorrisos e soluços, coração aos tropeços, sentimentos... Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz no trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto atrás de um sonho, quem não se permite, uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos... Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não acha graça de si mesmo... Morre lentamente quem passa os dias queixando-se da má sorte ou da chuva incessante, desistindo de um projeto antes de iniciá-lo, não perguntando sobre um assunto que desconhece e não respondendo quando lhe indagam o que sabe... Morre muita gente lentamente, e esta é a morte mais ingrata e traiçoeira, pois quando ela se aproxima de verdade, aí já estamos muito destreinados para percorrer o pouco tempo restante. Que amanhã, portanto, demore muito para ser o nosso dia. Já que não podemos evitar um final repentino, que ao menos evitemos a morte em suaves prestações, lembrando sempre que estar vivo exige um esforço bem maior do que simplesmente respirar"

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente a meus pais, Waleska e Richard, e a minhas irmãs, Amparo, Conny e Mariella, pelo amor, carinho, compreensão e amizade nos momentos de alegria e de dificuldades.

A meus padrinhos, Graciela e Rómulo, e a meus primos, Gonzalo e Rómulo, por me permitir ser parte da sua família.

Às minhas avós “Hol” e “Lolo”, pelos anos de amor e dedicação.

Aos meus avôs, Ricardo e Santos Rómulo, “*in memoriam*”, pelo amor e ensinamentos. SAUDADES.

Ao “Consulado do Chile”, pelo apoio, amizade, e os muitos momentos de descontração. Muito obrigado M. Fernanda e Omar, a vida sem vocês no Brasil teria sido tão legal.

A quem sempre esteve comigo, torcendo e acreditando em mim muitas vezes mais do que eu, como uma luz iluminando meu caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Adriane, pela orientação, paciência, apoio, dedicação e confiança. Muito obrigado!

Aos meus grandes amigos, Alejandro, Angélica, Carlos, Carolina, Claudio, Denisse, Jaime, Paulo, Roberto, Obrigado, amigos!

Aos amigos de laboratório, Bárbara, Dani, Ju, Yvi, por ajudar a conduzir as atividades de pesquisa, pela ajuda com o Português e também pelos momentos de diversão e alegria durante o trabalho.

Aos demais companheiros do Departamento, pelos momentos de descontração.

Ao Zé Moreira, Zé Cobrinha e Djalma, pela constante ajuda e disposição.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar meu doutorado.

À todo o povo brasileiro, pelo maior benefício que uma nação pode ofertar: EDUCAÇÃO PÚBLICA, GRATUITA e de QUALIDADE, muito obrigado mesmo!

RESUMO

REINOSO, F.M. **Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, extração enzimática da hemicelulose e sacarificação dos polissacarídeos residuais**. 2017. 152p. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2017.

No presente trabalho o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado quimio-termomecanicamente (QTM) com três concentrações de solução sulfito alcalino (g/100 g de bagaço): 2,5% Na₂SO₃ e 1,25% NaOH (QTM2,5%); 5% Na₂SO₃ e 2,5% NaOH (QTM5%), 10% Na₂SO₃ e 5% NaOH (QTM10%), e posteriormente refinado num refinador de discos, visando incrementar a acessibilidade da parede celular para extrair enzimaticamente as hemiceluloses. O bagaço também foi pré-tratado com clorito ácido por 2 horas (D2) e 4 horas (D4), para gerar um substrato modelo com baixo teor de lignina. A composição original do bagaço de cana-de-açúcar foi de 32,3% de celulose, 28,5% de hemicelulose e 22,0% de lignina (g/100 g de bagaço original). Depois de pré-tratados, as remoções de lignina foram de 18%; 31% e 48% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. Parte das hemiceluloses foi removida, em níveis de 22% para os bagaços QTM2,5% e QTM5% e 17% para o QTM10%. O pré-tratamento clorito ácido removeu lignina em níveis de 55% e 75% para os bagaços D2 e D4, respectivamente; e 10% da hemicelulose no bagaço D4. As hemiceluloses de todos os bagaços pré-tratados foram extraídas com 3 diferentes preparados de endo-xilanases comerciais, usando 20UI/g de bagaço, em pH=8.0 (tampão fosfato 50 mM), 50°C e uma relação sólido:líquido de 1:20. Após 24h de reação, a xilanase Luminase apresentou os melhores rendimentos de extração de xilana com valores de: 4%, 7% e 32% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente; e de: 34% e 55% para os bagaços D2 e D4, respectivamente. A extração se correlacionou linearmente com a remoção de lignina ($R^2=0,97$) e ácidos hidroxicinâmicos ($R^2=0,88$ para ácido ferúlico; $R^2=0,80$ para ácido p-coumárico), e com o aumento da área superficial acessível de celulose ($R^2=0,95$). Não foi observada a produção de açúcares monoméricos nas xilanas extraídas. Aumentando a carga enzimática em 20 vezes (100 UI) no bagaço QTM10% e em 12 vezes (60 UI) no bagaço D4 a extração da xilana aumentou 29% e 21%, respectivamente, sugerindo que além da lignina e ácidos hidroxicinâmicos, existem outros impedimentos a extração. O bagaço QTM10% foi extraído sequencialmente duas vezes com 100UI de Luminase por grama de bagaço, e posteriormente sacarificado com celulasas comerciais. Os resultados mostraram que primeiro são extraídas as xilanas mais substituídas com arabinose e que a extração da xilana favorece a sacarificação da celulose residual, quando comparado com um material simplesmente pré-tratado. Entretanto, para aceder a toda a xilana do bagaço, é necessário hidrolisar parte da celulose, indicando que o pré-tratamento QTM10% não consegue quebrar por completo a alta interação celulose-hemicelulose. A pré-incubação do bagaço QTM10% por 8h com endoglucanase, seguida da reação com xilanase por 24h, aumentou a extração de xilana em 17,6%. As xilanas extraídas podem ser recuperadas por precipitação com etanol. Análises de ressonância magnética nuclear mostraram que a xilana extraída corresponde a glucurono-arabinoxilana, sendo detectados também ácido p-coumárico, baixas quantidades de lignina e proteínas, derivados do processo de extração.

Palavras chaves: Pré-tratamento quimio-termomecânico. Xilana. Arabinose. Xilanase. Padrão de substituição.

ABSTRACT

REINOSO, F.M. **Physicochemical characterization of alkaline-sulfite pretreated sugarcane bagasse, enzymatic hemicellulose extraction and saccharification of residual polysaccharides**. 2017. 152p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2017.

In the present work, the sugarcane bagasse was pretreated with a chemithermomechanically (CTM) process using three concentrations alkaline-sulfite solution (g/100 g of bagasse): 2,5% Na₂SO₃ e 1,25% NaOH (QTM2,5%); 5% Na₂SO₃ e 2,5% NaOH (QTM5%), 10% Na₂SO₃ e 5% NaOH (QTM10%), and disk refining with the aim of increasing cell wall accessibility for subsequent extraction of the hemicellulose fraction. Besides, bagasse was delignified with acidic sodium chlorite for 2 hours (D2) and 4 hours (D4), to produce a model with low lignin content. The original composition of sugarcane bagasse was 38.3% of cellulose, 28.5% of hemicellulose and 22.0% of lignin (g/100 g of original bagasse). After pretreatment, the lignin removal were 18%; 31% e 48% for the bagasse CTM2,5%, CTM5% e CTM10%, respectively. A part of the hemicellulose was removed at levels of 22% for the bagasse CTM2,5%, CTM5% and 17% for QTM10%. Acid chlorite pretreatment removed lignin at 55% and 75% levels for D2 and D4, respectively; and 10% of hemicellulose in D4 bagasse. Hemicelluloses from all pre-treated bagasses were extracted with 3 different commercial endoxylanases preparations using 20UI/g of bagasse, at pH 8.0 (phosphate buffer 50 mM), 50°C and solid:liquid ratio of 1:20. After 24h of reaction, Luminase xylanase showed the best xylan extraction yields of: 4%, 7% and 32% for QTM2,5%, QTM5% and QTM10%, respectively; and of: 34% and 55% for D2 and D4, respectively. The xylan extraction correlated linearly with lignin ($R^2=0.97$) and hidroxycinnamic acid ($R^2=0.88$ for ferulic acid; $R^2=0.80$ for p-coumaric acid) removal, and with the increase of accessible surface area of the cellulose ($R^2=0.95$). The production of monomeric sugars in the extracted xylan was not observed. Increasing enzymatic loading by 20 times (100 UI) for the bagasse CTM10% and 12 times (60 UI) for the D4 bagasse, the xylan extraction was increased 29% and 21%, respectively, suggesting that besides lignin and hydroxycinnamic acids, there are other impediments to enzymatic extraction. The QTM10% bagasse was extracted sequentially twice with 100UI of Luminase per gram of bagasse, and then saccharified with commercial cellulases. The results showed that the xyloses most substituted with arabinose are extracted first and that the extraction of the xylan favors the saccharification of the residual cellulose as compared to a simply pretreated material. However, to access all the bagasse xylan, it is necessary to hydrolyze part of the cellulose, because the QTM10% pretreatment was not enough to completely disintegrate the high cellulose-hemicellulose interaction. Pre-incubation of the QTM10% bagasse for 8h with endoglucanase, followed by xylanase reaction for 24h, increased the xylan extraction by 17.6%. Extracted xyans were recovered by precipitation with ethanol and characterized. Chemical and nuclear magnetic resonance analysis showed that extracted xylan corresponds to a glucurono-arabinoxylan with residues of p-coumaric acid and low amounts of lignin and proteins, derived from the extraction process.

Keywords: Chemithermomechanicall pretreatment. Xylan. Arabinose. Xylanases. Substitution pattern.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e interações da molécula de celulose.	24
Figuras 2: Representação esquemática de uma xilana de gramínea.	25
Figuras 3: Representação esquemática da ligação entre uma glucurono-arabinosilana (GAX) e ácido ferúlico.	26
Figuras 4: Representação esquemática das principais estruturas e ligações da lignina do bagaço. .	27
Figuras 5: Modelo simplificado da estrutura de uma parede celular de plantas.	29
Figuras 6: Tipos de interação entre a molécula de lignina e os polissacarídeos.	30
Figuras 7: Modelo de conformação estrutural da xilana na parede secundária de dicotiledôneas. ...	32
Figura 8: Modelo hipotético de interação entre a celulose e a xilana em parede secundária de dicotiledôneas.	33
Figura 9: Reação de sulfonação da lignina em meio alcalino.	37
Figura 10: Representação da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas atuam.	44
Figura 11: Esquema da hidrólise enzimática de uma glucurono-xilana com xilanases da família 10 e 11.	45
Figura 12: Modelo de degradação da celulose pela combinação de enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para a sua degradação.	47
Figura 13: Representação esquemática do aparato de centrifugação.	54
Figura 14: Esquema do experimento realizado para extrair o máximo de arabinosilana com extrações sucessivas e lavagens do material resultante da hidrólise.	63
Figura 15: Correlação entre a remoção da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos após os pré-tratamentos.	75
Figura 16: 2D-RMN-HSQC do bagaço sem pré-tratar, pré-tratado com diferentes cargas de sulfito e álcali e deslignificado com clorito ácido.	78
Figura 17: Correlação entre a remoção da lignina e a introdução de íons sulfito após pré-tratamento QTM.	85
Figura 18: Extração enzimática de xilanas dos bagaços pré-tratados com 20 UI/g de bagaço de xilanases de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (○); EDT (Δ); Luminase (□)	89
Figura 19: Correlação entre a lignina removida e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços QTM pré-tratados com: 2,5% Na ₂ SO ₃ + 1,25% NaOH (■); 5% Na ₂ SO ₃ + 2,5% NaOH (▲); 10% Na ₂ SO ₃ + 5% NaOH (★); e deslignificados com clorito ácido por 2 (⊕) e 4 horas (●). .	91
Figura 20: Correlação entre os ácidos hidroxicinâmicos removidos e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços QTM pré-tratados com: 2,5% Na ₂ SO ₃ + 1,25% NaOH (■); 5% Na ₂ SO ₃ + 2,5% NaOH (▲); 10% Na ₂ SO ₃ + 5% NaOH (★); e deslignificados com clorito ácido por 2 (⊕) e 4 horas (●).	92
Figura 21: Correlação entre a área superficial acessível da celulose (DO/DB) e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços CTM pré-tratados com: 2,5% Na ₂ SO ₃ + 1,25% NaOH (□); 5% Na ₂ SO ₃ + 2,5% NaOH (▲); 10% Na ₂ SO ₃ + 5% NaOH.	94
Figura 22: Produtos solúveis dos bagaços pré-tratados e extraídos, analisados por cromatografia em camada delgada (TLC).....	95
Figura 24: Rendimento de extração enzimática de xilana com (—●—) 5 UI e (—○—) 60 UI por grama de bagaço de xilanases (Luminase) no substrato deslignificado por 4 horas com clorito ácido.	98
Figura 25: Compostos fenólicos liberados durante a extração de arabinosilana do bagaço pré-tratado pelo processo sulfito alcalino usando diferentes cargas do preparado enzimático Luminase.	100
Figura 26: Primeira extração de arabinosilana do bagaço pré-tratado QTM10%.	102
Figura 27: Recuperação de arabinosilanas por lavagens com água e relação molar xil/ara.	104

Figura 28: Segunda extração de arabinoxilana do bagaço pré-tratado QTM10% pré-extraído com xilanase (100UI de luminase/g de bagaço). (A) Cinética da extração. (B)	105
Figura 29: Recuperação de arabinoxilanas por lavagens com água e relação molar xil/ara após 48 horas de extração.	107
Figura 30: TLC dos açúcares solubilizados durante a extração (48 horas) da arabinoxilana do bagaço pré-tratado e nas lavagens com água destilada.....	109
Figura 31: Hidrólises enzimática da celulose e xilana dos sólidos resultantes após primeira (A e B) e segunda (C e D) extração das xilanas.	111
Figura 32: Relações molares entre glicose e xilose depois da primeira (A) e segunda (B) extração.	114
Figura 33: Efeito de proteínas auxiliares na extração da xilana do bagaço pré-tratado com clorito por 4 horas (D4). (A) 24 horas de extração. (B) 48 horas de extração.	117
Figura 34: Efeito de proteínas auxiliares na extração da xilana do bagaço QTM10%. (A) 24 horas de extração. (B) 48 horas de extração.....	119
Figura 35: Cromatografia em camada delgada (TLC) das frações de xilana recuperadas da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (10% de Na ₂ SO ₃ e 5% de NaOH).	123
Figura 36: Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex-G75.	124
Figura 37: Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex-G75.	125
Figura 38: Espectro 2D-RMN ($\delta C/\delta H$ 52-135/2.4-7.8) da xilana extraída enzimaticamente do bagaço QTM10% e principais estruturas atribuídas aos sinais encontrados.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais pré-tratamentos utilizados para aumentar a acessibilidade aos carboidratos.	35
Tabela 2 - Caracterização química do bagaço in natura, pré-tratado com sulfito alcalino e deslignificado com clorito ácido.	70
Tabela 3 - Principais constituintes da hemicelulose dos diferentes bagaços utilizados.	71
Tabela 4 - Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço in natura e pré-tratados.	74
Tabela 5 - Atribuições das principais correlações dos sinais $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ no espectro 2D HSQC dos bagaços sem pretratar, QTM pré-tratado com diferentes cargas sulfito e álcali e deslignificado com clorito ácido por 2 horas em DMSO- d_6 .	76
Tabela 6 - Relações molares entre os diferentes componentes da GAX dos bagaços utilizados.	80
Tabela 7 - Grupos ácidos e retenção de água dos diferentes bagaços.	84
Tabela 8 - Adsorção dos corantes laranja (Direct Orange, DO), azul (Direct blue, DB) e a relação deles (DO/DB), no bagaço in natura e pré-tratados.	86
Tabela 9 - Atividade de xilanases em pH 8.0 e proteínas dos extratos comerciais	88
Tabela 11 - Atribuições complementares dos sinais dos carboidratos no espectro 2D-NMR HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$.	126

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 ULTRAESTRUTURA E TOPOQUÍMICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	23
2.3 PRÉ-TRATAMENTOS	34
2.3.1 <i>Pré-tratamentos mais seletivos para a remoção de lignina</i>	36
2.3.1.1 <i>Pré-tratamento clorito em meio ácido</i>	36
2.3.1.2 <i>Pré-tratamento químio-termomecânico</i>	37
2.4 APROVEITAMENTO DA HEMICELULOSE.....	38
2.4.1 <i>Aplicações da hemicelulose</i>	42
2.4.1 <i>Aplicações da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar</i>	43
2.5 HEMICELULASES E CELULASES	44
2.5.1 <i>Hemicelulases</i>	44
2.5.2 <i>Celulases</i>	47
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E PRÉ-TRATAMENTOS	50
4.1.1 <i>Pré-tratamento químio-termomecânico (QTM) usando diferentes cargas de sulfito alcalino</i>	50
4.1.2 <i>Deslignificação com clorito ácido</i>	50
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS BAGAÇOS IN NATURA E PRÉ-TRATADOS	51
4.2.1 <i>Determinação da composição química</i>	51
4.2.2 <i>Determinação dos ácidos hidroxicinâmicos</i>	52
4.2.3 <i>Determinação dos ácidos urônicos</i>	52
4.2.4 <i>Análise por RMN-2D de coerência quântica heteronuclear única $^1\text{H}/^{13}\text{C}$</i>	53
4.2.5 <i>Determinação dos grupos ácidos</i>	53
4.2.6 <i>Retenção de água</i>	54
4.2.7 <i>Determinação da área superficial acessível de celulose</i>	55
4.2.8 <i>Determinação do grau de refino</i>	57
4.3 ENZIMAS	57
4.3.1 <i>Atividades enzimáticas e concentração de proteínas</i>	57
4.3.1.1 β -D-Xilanase	57
4.3.1.2 β -D-Xilosidase.....	58
4.3.1.3 <i>Celulases totais</i>	58
4.3.1.4 β -glicosidase	59
4.3.1.5 <i>Endoglucanase</i>	59
4.3.1.6 <i>Proteínas totais</i>	60
4.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA E RECUPERAÇÃO DA ARABINOXILANA EXTRAÍDA DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS	60
4.4.1 <i>Extração enzimática empregando diferentes xilanases comerciais</i>	60
4.4.2 <i>Extração enzimática com diferentes cargas do preparado comercial Luminase</i>	61
4.4.3 <i>Extrações sucessivas de xilana</i>	62
4.4.4 <i>Efeito de proteínas auxiliares na extração de xilana do bagaço pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH</i>	62
4.4.5 <i>Recuperação das xilanas extraídas</i>	64
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ARABINOXILANAS EXTRAÍDAS DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS	64
4.5.1 <i>Composição química das arabinoxilanas extraídas</i>	64
4.5.2 <i>Cromatografia em camada delgada (TLC)</i>	65
4.5.3 <i>Separação cromatográfica das xilanas extraídas enzimaticamente</i>	65

4.5.4 Determinação dos fenóis totais	66
4.6 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO SÓLIDO RESIDUAL EMPREGANDO CELULASES COMERCIAIS	66
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E PRÉ-TRATADOS ...	68
5.1.1 Composição química dos bagaços	68
5.1.2 Retenção de água, grupos ácidos e celulose superficial acessível do bagaço de cana-de-açúcar	81
5.2 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DA XILANA DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS.	88
5.2.1 Extração enzimática da xilana dos bagaços pré-tratados empregando diferentes cargas de xilanase	96
5.2.2 Fenóis solubilizados dos materiais tratados com xilanase	100
5.3 INFLUÊNCIA DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO COM ARABINOSE NA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ARABINOXILANA.	102
5.4 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO SÓLIDO RESIDUAL	111
5.5 USO DE PROTEÍNAS AUXILIARES PARA AUMENTAR A EXTRAÇÃO DE ARABINOXILANAS DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM CLORITO ÁCIDO POR 4 HORAS E QTM10%	116
5.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS EXTRAÍDAS DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM SULFITO ALCALINO.....	122
5.5.1 Recuperação das xilanas extraídas.....	122
5.5.2 Caracterização das xilanas recuperadas	124
6. CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS	131
APÊNDICE	151

1. Introdução

A cana-de-açúcar é cultivada em aproximadamente 200 países, sendo o Brasil o responsável por 25% da produção mundial (SINDHU et al., 2016). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana-de-açúcar foi de 665 milhões de toneladas durante a safra 2015/2016. O processamento desta gramínea gera 13,5% de bagaço como resíduo lignocelulósico (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), estimando-se a produção de 90 milhões de toneladas deste subproduto para a safra supracitada. O bagaço constitui-se de aproximadamente 70% de carboidratos (celulose e hemicelulose), 22% de lignina e em proporções menores são encontradas proteínas, lipídeos e substâncias inorgânicas (CARVALHO et al. 2015). A maior parte deste material é queimada para produzir vapor (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2017). Contudo, o poder calorífico dos polissacarídeos é inferior ao da lignina (LI et al., 2014; YAO et al., 2015), existindo na literatura trabalhos que visam o melhor aproveitamento da fração celulósica (CARROLL; SOMERVILLE 2009; SINDHU et al., 2016) e hemicelulósica (EBRINGEROVÁ, 2006; PENG et al., 2012 SINDHU et al., 2016).

O aproveitamento integral do bagaço, dentro do conceito de biorrefinaria, requer a utilização de tecnologias que permitam utilizar de forma eficiente seus componentes. A literatura reporta diferentes tipos de pré-tratamentos para desestruturar a compacta e altamente organizada matriz lignocelulósica, no intuito de facilitar a separação e/ou conversão da lignina, celulose e hemicelulose (HIMELL et al., 2007; PAULY e KEEGSTRA, 2008; KARIMI e TAHERZADEHC, 2016). Condições empregadas na maioria dos pré-tratamentos degradam a hemicelulose, devido ao seu baixo grau de polimerização (80-200) e a sua estrutura ramificada. Entretanto, os pré-tratamentos alcalinos preservam a estrutura polimérica das hemiceluloses, sendo sugeridos para seu aproveitamento (KARIMI e TAHERZADEHC, 2016, KIM; LEE; KIM, 2016).

O pré-tratamento químio-termomecânico (QTM) do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando uma solução de sulfito alcalino e um refinador de discos, tem se mostrado apropriado para o aproveitamento integral do bagaço. Este processo se baseia nos fundamentos da polpação sulfito de madeira, e por isso tem a vantagem de não necessitar desenvolvimento de tecnologias e equipamentos para a sua aplicação, que é um dos desafios de muitos pré-tratamentos com potencial de utilização nas biorrefinarias (ZHU et al., 2009).

O pré-tratamento QTM do bagaço de cana-de-açúcar, usando 10% (m/m) de sulfito de sódio e 5% (m/m) de hidróxido de sódio, solubiliza parcialmente a lignina e preserva a maior parte dos carboidratos (MENDES et al., 2011; 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2015). Devido à incorporação de íons sulfito, a lignina residual torna-se mais hidrofílica, ocorre o inchamento das fibras e o aumento na porosidade da parede celular (ZHU et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2017). As modificações na composição química e na estrutura do bagaço promovem um aumento da eficiência da sacarificação enzimática. Resultados de conversão enzimática dos polissacarídeos em glicose e xilose acima de 80% foram obtidos aplicando cargas enzimáticas equivalentes a 10 FPU/g de substrato (MENDES et al., 2011; 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2015).

Muitas análises técnico-econômicas têm discutido que um dos obstáculos ao desenvolvimento das biorrefinarias é o alto custo das enzimas. A remoção da hemicelulose, previamente à adição das celulasas, poderia contribuir com a redução da carga enzimática e ainda assim alcançar os mesmos níveis de sacarificação. Isto se explica pela estrutura do material, pois a hemicelulose atua como uma barreira física à celulose (KUMAR, WYMAN 2009; SELIG et al., 2014; CARVALHO et al., 2015). Além disso, os produtos de hidrólise das hemiceluloses podem inibir as celulasas (QING e WYMAN, 2011; BAUMANN; BORCH, K.; WESTH et al., 2011; ZHANG; TANG; M.; VIKARI et al., 2012)

Outra grande vantagem associada à remoção da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado QTM, previamente à hidrólise enzimática da celulose, é evitar produzir um hidrolisado constituído de uma mistura de hexoses e pentoses, pois ainda não há micro-organismos que sejam empregados industrialmente, capazes de utilizar eficientemente ambos os açúcares (PAULOVA et al., 2015). Sendo assim, as hemiceluloses presentes no bagaço pré-tratado QTM com sulfito alcalino poderiam ser extraídas para sua melhor utilização.

O uso da hemicelulose tem sido estudado em diversas áreas, sendo indicadas aplicações na sua forma polimérica, como reforço de papéis, embalagens, filmes (PENG et al., 2012; LAINE et al., 2013; FARHAT et al., 2017) e também na sua forma oligomérica, como xilo-oligossacarídeos (XOs) (CHANG et al., 2017). Estas substâncias são usadas pela indústria farmacêutica e alimentícia, pois são indicados como pré-bióticos (RASTALL, 2010; BROEKAERT et al., 2011).

Para extrair as hemiceluloses são reportados métodos físico-químicos, enzimáticos, ou uma combinação destes (PENG et al., 2012). A alta especificidade das enzimas permite extrair xilanas puras, quando comparado com uma extração físico-química, além de manter inalterada a estrutura da celulose, diversificando seus possíveis usos (HAKALA, LIITIÄ, SUURNÄKKI, 2013). Para extrair enzimaticamente xilanas são usadas endo-xilanases (AACHARY e PRAPULLA, 2009; VAN DYK e PLETSCHE, 2012), as quais clivam a cadeia principal da hemicelulose, diminuindo seu grau de polimerização, facilitando a sua extração (MOREIRA e FILHO, 2016).

Dependendo das características bioquímicas, a maioria das endo-xilanases é classificada em duas grandes famílias: a família 10 (GH10) e a família 11 (GH11) de glicosídeo hidrolases. As duas famílias têm amplas aplicações industriais, porém as xilanases da família GH11, devido a seu menor tamanho (≤ 30 kDa) e maior ponto isoelétrico, têm sido as mais utilizadas para a hidrólise de xilanas presentes nas fibras vegetais, por exemplo no branqueamento de polpas celulósicas (PÄES et al., 2011; WALIA et al., 2017). O modo da ação da endo-xilanase junto a estrutura das xilanas determina os produtos de hidrólise (BIELY et al., 2016; MOREIRA e FILHO, 2016), e consequentemente a sua aplicação. É reportado que a GH11 requer pelo menos três resíduos de xilose não substituídos para agir, produzindo xilotriose e xilobiose, quando a enzima cliva entre cinco resíduos não substituídos.

A hemicelulose majoritariamente presente no bagaço de cana corresponde a 4-O-metil-D-glucurono-L-arabino-D-xilana (GAX) (EBRINGEROVÁ, 2006; CARVALHO et al., 2017). Apresenta uma cadeia principal linear constituída de unidades D-xilopirranose unidas por ligações β -D-(1 $\rightarrow$ 4), parcialmente substituída na posição O-3 com L-arabinosil ou ácido O-4-metil-D-glucurônico, e no carbono 2 e/ou 3 com o grupo acetil (CARVALHO et al., 2017). Quimicamente, a GAX pode interagir com a lignina através de ligações covalentes entre o ácido ferúlico e o O-5 da arabinose (ligação éster), e com a celulose através de ligações de hidrogênio. Estruturalmente, a GAX recobre a celulose, enquanto a lignina constitui uma barreira física e química que reveste e protege tanto a celulose como a hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1989; PAULY et al. 1999, RENNIE E SCHELLER 2014; MARRIOT et al., 2016).

Através de modelagem molecular tem sido proposta a existência de diferentes domínios da GAX. A celulose estaria em contato com um dos domínios, o qual se liga a outros domínios que possuem a função de conectar e separar os feixes de fibrilas celulósicas,

ajudando a estabilizar e manter a estrutura da parede celular secundária, evitando seu colapso (FENGEL; WEGENER, 1989; BUSSE-WICHER et al., 2016a). A compatibilidade de interação dos domínios com a celulose depende do grau de substituição da cadeia de xilana, levando a hemicelulose a adotar diferentes conformações para facilitar a interação (BUSSE-WICHER et al., 2014; 2016a).

A literatura mostra estudos que relacionam a substituição da hemicelulose e a interação com celulose. Köhnke et al., (2011) demonstraram experimentalmente que o grau de substituição da xilana com arabinose, assim como o padrão de substituição, influenciam a interação da arabinoxilana com a celulose microcristalina. Selig et al. (2015), mostraram que a remoção de arabinose de uma xilana solúvel de trigo com arabinofuranosidase, aumenta a união xilana-celulose, diminuindo drasticamente a hidrólise enzimática da fração celulósica. Vários autores mostram que xilanas mais substituídas melhoram a hidrólise da celulose (COSTA et al., 2016; LI et al., 2013, 2015). Por outra parte, o padrão de substituição das hemiceluloses também determina a sua solubilidade e viscosidade (EBRINGEROVÁ, 2006; MOREIRA E FILHO, 2016).

Dependendo das condições de pré-tratamento utilizadas, é possível modificar a estrutura das hemiceluloses. Estudos mostram a quase completa remoção dos grupos acetil da hemicelulose utilizando um pré-tratamento sulfito alcalino, enquanto a maior parte da arabinose permanece ligada (MESQUITA; FERRAZ; AGUIAR, 2015). Este efeito é importante, já que a esterificação com ácido acético na posição 2 e 3 do xilopiranosídeo representa um obstáculo à clivagem da xilana por enzimas (BIELY, 2012). Nessa lógica, Varnai et al. (2014) obtiveram uma melhora na hidrólise da xilana ao remover com acetil esterase o grupo acetil da xilana presente na medula da cana-de-açúcar. Estas evidências sugerem que as modificações na GAX e no bagaço, acarretadas pelo pré-tratamento QTM com sulfito alcalino, são compatíveis com a extração da GAX com endo-xilanases GH11.

Embora existam trabalhos sobre a extração química da GAX do bagaço de cana-de-açúcar, neste estudo se propôs avaliar a extração enzimática da GAX. Com base nisto, foram estudadas condições do pré-tratamento QTM do bagaço e da hidrólise enzimática de GAX visando aumentar a extração enzimática da xilana. Finalmente avaliou-se o efeito da remoção da xilana do bagaço pré-tratado na sacarificação da celulose residual, com o objetivo de conseguir um aproveitamento integral do bagaço de cana-de-açúcar, baseado no pré-tratamento QTM com sulfito e álcali.

2. Revisão de Literatura

2.1 Ultraestrutura e topoquímica da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica corresponde a biomassa de origem vegetal, sendo categorizada em 4 grandes grupos segundo sua origem: 1) Biomassa lenhosa 2) Resíduos agrícolas (bagaço de cana, palha de trigo, casca de café, etc.) 3) Cultivares energéticos (cana energia, madeira de rotação curta, etc.) 4) Resíduos do tipo celulósicos (resíduos derivados da indústria de celulose e papel, serragem, etc.) (KIM; LEE; KIM, 2016). Estas biomassas são fontes renováveis e abundantes, sendo consideradas como matérias primas potenciais para a conversão em bioprodutos, como o biocombustível e a nanocelulose, dentro do conceito das biorrefinarias (IEA BIOENERGY, 2009; FOELKEL, 2015).

Especificamente, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agrícola muito abundante no Brasil e, neste sentido, a instalação de uma biorrefinaria acoplada a uma usina sucroalcooleira, poderia utilizar melhor os polissacarídeos do bagaço (DOS SANTOS et al., 2015; JUNQUEIRA; CAVALETT; BONOMIL, 2016). Os principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar são a celulose (~ 40%), a hemicelulose (~25%) e a lignina (~22%) (CARVALHO et al. 2015).

A celulose é o polímero natural mais abundante na superfície terrestre e o principal constituinte da parede celular vegetal. Está composta por 5.000 a 15.000 resíduos de anidro-glicose unidos por ligações β -1,4, com os monômeros rotando alternadamente 180° (formando uma estrutura helicoidal) (FENGEL; WEGENER, 1989; BUSSE-WICHER et al., 2016a). Esta conformação com duas faces planas, permite que as cadeias se empilhem uma em cima das outras, interagindo por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Este arranjo se dá na forma de feixes, chamados de microfibrilas, apresentando uma face mais hidrofílica, que expõe os grupos OH, e outra menos hidrofílica, que expõe o anel do açúcar. A forma da microfibrila (quadrada ou hexagonal) e o número de cadeias de glucana não estão completamente definidos para todos os vegetais, mas é sugerido que pode variar entre 18 a 24 cadeias (MORGAN; STRUMILLO; ZIMMER, 2013; COSGROVE, 2014; PAYNE et al., 2015; BUSSE-WICHER et al., 2016a). A linearidade e tamanhos da molécula, somado à presença das ligações de hidrogênio, permitem a celulose formar uma supra estrutura cristalina, conferindo à parede celular resistência à tração, e fazendo que as

microfibrilas sejam insolúveis na maioria dos solventes. Na natureza também pode ser encontrada celulose amorfa entre as regiões cristalinas, a qual é mais hidrofílica que a região cristalina e pode ser facilmente hidrolisada por enzimas (HENRIKSSON e LENNHOLM, 2009) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura e interações da molécula de celulose. (A) Microscopia de força atômica de uma parede celular. (B) Microfibrila elementar de celulose. (C) Ligações de hidrogênio inter e intra moleculares. (D) Supra estrutura da molécula de celulose (E) Agregado de 4 microfibrilas elementares de celulose, mostrando giro helicoidal.

Fonte: Adaptado de Cosgrove (2014); Stokke; Wu; Han (2014).

A hemicelulose é o segundo polímero natural mais abundante na superfície terrestre. Dependendo do vegetal, pode ser constituída por diferentes hexoses (glicose, manose, galactose) e/ou pentoses (xilose e arabinose), ácidos urônicos e grupos acetil, podendo também conter pequenas quantidades de deoxihexoses (fucose, ramnose) (TELEMAN, 2009). Este polímero heterogêneo é classificado com base na cadeia principal linear com ligações β -1,4 de glicose, manose ou xilose, substituída com grupos pendentes (ácidos urônicos, grupos acetil, galactose, arabinose) (GLASSER et al., 2000b; TELEMAN, 2009). Devido à presença de grupos pendentes e à sua síntese, a hemicelulose não forma estruturas cristalinas, e seu grau médio de polimerização varia de 80 a 200 resíduos. O grau e tipo de

substituições nas hemiceluloses podem variar amplamente entre diferentes espécies vegetais, tipos celulares, e estágio de desenvolvimento (MARRIOT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2015).

A hemicelulose majoritariamente presente no bagaço de cana-de-açúcar corresponde a 4-O-metil-D-glucurono-L-arabino-D-xilana (GAX) (EBRINGEROVÁ, 2006; CARVALHO et al., 2017). Esta hemicelulose também é a predominante em tecidos de gramíneas (palha, caules, talos) e de cereais (pericarpo de grãos) (Figura 2).

Figuras 2: Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (■) 1,4-D-xilopiranosose; (■) L-arabinosil; (■) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (OAc) grupo acetil; (■) ácido ferúlico

Fonte: BUCKERIDGE; SOUZA, (2014).

A GAX apresenta uma cadeia principal linear constituída de unidades D-xilopiranosose unidas por ligações β -D-(1 $\rightarrow$ 4), parcialmente substituída na posição O-3 com L-arabinosil ou ácido 4-O-metil-D-glucurônico, e no carbono 2 e/ou 3 com o grupo acetil (CARVALHO et al., 2017). O oxigênio ligado ao carbono 3 do substituinte L-arabinosil pode apresentar ligações éster com o ácido ferúlico (Figura 3), sendo também descrito que pode interagir como o ácido coumárico, embora não seja claro o tipo de ligação (FENGEL; WEGENER, 1989; WENDE; FRY; 1997; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). No entanto, é indicado que no bagaço de cana-de-açúcar o ácido ferúlico interage mais com os polissacarídeos, enquanto o ácido *p*-coumárico se encontra majoritariamente γ -acilado na cadeia lateral de lignina.

Figuras 3: Representação esquemática da ligação entre uma glucurono-arabinoxilana (GAX) e ácido ferúlico. (A) Ácido ferúlico esterificado a um resíduo de arabinosil da GAX. (B) Dímero de ácido ferúlico fazendo de ponte entre duas GAX. (C) Ligação entre GAX-ácido ferúlico-lignina (Complexo lignina carboidrato, LCC).

Fonte: Modificado de Oliveira et al. (2014).

A lignina é uma macromolécula de natureza aromática e amorfa, que confere rigidez e hidrofobicidade à parede celular (HENRIKSSON, 2009). Apresenta diferença estrutural de uma espécie de vegetal a outra, ou até mesmo quando são analisadas partes diferentes de um mesmo vegetal (ACHYUTHAN et al., 2010). Os monômeros de lignina são basicamente unidades de fenilpropano, diferindo apenas na presença e posição do grupo metoxila no anel aromático. Os três principais monômeros (monolignóis) que formam o polímero de lignina são o álcool *p*-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). Em ligninas de gramíneas são encontradas proporções similares dos três precursores (HENRIKSSON, 2009). Del Río et al. (2015) estudaram em detalhe a estrutura da lignina do bagaço, usando técnicas de pirolises com cromatografia gasosa acoplado a espectroscopia de massas, e de ressonância magnético nuclear em duas dimensões. Os precursores da molécula de lignina, ácidos hidroxicinâmicos, e as principais estruturas encontradas no estudo de Del Río et al. (2015) se apresentam na figura 4.

Figuras 4: Representação esquemática das principais estruturas e ligações da lignina do bagaço. Estruturas β -O-4' (A), γ acilada com acetato ou *p*-coumaratos (B), α -oxidada (C). Estruturas formadas por acoplamentos: β -5' (D), β - β' de monolignóis γ -OH acilados (E), 5-5' seguido de acoplamento 4-O- β (F), α , β Diaril eter (G), β -O-1' (H). Unidades terminais da lignina: álcool *p*-hidroxicinamílico (I) γ -OH acilado (J), cinamaldeído (K), tricín (L). Unidades básicas da lignina: ácido *p*-coumárico (M), ácido ferúlico (N), unidade *p*-hidroxifenil (O), unidade guaiacil (P), unidade siringil (Q), unidade siringil oxidada no carbono α (R).

Fonte: Adaptado de Del Rio et al. (2015)

Os resultados mostraram que na lignina do bagaço predominam as estruturas S, com relações molares para as unidades H:G:S de 2:38:60, com uma relação S/G de 1,6. Outra molécula encontrada, que tem sido indicada como monômero de lignina e que tem a função de sitio de iniciação da lignificação foi a flavona tricín (2% da molécula de lignina, figura 4L). Os ácidos hidroxicinâmicos foram abundantes, com presença majoritária do ácido *p*-coumárico em toda a parede celular, enquanto o ácido ferúlico está preferencialmente ligado aos carboidratos, sendo a proporção *p*-coumarato/ferulato de 12. A cadeia lateral de lignina está 42% acilada na posição γ -OH, majoritariamente com *p*-coumaratos, e em menor proporção com acetatos. A lignina está composta por 83% de estruturas do tipo alquil-aril-éteres com ligações β -O-4' (80% representado pelas estruturas A e B, e 3% de pela estrutura C, figura 4). Também foram encontradas estruturas do tipo fenil-coumaratos com ligações β -5' (Figura 4D), correspondentes ao 6% do total medido. As estruturas E, F, G e H representadas na figura 4, corresponderam a 2%, 4%, 2% e 3% da molécula de lignina do bagaço, respectivamente.

Na parede celular dos materiais lignocelulósicos a hemicelulose e celulose estão embebidos na matriz de lignina, formando um material heterogêneo. Os teores destes componentes podem variar entre espécies vegetais, e também pelas condições de crescimento e plantio. As características destes polímeros permitem que interajam físico-quimicamente, constituindo uma defesa contra o ataque microbiano e animal (HIMMEL et al., 2007).

A parede celular vegetal está construída em uma série de camadas: a lamela média, a parede primária e a parede secundária (Figura 5). A lamela média é altamente lignificada e serve de união entre as células. A parede celular primária é formada por uma rede irregular de microfibrilas de celulose combinada com hemicelulose, pectinas e proteínas (Figura 5B). A parede celular primária é sustentada em uma grossa parede celular secundária, composta por três diferentes camadas, das quais a camada do meio (S2) constitui a maior porção. Esta camada tem microfibrilas de celulose altamente organizadas com uma orientação quase perpendicular umas às outras em camadas adjacentes (Figura 5C). A lamela média tem maior concentração de lignina, mas a quantidade de lignina em S2 é maior devido a sua espessura.

Figuras 5: Modelo simplificado da estrutura de uma parede celular de plantas. (A) Lâmina média; Parede primária e a parede secundária (camadas S1, S2, S3). Os principais constituintes são ilustrados para a parede primária (B) e parede secundária (C).

Fonte: Modificado de RYTIOJA et al., (2014) e MARRIOT, GÓMEZ e MCQUEEN-MASON (2015).

Dentro da parede celular dos materiais lignocelulósicos, as hemiceluloses se encontram entre as microfibrilas de celulose, e interagem entre si por ligações de hidrogênio, podendo interagir também com a lignina por ligações covalentes (SUN et al., 2000; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; JAYAPAL et al., 2013, CARPITA; RALPH; MCCANN, 2015). A interação da hemicelulose com a celulose impede que as moléculas de celulose de fibras paralelas e adjacentes se colapsem, mas também permitem a interação fraca entre uma fibra e outra, formando uma rede (FENGEL; WEGENER, 1989; BUSSE-WICHER et al., 2016a). A hemicelulose por sua vez interage com a lignina através dos ácidos hidroxinâmicos, os quais estão esterificados na arabinose da hemicelulose e esterificados à molécula de lignina (Figura 6). Especificamente o ácido ferúlico está esterificado na posição *O*-5 de alguns resíduos de arabinofuranosil, podendo também formar dímeros que ligam duas cadeias de hemicelulose (MARRIOT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2015). Os ésteres do

ácido *p*-cumárico são abundantes na parede celular de gramíneas, mas não é claro se estão associados diretamente a xilana, estando associados principalmente à lignina (HATFIELD; MARITA; FROST, 2008; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; CARPITA; RALPH; MCCANN, 2015). A associação entre lignina e carboidrato é conhecida como complexo lignina-carboidrato (LCC)

Figuras 6: Tipos de interação entre a molécula de lignina e os polissacarídeos. a: Éster de hidroxycinamato. b: Éter de hidroxycinamato. c: Ponte éster-éter de ferulato. d: Ponte éster dihidroferulato. e: Ponte éster-éter dihidroferulato.

Fonte: Adaptado de Carpita; Ralph; McCann (2015).

Em relação à parede primária, PAULY et al. (1999) ampliaram o modelo de organização macromolecular da hemicelulose na matriz lignocelulósica. No seu estudo usaram folhas de ervilha para descrever um modelo de interação entre a celulose e a xiloglucana, baseados na observação de diferentes frações extraíveis (solubilizáveis) de xiloglucanas estruturalmente diferentes. Nos experimentos de extração com xilanases observaram 8% de solubilização de xiloglucanas em relação à massa inicial. Quando foi usado um tratamento alcalino (KOH 24%) conseguiram solubilizar quase um terço do material (33,8%) que continha 10,3% de xiloglucanas em relação à massa inicial. Finalmente

realizaram um tratamento com celulases, solubilizando 27% do material, que continha 3,9% de xiloglucanas em relação a massa inicial.

Estes resultados sugerem que existe um domínio molecular de xiloglucanas que interliga as microfibrilas de celulose ou que apresenta *loops* que são hidrolisáveis por xiloglucanases. Outro domínio molecular estaria muito próximo e interagindo com as microfibrilas (ligações não covalentes). Por último, existiria um terceiro domínio molecular confinado dentro ou entre as microfibrilas de celulose, não sendo acessível tanto para as xiloglucanases, quanto pelo tratamento alcalino. Este domínio só poderia ser liberado por tratamento com celulases (PAULY et al., 1999). Gourlay et al. (2013) acharam também evidências experimentais para este arranjo. Ao hidrolisar palha de milho pré-tratada por explosão vapor com xilanases e *swolleninas* (proteínas que podem desestruturar o arranjo molecular da celulose), os autores observaram um aumento de 300% na produção de xilose na forma de xilo-oligômeros. Este resultado foi atribuído à maior acessibilidade das xilanases tanto nas hemiceluloses que recobrem as microfibrilas, como nas que se localizam entre ou dentro das microfibrilas.

Em relação à parede secundária, não está claro como é a sua arquitetura, mas sim que a celulose e hemicelulose interagem, sendo aceito que a face hidrofóbica da celulose interage com parte da hemicelulose, embora ainda não esteja esclarecido como ocorre a interação (BUSSE-WICHER et al., 2016b). Estas interações têm chamado a atenção dos pesquisadores, devido a que a celulose é sintetizada por proteínas localizadas na membrana plasmática conhecidas como complexo celulose sintase. Este complexo é formado por um hexâmero de proteínas, chamados de “rosetas”, que secretam a celulose através da membrana plasmática. O processo é altamente regulado e complexo, e não será detalhado neste trabalho, mas é abordado em profundidade por McFarlane; Döring; Persson (2014). Por sua vez, a hemicelulose é sintetizada e substituída intracelularmente no complexo de golgi, viajando em vesículas secretoras, e excretada através da membrana plasmática. O Processo de deposição na parede secundária não é completamente conhecido (BUSSE-WICHER et al., 2014; 2016a).

Nos últimos anos, foram feitos alguns estudos da interação da xilana com a fase hidrofílica da celulose, usando modelagem dinâmica e, comprovados por NMR em estado sólido (BUSSE-WICHER et al., 2014; 2016a; SIMMONS et al., 2016). Os resultados mostraram que o padrão de substituição da hemicelulose é extraordinariamente preciso (PEREIRA et al., 2017). Por exemplo, em coníferas, a substituição com ácido metil-

glucurônico (AcMeGlu) ocorre a cada 6 resíduos de xilose, e a substituição com arabinose (Ara) ocorre dois resíduos depois da substituição com AcMeGlu (BUSSE-WICHER et al., 2014; 2016a). A substituição das xilanas de *arabidopsis thaliana* é similar, porém ao invés de arabinose é substituída com acetil em aproximadamente metade da molécula, a cada segundo resíduo de xilose da cadeia principal (BUSSE-WICHER et al., 2014). A substituição com espaçamentos regulares permite a hemicelulose formar uma estrutura helicoidal binária (de forma análoga a celulose), com os monômeros da cadeia principal rotando alternadamente 180° . Esta conformação permite expor uma face plana de um lado pronta para interagir com a face hidrofílica da celulose, e do outro ficam os grupos pendentes, os quais podem interagir com os outros componentes da parede celular. Entretanto, a hemicelulose em solução ou que não interage com a celulose, forma uma estrutura helicoidal ternária (3 faces), com os monômeros rotando a cada 120° no plano (Figura 7) (BUSSE-WICHER et al., 2014; 2016a; SIMMONS et al., 2016).

Figuras 7: Modelo de conformação estrutural da xilana na parede secundária de dicotiledôneas.

Fonte: Adaptado de Busse-Wiche et al., (2016a)

Os estudos de modelagem dinâmica indicam que o padrão de substituição é fundamental para a interação xilana-celulose, mas não o tipo de substituinte, sendo isto sustentado pelas observações dos diferentes tipos de substituintes na hemicelulose nas espécies vegetais, porém mantendo a regularidade da substituição (BUSSE-WICHE et al., 2014; 2016a; SIMMONS et al., 2016). Assim, são descritos diferentes domínios de interação da xilana com a celulose, segundo sua compatibilidade (Figura 8).

Figura 8: Modelo hipotético de interação entre a celulose e a xilana em parede secundária de dicotiledôneas. Interação da xilana com a face hidrofóbica da celulose (A), e do domínio substituído compatível de interagir com a região hidrofílica (B), os domínios incompatíveis podem ligar às microfibrilas de celulose adjacentes (C) ou formar *loops* que se desligam da microfibrila e se estendem para a matriz e voltam para se associar a mesma ou outra microfibrila (D), ou ligar dois domínios compatíveis de interagir com a face hidrofílica (E).

Fonte: Adaptado de Busse-Wiche et al., (2016a)

Segundo os estudos de modelagem dinâmica, ambos os domínios (compatível e incompatível), poderiam interagir com a face hidrofóbica da molécula de celulose, enquanto o domínio compatível pode se associar fortemente com a face hidrofílica. O recobrimento da face hidrofílica com a xilana permite a face hidrofóbica das microfibrilas interagir com a lignina e/ou impedir a agregação de fibrilas de celulose adjacentes. O domínio incompatível pode formar *loops* que se dissociam da microfibrila, internalizando na matriz lignocelulósica, voltando para se associar com a mesma ou com outra microfibrila. O domínio incompatível também pode fazer uma ponte, amarrando dois domínios compatíveis; entrecruzando microfibrilas separadas e estabilizando a matriz extracelular. Estas interações mantêm a arquitetura da parede celular (BUSSE-WICHE et al., 2016).

2.3 Pré-tratamentos

A celulose, a hemicelulose e a lignina se encontram intimamente associadas, e por isso os carboidratos não são de fácil acesso às enzimas hidrolíticas, sendo denominado este fenômeno como “recalcitrância” (ZHANG et al., 2011, BUSSE-WICHE et al., 2014; 2016a, SIMMONS et al., 2016). Este fato é um dos principais problemas para o aproveitamento de cada um dos componentes da parede celular, no entanto a literatura científica relata diversas técnicas, conhecidas como pré-tratamentos, para melhorar a acessibilidade a esta rede complexa (ALVIRA; et al., 2010; BRODEUR et al., 2011; CHIARAMONTI et al., 2012; KIM; LEE; KIM, 2016; KARIMI e TAHERZADEHC, 2015).

Os processos de pré-tratamento da biomassa podem ser do tipo químico, físico ou biológico, ou uma combinação destes, e têm como objetivo remover e/ou modificar os limitantes estruturais e composicionais da biomassa lignocelulósica (KIM; LEE; KIM, 2016; KARIMI e TAHERZADEHC, 2015).

Idealmente um pré-tratamento deveria separar cada um dos componentes dos materiais lignocelulósicos, produzindo o mínimo de produtos indesejados, poucos resíduos e principalmente ser viável economicamente (KIM; LEE; KIM, 2016). É importante precisar que as tecnologias de pré-tratamento podem estar enfocadas em aplicações industriais, mas também poderiam ser utilizadas para melhorar a digestibilidade animal dos materiais lignocelulósicos. Na tabela 1 estão descritas algumas características das principais tecnologias de pré-tratamentos.

Tabela 1: Principais pré-tratamentos utilizados para aumentar a acessibilidade aos carboidratos.

Método de pré-tratamento	Maior efeito	Químicos usados	Formação de subprodutos
Ácido	Hidrólise da hemicelulose até monossacarídeos	Catálises com agentes como H_2SO_4 , SO_2 , HCl , H_3PO_4	Ácidos carboxílicos, compostos fenólicos como furanos, etc.
Processos hidrotérmicos	Solubilização da hemicelulose sem hidrolisa-la completamente	Sem aditivos	Ácido acético, e pequenas quantidades de furanos e aldeídos
Métodos alcalinos não severos	Remoção da lignina e pequena parte das hemiceluloses	Álcali, como NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_3	Ácido acético, ácidos carboxílicos, compostos fenólicos
Métodos oxidativos	Remoção da lignina e parte das hemiceluloses	Agentes oxidantes, como H_2O_2 e O_2 (em condições alcalinas), e O_3	Ácidos fenólicos, ácido acético
Processos de polpação química	Métodos que tem como objetivo remover a lignina e um pouco das hemiceluloses	Polpação Kraft ($\text{Na}_2\text{S}/\text{OH}$), polpação sulfito ($\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ ou $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), polpação com soda (NaOH), polpação organosolv.	Ácidos alifáticos
Solventes alternativos	Dissolução de componentes específicos da biomassa lignocelulósica	Líquidos iônicos	Depende do solventes e condições empregadas
Biológico	Remoção de lignina	Microrganismos ou catalisadores enzimáticos, como lacases e peroxidases	Gera subprodutos em baixa concentração

Fonte: Adaptado de Jönsson e Martín (2016).

De forma geral, os pré-tratamentos que utilizam condições mais drásticas promovem um maior acesso às frações polissacarídicas, porém geram produtos indesejados, requerem mais energia e tecnologias que suportem as condições de pré-tratamento. Por outro lado, pré-tratamentos em condições mais brandas em geral necessitam de um maior tempo de reação. Os pré-tratamentos ácidos ou hidrotérmicos degradam a hemicelulose enquanto os pré-

tratamentos alcalinos realizados em condições brandas de reação, preservam hemiceluloses em sua forma polimérica, ampliando as possibilidades de seu aproveitamento (KARIMI e TAHERZADEHC, 2015, KIM; LEE; KIM, 2016).

2.3.1 Pré-tratamentos mais seletivos para a remoção de lignina

A presença da lignina tem sido indicada como a principal barreira para acessar os carboidratos (HIMELL et al., 2007; KARIMI e TAHERZADEHC, 2015). Portanto há interesse nos pré-tratamentos capazes de remover seletivamente a lignina, mantendo quase inalterados os polissacarídeos da parede celular. Alguns pré-tratamentos, como organosolv e com líquido iônico possuem essa característica (LEE et al., 2009; TIAN et al., 2017). A remoção da lignina pode ser feita por métodos oxidativos, como é o caso do tratamento com clorito de sódio na presença de ácido acético diluído (BROWNING, 1967; AHLGREN; GORING, 1971) e também pela reação de sulfonação da lignina em meio alcalino (GELLERSTEDT, 2009).

2.3.1.1 Pré-tratamento clorito em meio ácido

Esse tratamento é utilizado para obtenção de holocelulose e alcança bons resultados de remoção seletiva de lignina, quando até 60% desse componente é removido (SIQUEIRA et al., 2011). A partir desse valor de remoção da lignina, os carboidratos da parede celular começam a ser degradados, pois o grau de polimerização da celulose após o tratamento é reduzido, provavelmente devido à hidrólise ácida ou clivagem oxidativa da cadeia celulósica (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010). O tratamento com clorito pode remover arabinose e degradar unidades de ácido ferúlico e *p*-cumárico (FORD, 1986; SIQUEIRA et al., 2011). A reação consiste na formação de ácido cloroso, que se decompõem em dióxido de cloro como produto principal e íons cloreto e clorato como produtos secundários. As reações que ocorrem não são claramente definidas e os produtos dependem da temperatura, pH e outros fatores (BROWNING, 1967). Devido a que este pré-tratamento produz resíduos clorados sua aplicação industrial não é viável.

2.3.1.2 Pré-tratamento quimio-termomecânico

O pre-tratamento quimio-termomecânico combina o efeito de íons sulfito com o uso de um refinador de discos para enfraquecer e desintegrar os feixes de fibras dos materiais lignocelulósicos. Os íons sulfito promovem a quebra das ligações beta-O-aryl e solubiliza parte da lignina. O conteúdo de espécies sulfúricas no processo sulfito está representado por íons dióxido de enxofre (SO_2^-), íons hidrogenosulfito ou bissulfito (HSO_3^-) e íons sulfito (SO_3^{2-}). As proporções destas espécies dependem do pH do licor de cozimento (ALÉN, 2000). Em pH neutro e alcalino, há maior predominância de íons SO_3^{2-} (GELLERSTEDT, 2009). Em meio básico as principais reações com a lignina ocorrem inicialmente devido à desprotonação do grupo OH fenólico, cuja estrutura está disponível em pequenas quantidades na macromolécula de lignina. A desprotonação do OH fenólico resulta na formação de metileno quinona, pela clivagem da ligação do carbono alfa da lignina. O carbono alfa e posteriormente o carbono beta são atacados nucleofilicamente pelo grupo sulfito (FENGEL; WEGENER, 1989; GELLERSTEDT, 2009). Com a quebra das estruturas aril-éter, observa-se a fragmentação e sulfonação da macromolécula de lignina em compostos solúveis no meio reacional (Figura 9). A quebra da molécula de lignina gera mais estruturas OH fenólicas, facilitando a propagação da reação.

Figura 9: Reação de sulfonação da lignina em meio alcalino. Desprotonação da hidroxila fenólica e a formação da metileno quinona (I) e ataque nucleofílico do íon sulfito ao carbono α e β (II), sulfonando e quebrando a molécula de lignina (III).

Fonte: Adaptado de Gellerstedt (2009).

Em meio alcalino os grupos ésteres são saponificados, o que também promove a quebra de estruturas na lignina e hemicelulose, facilitando sua solubilização parcial (CHUNDAWAT et. al., 2011)

O pré-tratamento químio-termomecânico do bagaço de cana-de-açúcar tem sido estudado detalhadamente no nosso grupo de pesquisa. Mendes et al. (2011; 2013) mostraram que é possível remover cerca de 50% da lignina do bagaço na presença de 10% (m/m) de sulfito de sódio e 5% (m/m) de hidróxido de sódio. Nesta reação, 70% das hemiceluloses do bagaço foram preservadas e o conteúdo de celulose manteve-se praticamente inalterado. Laurito-Friend et al. (2015), obtiveram resultados similares utilizando híbridos de cana-de-açúcar com composições diferentes. Neste estudo foi demonstrado que o tempo de reação e a concentração de reagentes podem ser ajustados dependendo da concentração inicial de lignina do bagaço, assim o pré-tratamento dos bagaços com menos lignina foi mais econômico. Siqueira et al. (2017) mostraram que neste pré-tratamento a lignina residual se torna mais hidrofílica, devido a incorporação de íons sulfito, promovendo o inchamento das fibras e aumentando a porosidade da parede celular. Estas propriedades também foram descritas para outros materiais lignocelulósicos (ZHU et al., 2009; ZHANG et al., 2013; YANG, PAN, 2012; LI et al., 2014). As modificações na composição química do bagaço acarretadas pelo pré-tratamento QTM refletiram em valores de sacarificação enzimática acima de 80% e 70% para a celulose e hemicelulose, respectivamente (MENDES et al., 2011; 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2015); inclusive usando baixas quantidades de enzima (SIQUEIRA et al., 2017).

2.4 Aproveitamento da hemicelulose

Pensando no uso integral dos materiais lignocelulósicos, a presença de uma grande quantidade de hemiceluloses residuais depois do pré-tratamento QTM com sulfito alcalino, requer seu aproveitamento. Além disso, se não forem removidas, as hemiceluloses podem ser uma barreira física à celulose sendo isto uma desvantagem se o foco é só a utilização da celulose. Isto é evidenciado em trabalhos nos quais a remoção da hemicelulose antes da sacarificação da celulose, ou a adição de hemicelulases nos coquetéis enzimáticos para sacarificar a celulose em substratos nos quais os pré-tratamentos preservaram a fração hemicelulósica, melhorou a sacarificação da celulose, ou permitiu uma diminuição da quantidade de enzimas para sua hidrólise efetiva (KUMAR, WYMAN 2009; SELIG et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). Ambos polissacarídeos podem ser hidrolisados utilizando

uma composição adequada de enzimas. Porém, a fermentação da mistura de hexoses e pentoses não é feita com a mesma eficiência pelos microrganismos utilizados industrialmente, levando a perda de açúcares. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o microrganismo mais utilizado na fermentação de açúcares para produzir etanol, possui uma baixa capacidade de utilização de pentoses. Por outro lado, a transformação genética de microrganismos para a fermentação simultânea de pentoses e hexoses, apresenta o desafio da estabilidade genética através do tempo, assim como a produção de grandes quantidades de inóculo para a fermentação. Considerando que os materiais lignocelulósicos são heterogêneos, a recuperação dos microrganismos no processo de sacarificação e fermentação simultânea, visando a sua reutilização ou aproveitamento, também apresenta um desafio tecnológico. (PAULOVA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016; JUNQUEIRA; CAVALETT; BONOMIL, 2016). Considerando estes fatores, as hemiceluloses residuais dos materiais pré-tratados QTM com sulfito alcalino, deveriam ser extraídas para serem melhor aproveitadas.

Para extrair as hemiceluloses são reportados métodos físico-químicos, enzimáticos, ou uma combinação deles. Os métodos físico-químicos são os mais utilizados e geralmente são empregadas soluções alcalinas, resultando em rendimentos de extração de hemiceluloses poliméricas, devido à capacidade do álcali de quebrar as diferentes ligações (éster, éter e hidrogênio) com os quais interage a hemicelulose com outros componentes da matriz lignocelulósica. Porém, junto com a hemicelulose são extraídos produtos indesejados, como a lignina (PENG et al., 2012). A composição de carboidratos da xilana extraída de bagaço de cana-de-açúcar em meio alcalino, reforçado com peróxido de hidrogênio, revelou 80% de xilose, 3,8% de arabinose, 4,2% de glicose e 3,2% de ácido urônico; existindo a cada 10 xiloses na cadeia principal um ácido urônico ou uma arabinose (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Bian et al. (2012), isolaram hemicelulose desde bagaço deslignificado com clorito ácido, usando 10% de KOH, relação sólido:líquido de 1:20 e tempo de extração de 10h, variando a temperatura de 21°-50°C, com incrementos de 5°C entre cada tratamento. As xilanas foram recuperadas por precipitação com etanol em meio ácido (pH=5,8). Os rendimentos de extração flutuaram entre 41,4% a 42,7%, e xilana recuperada correspondeu a 4-*O*-metilglucurono-arabinoxilana (GAX), com a cadeia principal composta por 1,4-*D*-xilopirranose, substituída na posição O-2 e O-3 com arabinosil ou com ácido 4-*O*-metilglucurônico na posição O-2. A composição de açúcares foi de 83,1%-84,6% de xilose, 11,0-12,1% de arabinose, 2,1%-3,1% de glicose e 2,4%-2,6% de ácido urônico. Análises

feitas por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnético-nuclear mostraram que a temperatura não afetou a estrutura macromolecular da GAX do bagaço. No entanto, a fração de maior massa molar ($93,300 \text{ g mol}^{-1}$) foi obtida com o tratamento a 35°C . Como desvantagem, a extração alcalina remove o substituinte acetil, limitando a solubilidade da hemicelulose, dificultando suas aplicações, devido a que a molécula pode interagir com ela mesma, diminuindo as camadas de solvatação (PENG et al., 2012).

As hemiceluloses hidrolisadas em condições ácidas brandas produzem xilooligossacarídeos (Xos), que podem ser utilizados como pré-bióticos (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; BROEKAERT et al., 2011; KUMAR et al., 2012; CHANG et al., 2017). Entretanto, estes compostos devem ser completamente removidos da reação se o destino da celulose for a hidrólise enzimática, pois os Xos são potentes inibidores de celulasas (QING e WYMAN, 2010; BAUMANN et al. 2011; ZHANG et al., 2012). Em condições de pré-tratamento ácido mais severo, a hemicelulose é convertida a monômeros, porém ocorre a formação de produtos de degradação, que também agem como inibidores enzimáticos e do crescimento microbiano (PENG et al., 2012)

A via biológica envolve o uso de enzimas, sendo desejados complexos enzimáticos com baixa atividade de β -xilosidase, a fim de evitar a produção de xilose (Vázquez et al., 2000). A alta especificidade das enzimas permite extrair xilanas puras, e mantém inalterada a estrutura da celulose. Pensando em aplicações da celulose diferentes de sua sacarificação, como produção de nano-celulose, isto é uma vantagem em relação a extração por métodos químico, os quais diminuem o grau de polimerização da celulose (PENG et al., 2012). Para extrair enzimaticamente xilanas são usadas endo-xilanases (AACHARY e PRAPULLA, 2009; VAN DYK e PLETSCHE, 2012). O mecanismo pelo qual estas enzimas conseguem extrair as hemiceluloses, corresponde a clivagem da cadeia principal enfraquecendo a interação hemicelulose-hemicelulose e hemicelulose-matriz lignocelulósica, facilitando a sua solubilização no meio reacional. No entanto, este mecanismo envolve a diminuição do grau de polimerização, o que pode limitar as aplicações da hemicelulose extraída (MOREIRA e FILHO, 2016).

Como relatado anteriormente, estudos de modelagem molecular dinâmica e de ressonância nuclear magnética, revelaram que o padrão de substituição da xilana é importante para a sua interação de forma estável com a celulose, mantendo a arquitetura da parede celular. A substituição também é indicada como o responsável por limitar a hidrólise por parte de enzimas, já que representam um impedimento estérico ao ataque enzimático

(BIELY et al., 2012). Nesse sentido, é desejado que o pré-tratamento modifique a hemicelulose de forma a facilitar a extração. Tem sido reportado que um pré-tratamento sulfito alcalino consegue saponificar o substituinte acetil do bagaço de cana de açúcar, e manter o substituinte arabinosil (MENDES et al., 2011; MESQUITA, AGUIAR; FERRAZ, 2015). Varnai et al. (2014) utilizaram três feruloil esterase e uma acetil xilano esterase, observando que a enzima acetil xilano esterase foi mais efetiva em melhorar a hidrólise da celulose e hemicelulose. Este efeito foi atribuído à remoção de grupos acetil, o que melhora o acesso a cadeia principal de hemicelulose às hemicelulases, consequentemente expondo a celulose às celulasas. Por outro lado, é indicado que a substituição da hemicelulose com arabinosil, melhora a hidrólise da celulose (KÖHNKE et al., 2011; LI et al., 2013, 2015; SELIG et al. 2015; COSTA et al., 2016).

Estas informações parecem contraditórias, já que por um lado se afirma que as substituições estabilizam a interação xilana-celulose, e por outro que a substituição com arabinose diminui a interação hemicelulose-celulose. Isto se explica, porque os experimentos de interação por modelagem dinâmica foram feitos simulando uma parede celular “*in natura*”, enquanto os experimentos que mostram o efeito positivo da substituição com arabinose na sacarificação da celulose, foram feitos em substratos modelos utilizando hemiceluloses com baixo grau de polimerização, e/ou em presença de coquetéis enzimáticos. Assim, as informações são complementares. Na parede “*in natura*” os substituintes mantem a conformação da hemicelulose que permite sua interação com a celulose. Nos experimentos feitos com xilanas pouco substituídas, ou nos experimentos de hidrólises enzimática, a conformação da hemicelulose se modifica fazendo que os substituintes diminuam a interação com a celulose. Além disso, tem que ser levado em consideração o equilíbrio de fases, já que a adsorção xilana-celulose segue a isoterma de Langmuir.

As evidencias apresentadas sugerem que as modificações na GAX e no bagaço, acarretadas pelo pré-tratamento QTM com sulfito alcalino, são compatíveis com a extração enzimática da GAX com endo-xilanases.

Após extração, as xilanas podem ser recuperados por diferentes processos, como evaporação, extração com solventes, precipitação com etanol, separação com membranas ou métodos cromatográficos (BRIENZO, 2010; BIAN et al., 2012; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012). Neste sentido é reportada uma boa eficiência na separação dos oligômeros usando métodos cromatográficos, por exemplo, por permeação em gel usando grandes colunas empacotadas com Bio Gel P-2 em temperatura de 26°C usando água como eluente

(AACHARY; PRAPULLA, 2009). Os oligômeros ácidos podem ser separados por cromatografia de troca iônica em DEAE-cellulose e DEAE-sepharose (YANG, C.-H., YANG, S.-F., LIU, 2007). Porém, os métodos cromatográficos compreendem o uso de equipamentos especializados. A precipitação com etanol se apresenta como uma boa alternativa, devido a que precipita grande parte de xilanas em etanol, propiciando a recuperação de xilanas de elevada pureza, considerando que a lignina não precipita em etanol.

2.4.1 Aplicações da hemicelulose

O uso e aplicação da hemicelulose pode ser na forma polimérica ou como xilo-oligômeros (XOs) e abrange muitas áreas. A crescente demanda por alimentos funcionais e o potencial para desenvolvimento de produtos abrem um mercado promissor na indústria de alimentos, aplicações farmacêuticas e na agricultura e na indústria de papel como aditivos (KUMAR; PUSHPA; PRABHA; 2012; LAINE et al., 2013). Na indústria dos alimentos são usados em sucos de frutas, café, achocolatados, chá, soda, bebidas saudáveis e bebidas alcoólicas e derivados do leite, por exemplo, sorvetes e produtos fermentados. Tais oligômeros também são usados como ingredientes em alimentos funcionais, cosméticos, comidas para peixes e para animais de estimação. Na agricultura tem aplicação como agente de amadurecimento e como aceleradores e estimuladores do crescimento de plantas (KUMAR; PUSHPA; PRABHA; 2012, ALONSO et al., 2001). Em aplicações farmacêuticas é reportado que os oligômeros de xilose possuem atividade imunomoduladora, anticancerígena, antimicrobiana, e capacidade de regular o crescimento. Também são reportadas outras atividades biológicas como antialérgica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica (KUMAR; PUSHPA; PRABHA; 2012). Inclusive são usados na preparação de micro e nano partículas para liberação de drogas e no tratamento e prevenção de distúrbios gastrointestinais, já que têm mostrado seletividade na proliferação de bifidobactérias (NAKAKUKI, 2002). Além dessas vantagens, essas substâncias não apresentam toxicidade ou exibem efeitos negativos em humanos, portanto seu uso é permitido em crianças e mulheres grávidas (KUMAR; PUSHPA; PRABHA; 2012).

Na indústria do papel a literatura mostra modificações químicas dos XOs, por exemplo para usar como revestimento para embalagens (LAINE et al., 2013), ou na

fabricação de películas e hidrogel a partir de xilo-oligossacarídeos (PENG; SHE, 2014). Sua adição em polpas de celulose também tem sido estudada, devido a que melhora suas propriedades mecânicas (EBRINGEROVÁ, 2006). Experimentos realizados por Kabel et al. (2007), utilizando celulose bacteriana, xilana linear de trigo e xilana acetilada de eucalipto, mostraram que xilanas menos substituídas interagem melhor com a celulose, dependendo também do tamanho, sendo necessários 15 resíduos de xilana não substituídos para interagir com a celulose bacteriana. Hu et al. (2016) isolaram hemiceluloses de eucalipto deslignificado usando 10% de NaOH, uma relação sólido:líquido de 1:20, temperatura de 30°C por 10h. Posteriormente precipitaram as xilanas em etanol, e adsorveram-nas em polpas kraft de eucalipto e pinus. Os resultados mostraram que a xilana isolada foi adsorvida cerca de 13% mais na polpa de pinus. O índice de resistência a tração aumentou nas duas polpas, porém o índice de resistência a rasgo não foi afetado.

2.4.1 Aplicações da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar

Nos últimos anos foram publicados vários estudos de utilização do bagaço de cana-de-açúcar para produzir xilo-oligossacarídeos (XOs). Brienzo et al. (2010) isolaram xilanas de bagaço com uma solução a 6% de peróxido de hidrogênio em um pH de 11,6, para posteriormente hidrolisá-la com um extrato bruto de enzimas do fungo *Thermoascus aurantiacus*. Foi obtida uma conversão máxima de 37,1% quando se usou uma carga enzimática de 60 U/g de bagaço, 50°C e uma concentração de substrato de 2,6% (massa/volume). OTIENO e AHRING (2012b) obtiveram um rendimento de 92,2% com um tratamento termo-ácido do bagaço de cana, usando 0,1% de H₂SO₄, uma consistência de 10% (massa/volume) e uma temperatura de 145°C por uma hora. Os XOs encontrados apresentaram grau de polimerização entre 2-20, porém o 92% correspondeu a xilobiase. JAYAPAL et al. (2013) reportaram uma recuperação de 85% da xilana do bagaço usando 12% de hidróxido sódio a temperatura ambiente e aplicando vapor, com uma relação sólido:líquido 1:10. Na sequência foi feita a hidrólise da xilana a 40°C, numa consistência de 2%, pH 4, com xilanase comercial de *T. viridae*. Foi utilizada uma carga enzimática de 2,65 U/g de bagaço por 8 horas, obtendo XOs com grau de polimerização (DP) de 2 a 3. BIAN et al., (2013) prepararam uma fração rica em xilana usando 10% de KOH a 25°C por 8 horas, a partir de bagaço deslignificado com clorito ácido por 2 horas. Esta fração foi hidrolisada com um extrato enzimático bruto de *Pichia stipitis* por 12 horas, produzindo

31,8% de XOs. A maior parte dos XOs (95,3%) estava na faixa de 2 a 4 e uma pequena fração (4,7%) com DP entre 5 e 6.

2.5 Hemicelulases e Celulases

2.5.1 Hemicelulases

Devido à natureza heterogênea da hemicelulose, diferentes enzimas são requeridas para a sua modificação e degradação (Figura 10). As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em dois grupos, as que são capazes de degradar a cadeia principal e as que clivam as ligações que unem os grupos pendentes à cadeia principal (KUHAD, 1997).

Figura 10: Representação da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas atuam.

Fonte: Shallom; Shoham, 2003.

As hemicelulases que atuam na cadeia principal das hemiceluloses podem ser xilanases, xiloglucanases ou mananases. As endo-β-D-xilanases (EC 3.2.1.8) agem na cadeia principal da xilana a partir de terminais não redutores, gerando xilo-oligossacarídeos menores substituídos ou não substituídos que podem eventualmente ser clivados por uma

exo-1-4- β -xilanase. As β -xilosidases são específicas para a hidrólise de xilobiose e algumas podem hidrolisar oligossacarídeos de pequeno tamanho (BIELY et al., 1985; 2012).

A clivagem enzimática dos grupos pendentes das hemiceluloses é realizada por arabinofuranosidas, feruloil esterases, acetil xilana esterases, galactosidas e glucuronidas (EBRIGEROVÁ, 2006). As feruloil esterases clivam as pontes ferúlicas e/ou diferúlicas entre as cadeias de xilana e a lignina e a enzima acetil esterase cliva resíduos acetil presentes na xilana. Como se observa na figura 10, os resíduos laterais de 4-O-metil-D-glucuronosil ou D-glucuronosil presentes na xilana são clivados por α -glucuronidas (DEVRIES et al., 1998; KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989).

Baseados na similaridade da sequência de aminoácidos, xilanases tem sido classificadas em diferentes famílias (GH5, GH8, GH9, GH10, GH11, GH12, GH16, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51 e GH62 (<http://www.cazy.org/>)). A maioria das endoxilanases produzidas por fungos e bactérias pertence a duas grandes famílias: à família 10 e família 11 de glicosídeo hidrolases. Xilanases destas duas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas (massa molar, ponto isoelétrico) e estrutura tridimensional, assim como em seu modo de ação sobre os polissacarídeos e xilo-oligossacarídeos (ZHANG et al., 2011) (Figura 11).

Figura 11: Esquema da hidrólise enzimática de uma glucurono-xilana com xilanases da família 10 e 11.

Fonte: Biely; Sing; Puchart, 2016.

As xilanases classificadas na família GH10 possuem uma massa molar maior que as xilanases da família GH11. Em geral suas massas são maiores que 30 kDa e tem pontos isoelétricos ácidos. Apresentam folhas β pregadas e barris α na sua estrutura tridimensional e um sítio ativo menor quando comparado com as GH11 (WALIA et al., 2017). As xilanases da família GH10 são capazes de clivar cadeias principais adjacente à xilose ramificada, porém, requerem duas unidades não substituídas. Seu principal produto de hidrólise é xilobiose e xilotriose substituída na extremidade não redutora (VARDAKOU et al., 2004; KOLENOVÁ; VRSANSKÁ; BIELY, 2006). Deste modo a família 10 de xilanases geralmente não requer remoção dos substituintes para agir, mas gera oligômeros menores. Tem sido descrito, que algumas GH10 hidrolisam xilana e celulose, embora a atividade em xilana seja o dobro (KOLENOVÁ; VRSANSKÁ; BIELY, 2006).

A família GH11 é composta por endo-xilanases com massa molar menor que 30 kDa. Possuem pontos isoelétricos altos (básicos). Sua estrutura tridimensional está composta por duas folhas beta pregadas e uma α -hélice, sendo definida sua estrutura como similar a uma “mão direita” parcialmente fechada (TORRONEN; ROUVINEN, 1997, WALIA et al., 2017). Para que as xilanases GH11 consigam clivar uma arabinoxilana, requerem pelo menos três resíduos de xilose não substituídos para agir. Como regra, todos os oligossacarídeos ramificados gerados por esta xilanase contém dois resíduos de xilose não substituídos no terminal redutor (KORMELINK et al., 1993b; WAN et al., 2014). Quando uma arabinoxilana é clivada, os menores produtos correspondem a uma xilotetraose substituída por uma ou duas arabinoses na penúltima xilose a partir do terminal redutor (KORMELINK et al., 1993a, 1993b; PUCHART; BIELY, 2008). A família GH11 apresenta uma alta capacidade catalítica e seletividade, sendo consideradas como “xilanases verdadeiras”, já que sua atividade é observada só em substratos que contém D-xilose. Além disso, possuem amplas faixas de pHs e temperaturas ótimas de atuação, o que somado a seu pequeno tamanho, fazem possível muitas aplicações destas endo-xilanases, especialmente na indústria de celulose e papel (WALIA et al., 2017)

O comportamento e a interação das xilanases sobre substratos complexos, onde a xilana interage com a lignina e celulose, ainda requer pesquisa mais aprofundada (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012; MOREIRA, FILHO 2016), sendo claro que muitas interações acontecem entre enzimas em substratos complexos. As xilanases GH10 e GH11 agem em sinergia e a presença simultânea das duas famílias melhora o rendimento de hidrólise da xilana (BANERJEE et al., 2010a; GAO et al., 2011).

2.5.2 Celulases

As celulases constituem um complexo sistema de três grupos de enzimas que agem em sinergia para hidrolisar a celulose (KESHWANI; CHENG, 2009). Os três tipos principais de enzimas que fazem parte do complexo celulolítico são as endo-1,4- β -glucanases, as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases e as 1,4- β -glicosidases (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988). As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização, criando novas extremidades de cadeia. Algumas poucas endo-glucanases são classificadas como processivas, por gerar celobiose como principal produto de hidrólise da celulose (COHEN et al., 2005). Celobiohidrolases agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligarem aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicoses das extremidades não redutoras (GH6 cel 6A) e redutoras (GH7 cel 7A). A descoberta de mono-oxigenases líticas (LPMOs) pertencentes a família AA9, contribui para a hidrólise com a clivagem oxidativa da celulose (QUINLAN et al., 2011, GLASS et al., 2013; Dutta; Wu, 2013; HU et al., 2014). A hidrólise completa da celulose ocorre, então, pela ação das β -glicosidases, classificadas nas famílias GH1 e GH3 (PAYNE et al., 2015). As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose e, portanto, diminuem o grau de inibição causado às celulases durante a sua hidrólise (Figura 12) (WYMAN et al., 2011).

Figura 12: Modelo de degradação da celulose pela combinação de enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para a sua degradação.

Fonte: Adaptado de Dutta; Wu, 2013.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para o desenvolvimento de um processo de extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimio-termomecanicamente com sulfito alcalino.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar físico-quimicamente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo sulfito alcalino e clorito ácido.
- 2.- Avaliar xilanases comerciais para uso na extração de hemiceluloses, em condições levemente alcalinas, dos bagaços pré-tratados.
- 3.- Estabelecer correlações entre os parâmetros físico-químicos dos bagaços e a extração enzimática da hemicelulose.
- 4.- Determinar as características da hemicelulose e do bagaço pré-tratado que podem limitar a extração enzimática da hemicelulose.
- 5.- Avaliar o efeito da adição de endo-glucanase na extração enzimática da hemicelulose por xilanase.
- 6.- Recuperar e caracterizar as hemiceluloses extraídas enzimaticamente.
- 7.- Avaliar a hidrólise enzimática da celulose dos bagaços submetidos à extração da hemicelulose.

4. Materiais e métodos

4.1 Bagaço de cana de açúcar e pré-tratamentos

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido na Destilaria Vale do Rio Turvo, cidade de Onda Verde (SP). O bagaço foi lavado e seco ao ar. Após secagem o bagaço foi pré-tratado.

4.1.1 Pré-tratamento químio-termomecânico (QTM) usando diferentes cargas de sulfito alcalino

A umidade do bagaço foi determinada e seiscentos gramas (massa seca) foram colocados em um reator de aço inox. Com ajuda de uma bomba foi feito vácuo durante 30 minutos para remover o ar de dentro do bagaço e favorecer a impregnação dos reagentes. O bagaço foi impregnado com diferentes concentrações de reagentes (m/m) a) carga baixa com 1,25% de NaOH e 2,5% de Na₂SO₃, b) carga média de 2,5% de NaOH e 5% de Na₂SO₃ c) carga alta correspondente a 5% de NaOH e 10 % de Na₂SO₃. Foi feito novamente vácuo no reator por 15 min, antes de transferi-lo para uma autoclave. O pré-tratamento foi conduzido a 121 °C por 120 min (Mendes et al., 2011).

Depois da etapa de pré-tratamento, o material foi esfriado e diluído com água para um volume de 25 L, reduzindo a sua consistência para 2%. A suspensão foi transferida para um refinador de discos (Regmed MD-300), ajustado com um espaço de disco de 0,1 mm e consumo de energia de 250 W (MENDES et al. 2011). Após o refino, o bagaço foi filtrado e seco ao ar até aproximadamente 75% de umidade, e estocado em freezer a -10 °C.

4.1.2 Deslignificação com clorito ácido

Cinquenta gramas de bagaço foram tratados com solução ácida de clorito de sódio, visando à solubilização da lignina. Para cada grama de bagaço de cana-de-açúcar seco, foram utilizados 0,3 g de clorito de sódio, 0,1 mL de ácido acético e 32 mL de água destilada. A

reação foi conduzida a uma temperatura entre 70-80°C. A cada hora de reação foram adicionados mais 0,1 mL de ácido acético e 0,3 g de clorito de sódio. Foram preparados bagaços tratados por 2 e 4 horas. Depois do pré-tratamento os bagaços foram resfriados a 10 °C, filtrados em filtros de placa porosa nº 2 e lavados com 20 mL de acetona e 80 mL de água destilada (BROWNING 1967).

4.2 Características físico-químicas dos bagaços *in natura* e pré-tratados

4.2.1 Determinação da composição química

Três gramas (3 g) de bagaço moído (20 mesh) *in natura* foram colocados em um extrator de Soxhlet com etanol a 95% por 6 h para determinação do teor de extrativos. Amostras dos bagaços pré-tratados pelos processos QTM e clorito ácido não foram extraídas com etanol, apenas secas ao ar e moídas (20 mesh), antes da determinação da composição química.

Em tubos de ensaio, aproximadamente 0,3 g das amostras de bagaço foram submetidas à hidrólise ácida durante 1 hora a 30 °C usando 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Em seguida, a mistura foi transferida quantitativamente para frascos erlenmeyer de 250 mL com adição de 79 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C por 1 hora. Depois de resfriado o material foi filtrado sob vácuo em filtro sintetizado nº 3 (SCHOTT). O material retido foi seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. Para determinação de lignina solúvel, uma parte do filtrado foi analisado em espectrofotômetro (U-2900 - Hitachi) UV-visível a 205 nm considerando a absorvidade molar da lignina solúvel igual a 105 L.g⁻¹.cm⁻¹. A outra parte da fração solúvel foi filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para a análise por HPLC foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45 °C, um detector de índice de refração a uma temperatura controlada de 35 °C, ácido sulfúrico 0,005 mol L⁻¹ como fase móvel, e fluxo de 0,6 mL/min (Ferraz. et al., 2000). Foi feito o cálculo para correção da composição química do bagaço através da multiplicação do rendimento do processo com a composição química do material.

4.2.2 Determinação dos ácidos hidroxicinâmicos

O teor de ácidos fenólicos ou hidroxicinâmicos totais (ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) do bagaço in natura e dos bagaços pré-tratados foram determinados. A reação foi realizada com 200 mg de massa seca (m.s.) das amostras, 16 ml de NaOH 4 mol L⁻¹ e 2 mg de antraquinona em reatores (100 ml) de aço inoxidável 316 por 2 horas a 170°C. A mistura obtida foi resfriada, acidificada com HCl 6 mol L⁻¹ até atingir pH 2, e o volume foi ajustado para 100 ml com água destilada, em um balão volumétrico. A solução foi estocada a 4°C por 16 horas e posteriormente filtrada em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A quantificação dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico foi feita em HPLC utilizando uma coluna Hypersil (Thermo-Scientific), com uma fase móvel composta por acetonitrila: água (1:4) e 1% de ácido acético. O fluxo utilizado foi de 0,8 ml/min e os ácidos hidroxicinâmicos foram detectados por detector UV empregando um comprimento de onda de 315 nm.

4.2.3 Determinação dos ácidos urônicos

A determinação dos ácidos urônicos foi feita segundo o método do ácido sulfúrico-carbazol (LI et al., 2007) e modificado por Silva (2016). Parte do hidrolisado ácido resultante da caracterização química dos bagaços pré-tratados (seção 4.2.1) foi utilizado para a determinação dos ácidos urônicos. Para isto, 400 µL do hidrolisado ácido foram incubados com 80 µL de ácido sulfâmico 4M em um tubo de ensaio. Posteriormente foram adicionados 2,4 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada esfriar até temperatura ambiente e foi adicionado 0,1 ml de carbazole (0,1% m/v etanol). O tubo foi fechado, homogeneizado em vórtex e levado a banho maria a 100°C por 20 minutos, seguido de resfriamento por banho de gelo. A absorbância da mistura resfriada foi feita em espectrofotômetro usando um comprimento de onda de 525 nm, e convertida em concentração de ácidos urônicos através da curva padrão de ácido glucurônico (0,1-1,3 µmol/ml). Os dados obtidos foram multiplicados por 0,4, correspondente ao fator de correção determinado por Silva (2016), quando validou a técnica usando xilana comercial de *beechwood* com valores conhecidos de ácidos urônicos.

4.2.4 Análise por RMN-2D de coerência quântica heteronuclear única $^1\text{H}/^{13}\text{C}$

As análises por RMN-2D foram realizadas com a colaboração do Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), Espanha. Especificamente, foram realizados experimentos de coerência quântica heteronuclear única (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Coherence). Foram analisados os diferentes bagaços de cana-de-açúcar e xilana extraída enzimaticamente do bagaço extraído com as maiores cargas de sulfito alcalino.

Para as análises, aproximadamente 80 mg de amostra foram dissolvidos em 0,75 mL de DMSO- d_6 . Os espectros de RMN foram registrados a 25 °C em um instrumento Bruker AVANCE III 500 MHz equipado com uma sonda de gradiente TCI 5 mm, refrigerada por criogenia com geometria inversa (bobinas de prótons mais próximas da amostra). Os experimentos HSQC (coerência quântica heteronuclear única) utilizaram o programa de pulsos "hsqcetgpsisp2.2" de Bruker (versão pulsada adiabática) com larguras espectrais de 5000 Hz (de 10 a 0 ppm) e 20,843 Hz (de 165 a 0 ppm) para as dimensões de ^1H e ^{13}C , respectivamente. O $^1J_{\text{CH}}$ utilizado foi de 145 Hz. O pico central do solvente foi utilizado como referência interna (δC 39,5; δH 2,49). Os picos de correlação HSQC foram atribuídos comparando com a literatura (RALPH et al., 2009; DEL RÍO et al., 2015).

4.2.5 Determinação dos grupos ácidos

Os ácidos fortes e fracos nos substratos tratados foram medidos por titulação condutimétrica (KATZ; BEATSON; SCALLON, 1984). Foram colocados 0,1 g dos bagaços (massa seca) em tubos de centrifuga de 50 mL, e a estes foram adicionados 15,0 mL de uma solução de HCl 1 mol/L. Após agitação em vórtex, a mistura foi mantida a 4 °C por 12 h. Após esse tempo, foram feitas lavagens das amostras com 45 mL de água deionizada, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 4750 g por 10 min. Esse procedimento foi repetido 6 vezes, quantitativamente para não haver perda de massa.

Os bagaços depois de lavados foram transferidos para um béquer de 250 ml e foram adicionados 50 ml de uma solução de NaCl 0,001 mol/L. A suspensão foi constantemente agitada com barra magnética e 20 μL de uma solução de HCl 0,5 mol/L foram adicionados. A mistura foi então titulada adicionando 10 μL de uma solução de NaOH 0,05 mol/L, e a cada adição a condutividade da solução foi registrada. O decréscimo no valor de

condutividade após a neutralização da solução de HCl (após adição de 200 µL de NaOH) foi associado à presença de grupos ácidos fortes no bagaço. A próxima fase da curva de titulação, na qual a condutividade da solução não variou com a adição de NaOH, foi atribuída à presença de ácidos fracos no bagaço. A neutralização dos grupos ácidos, fortes e fracos, foi confirmada pelo aumento da condutividade da solução com a adição da solução de NaOH.

Os grupos ácidos nos bagaços foram calculados dividindo a quantidade de NaOH (mmoles) necessária para neutralizar os grupos ácidos fortes e fracos, pela massa de bagaço (em kg). No caso dos ácidos fortes, a quantidade de NaOH também foi dividida pela massa de lignina nos bagaços.

4.2.6 Retenção de água

A determinação do valor de retenção de água (WRV) foi realizada de acordo com o proposto por Guo et al. (2011). As amostras de bagaço pré-tratadas foram imersas em água destilada por 24 h, empregando cerca de 1% (m/m) de teor de sólidos. Após este período, as amostras foram transferidas para um aparato de centrifugação composto por módulo de ultrafiltração, tubo de 50 mL e malha de aço com abertura de 200 mesh (Figura 13). Durante a centrifugação a 4.505 g por 15 min a 25 °C, a água não retida pelas amostras foi removida e a massa de bagaço úmido foi determinada (m_0) antes de transferi-las para uma estufa a 105 °C para determinação da massa seca (m_1). O WRV foi calculado pela equação 1:

$$WRV = \frac{m_0 - m_1}{m_1} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

onde, m_0 é a massa de bagaço úmido, e m_1 a massa de bagaço seco em estufa.

Figura 13: Representação esquemática do aparato de centrifugação.

Fonte: Arquivo pessoal

4.2.7 Determinação da área superficial acessível de celulose

Para avaliar a área superficial acessível de celulose nos bagaços utilizados no presente trabalho, foi usada a coloração de Simons (CS). Esta técnica utiliza os corantes Pontamine fast orange 6RN (direct orange; DO) e Pontamine fast sky blue 6BX (direct blue; DB), que possuem diferentes massas moleculares e afinidades pela celulose (CHANDRA; SADDLER, 2012; CHANDRA et al. 2008, 2009; YU; MINOR; ATALLA, 1995).

Ambos os corantes foram preparados numa concentração de 10 mg/ml. O corante DO foi ultrafiltrado em um aparato de filtração Amicon com membrana de 100 kDa, sob pressão de nitrogênio (28 psi), até reduzir o volume para 20% do inicial. Este procedimento foi repetido 3 vezes, trocando a membrana a cada vez. A concentração da solução do corante DO purificado (> 100 kDa) foi determinada por secagem de 1 ml de solução a 100°C , seguida da medição da massa seca. Com esse resultado, a concentração da solução filtrada foi ajustada para 10 mg/ml.

A absorvidade molar dos corantes DO e DB foi determinada experimentalmente por Siqueira (2015), medindo a absorbância (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi) de diferentes soluções de concentração conhecida. A absorbância destas soluções foi medida nos comprimentos de onda de máxima absorção de ambos os corantes, 455 nm e 624 nm para o corante laranja (DO) e azul (DB), respectivamente. Com os dados de concentração das soluções e as suas respectivas absorbâncias, foram construídas curvas, sendo o valor da inclinação de cada curva correspondente a absorvidade molar de cada corante em cada comprimento de onda. Os valores obtidos para o corante laranja (DO) foram 42,66 e $0,33\text{ L g}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ nos comprimentos de onda de 455 e 624 nm, respectivamente. Para o corante azul (DB) os valores obtidos foram de 2,69 e $13,82\text{ L g}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ nos comprimentos de onda de 455 e 624 nm, respectivamente.

Para medir a área superficial acessível, cada amostra de bagaço foi incubada com a mistura de corantes em 6 diferentes concentrações. Para isso, 10 mg de amostra foram pesadas e colocadas em tubos criogênicos de 2 mL, e adicionados 100 uL de tampão fosfato de sódio pH 6,0 ($0,3\text{M (Na)}_3\text{PO}_4$, $1,4\text{ mM NaCl}$). O volume final foi ajustado para 1 mL com água deionizada descontando os volumes de corantes, tampão e a umidade dos bagaços. Esta mistura foi deixada em repouso por 12 horas a 25°C e posteriormente, volumes de 25 uL, 50 uL, 75 uL e 100 uL de cada solução dos corantes DO e DB (10 mg/ml) na proporção 1:1 foram adicionadas aos tubos. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 70°C por 6 horas a 200 rpm. Depois do período de incubação, foram centrifugados a 1800 rpm por 5

minutos e feita a retirada das amostras do sobrenadante para medição da sua absorbância nos comprimentos de onda de 624 e 455 nm em espectrofotômetro. A concentração de cada corante em solução foi calculada através das equações:

$$C_{DO} = \frac{(\varepsilon_{DB624} * A_{455}) - (\varepsilon_{DB455} * A_{624})}{(\varepsilon_{DO455} * \varepsilon_{DB624}) - (\varepsilon_{DB455} * \varepsilon_{DO624})} \quad \text{Equação 2}$$

$$C_{DB} = \frac{(\varepsilon_{DO455} * A_{624}) - (\varepsilon_{DO624} * A_{455})}{(\varepsilon_{DO455} * \varepsilon_{DB624}) - (\varepsilon_{DB455} * \varepsilon_{DO624})} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

C_{DO} = Concentração do corante laranja.

C_{DB} = Concentração do corante azul.

A = Absorbância obtida na longitude de onda determinada.

(ε_{DO455}) e (ε_{DO624}) = Absortividades molares em $L \ g^{-1} \ cm^{-1}$ do corante DO nos comprimentos de onda de 455 e 624 nm respectivamente.

(ε_{DB455}) e (ε_{DB624}) = Absortividades molares em $L \ g^{-1} \ cm^{-1}$ do corante DB nos comprimentos de onda de 455 e 624 nm respectivamente.

A concentração de corante adsorvido nos bagaços foi determinada fazendo a diferença entre a concentração de corante adicionado e a concentração de corante no sobrenadante depois da incubação. A relação entre a concentração de corante adsorvido ($mg_{corante}/g_{bagaço}$), com a concentração de corante no sobrenadante (mg/ml) após incubação a temperatura de 70 °C foi usada para construir isotermas para cada corante nas diferentes amostras de bagaço.

Para determinar a celulose superficial acessível foi calculada a razão entre a concentração máxima de corante DO e DB adsorvidos (DO/DB), correspondente ao primeiro patamar da isoterma, ressaltando que pode-se obter mais de um patamar na isoterma, considerando que os corantes *Direct* podem adsorver em dupla camada (KHALFAOUI et al., 2014)

4.2.8 Determinação do grau de refino

A determinação do grau de refino do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino após o tratamento mecânico no refinador de discos, foi feita segundo a norma ISO 5267/2 e TAPPI T 227 em aparelho Regmed modelo CF/A. O volume de água coletado no aparelho foi expresso em ml (Canadian Standard Freeness, CSF). Este volume de água é inversamente proporcional ao grau de fibrilação.

4.3 Enzimas

Para extrair as xilanas do bagaço pré-tratado foram utilizadas as seguintes xilanases comerciais: *Thermomyces lanuginosus* (Sigma- X2753), Luminase PB-100 (BASF) e EDT- biobleachig (EDT).

Os sólidos resultantes após extração enzimática da xilana foram submetidos a sacarificação enzimática utilizando as celulasas comerciais: Celluclast (Sigma-C2730); Novozym 188 (Sigma-C6105). No intuito de desestruturar o material pré-tratado para aumentar a extração de xilana, foi utilizada em enzima Carezyme 1000L (Celulase de *Aspergillus* sp.; Sigma-C2605)

4.3.1 Atividades enzimáticas e concentração de proteínas

4.3.1.1 β -D-Xilanase

As atividades das xilanases foram determinadas de acordo com o método de Bailey; Biely e Poutanen (1992). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,9 mL de xilana 1 % e 0,1 mL de solução enzimática e incubados a 50 °C por 5 minutos, para determinação dos açúcares redutores (Miller, 1959). A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi fervido a 100 °C em banho maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, fez-se a leitura da absorbância a 540 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). Foi feito um controle para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes da enzima. A absorbância do controle foi subtraída da respectiva amostra. A curva padrão foi construída com soluções

de xilose (Merck) entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 μmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

4.3.1.2 β -D-Xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi determinada segundo a metodologia de Tan; Mayers e Saddler (1987). Uma alíquota de 0,8 mL de solução de p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX, Sigma) 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de solução enzimática em tubo de ensaio incubado a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % ao tubo de ensaio e foi realizada a leitura da absorbância a 410 nm. Um controle foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes da enzima. O p-nitrofenol (pNP) liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de pNP (Sigma) nas concentrações entre 0,025 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -xilosidade corresponde a formação de 1 μmol de pNP por minuto.

4.3.1.3 Celulases totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), uma tira de papel de filtro 1x5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático Celluclast (Sigma) nas diluições de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400. Os tubos de ensaios foram mantidos em banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Após o período de reação, foram adicionados 3 mL de reagente DNS e a mistura foi fervida a 100 °C por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada em todos os tubos e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). Foram feitos controles para cada diluição da enzima, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva padrão construída com concentrações de glicose em 0,5 mL (1 mg, 1,65 mg, 2,5 mg e 3,35 mg). A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de glicose, correspondente a 4% de conversão da celulose.

Para o cálculo da atividade de celulasas totais (FPU/mL) divide-se 0,37 pelo valor inverso da diluição necessária para liberar 2 mg de glicose, estimado através da curva. O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 micromol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra (0,5 ml) e o tempo de reação (60 min). O valor que foi obtido corresponde às do extrato enzimático.

4.3.1.4 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase presente no extrato comercial Novozyme 188 foi determinada segundo Tan; Mayers e Saddler (1987), usando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG, Sigma). Foram adicionados 0,8 mL de solução de pNPG 0,1 % e 0,2 mL de solução enzimática em tubo de ensaio e incubado a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10% e feita a leitura da absorbância a 410 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). O controle do ensaio foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10% no início da reação. O p-nitrofenol (pNP) liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de pNP (Sigma) nas concentrações entre 0,025 e 0,2 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidase corresponde a formação de 1 μ mol de pNP por minuto.

4.3.1.5 Endoglucanase

Para medir a atividade de endo-1,4- β -glucanase foi utilizado o protocolo descrito por Tanaka et al. (1981) com modificações, utilizando uma suspensão de carboximetilcelulose (CMC) de viscosidade média (SIGMA). Esta suspensão foi incubada junto com a enzima, e os açúcares redutores liberados pela hidrólise da enzima foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Especificamente, foram adicionados 0,9 mL de carboximetilcelulose 0,44 % e 0,1 mL de extrato enzimático Carezyme 1000L em tubos de ensaio, e incubados a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS em cada tubo de ensaio, e fervura em banho-maria por 5 minutos. Os tubos foram resfriados e lida a absorbância a 540 nm. O controle foi feito adicionando o reagente DNS antes do extrato enzimático. Os

valores de absorbância foram convertidos em glicose usando uma curva padrão de concentrações entre 1 e 10 $\mu\text{mol/mL}$.

4.3.1.6 Proteínas totais

Para determinar a concentração de proteínas nos extratos enzimáticos, foi utilizado o Método de Lowry (GHOSE, 1987). Esta metodologia envolve o preparo de diferentes soluções: A (20 g de Na_2CO_3 , 4g de NaOH em 1000ml de água), B-1 (1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água), B-2 (2 g Tartarato de Sódio e Potássio), C (1 ml de Reagente B-1, 1 ml de Reagente B-2, 100ml de reagente A, preparado na hora de usar) e o Reagente Fenol 1N (preparado a partir da diluição 1:2 do reagente Folin Ciocalteou).

Foram misturados 1 ml da amostra em um tubo com 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% m/v. A amostra foi homogeneizada, incubada por 60 minutos a 4 °C, para precipitar as proteínas e centrifugada a 3400 g por 30 minutos. O sobrenadante da amostra foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 1 ml do reagente A. Em 0,5 ml desta solução esta solução foi adicionado 5 ml do reagente C. Após 10 minutos adicionou-se 0,5 ml de Reagente fenol 1N, e depois de 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com a curva padrão construída com soluções de albumina soro bovino (BSA) de concentrações entre 0,05 e 1,0 mg/ml. As soluções padrões de BSA foram submetidas ao mesmo procedimento descrito para as amostras.

4.4 Extração enzimática e recuperação da arabinoxilana extraída dos bagaços pré-tratados

4.4.1 Extração enzimática empregando diferentes xilanases comerciais

O experimento foi conduzido com os bagaços pré-tratados, QTM e delignificados com clorito ácido, numa consistência de 5% (p/v) dentro de tubos de plástico de 50 mL (tipo Falcon), com agitação recíproca de 120 rpm, em agitador termostatizado por banho de água a 50 °C. A carga utilizada de xilanases foi de 20 UI por grama de bagaço. As enzimas foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8, contendo 0,01% (m/v) de azida de

sódio para evitar contaminação microbiana. Nos tempos de 3, 6 e 24 horas de reação foram retiradas amostras de 1 ml de cada tubo, com o auxílio de uma pipeta automática com ponteira cortada para permitir a amostragem simultânea de sólidos e líquidos do meio reacional. Para interromper a hidrólise, o material amostrado foi colocado por 5 min em banho Maria fervente e, em seguida centrifugado a 4750 g por 15 minutos. O sobrenadante foi analisado diretamente por cromatografia em camada delgada (seção 4.5.2) e por HPLC (seção 4.2.1).

Para avaliar o rendimento de extração de xilana os sobrenadantes foram levados a monômeros por hidrólise ácida, usando a metodologia de Sluiter, (2008) (seção 4.5.1). Os açúcares monoméricos foram analisados por HPLC segundo as condições de análise descritas na seção 4.2.1. O rendimento da extração de xilana foi calculado relacionando a massa (g) de xilose e arabinose obtidas pela massa desses constituintes no bagaço pré-tratado, expressados em termos de porcentagem. A quantidade de glicose produzida também foi monitorada com a finalidade de estabelecer se as enzimas hidrolisam a celulose dos bagaços.

4.4.2 Extração enzimática com diferentes cargas do preparado comercial Luminase

As xilanas dos bagaços pré-tratados com 5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH e com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH foram extraídas empregando diferentes cargas enzimáticas do preparado comercial de xilanase de *Bacillus licheniformes* (Luminase PB-100 - BASF com atuação entre 40-70 °C e pH 5,0-8,5). Foram avaliadas as cargas enzimáticas de 5, 20, 40, 60 e 100 UI por grama de bagaço. Por outra parte, o bagaço deslignificado com clorito ácido por 4 horas foi extraído com 5 e 60 UI/g de xilanase. Em todas as condições testadas foram retiradas amostras homogêneas (sólido/líquido) de 500 uL, nos tempos de 4, 6, 8 e 24 horas para análise dos açúcares solubilizados. Os resultados foram expressos como rendimentos de arabinoxilana, sendo esta calculada relacionando a massa (g) de xilose e arabinose obtidas pela massa desses constituintes no bagaço pré-tratado, expressos em termos de porcentagem.

4.4.3 Extrações sucessivas de xilana

As xilanas do bagaço pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH foram extraídas com 100 UI/g de bagaço (Luminase) e amostras foram retiradas em 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de hidrólise.

O sólido resultante do experimento de extração por 48 h com Luminase, foi submetido a 4 lavagens sucessivas com água destilada usando, cada vez, um volume de água para manter a consistência de 5%. Os líquidos foram recolhidos com pipeta para determinação do rendimento de xilana e TLC (Figura 14). O número de lavagens foi definido com base na ausência de açúcares detectáveis na água de lavagem por HPLC. Após todas as lavagens uma parte do sólido residual foi caracterizada quimicamente (item 4.2.1) e submetida à hidrólise enzimática usando celulasas comerciais (item 4.6). Uma segunda extração do material pré-extraído com xilanase foi realizada usando o mesmo procedimento descrito neste item (Figura 8). As relações molares (xil:ara) foram calculadas nos diferentes tempos de reação, com a finalidade de monitorar o grau de substituição da xilana com arabinose.

4.4.4 Efeito de proteínas auxiliares na extração de xilana do bagaço pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH

O preparado comercial de celulasas de *Aspergillus* sp (Carezyme 1000L com atuação entre 40-70 °C e pH 5,0-8,5) foi avaliado em conjunto com o preparado comercial Luminase para extração de xilana. Os ensaios foram feitos pré-incubando o bagaço pré-tratado por 8 ou 48 horas com a celulase antes de adicionar a xilanase (Luminase). O preparado enzimático Luminase foi fixado em 5 UI/g de bagaço (m.s), correspondente a 5,2 mg de proteína. Foram utilizadas as mesmas condições de extração descritas na seção 4.4.1 (Tampão fosfato pH=8,0 50 mM; 50 °C; 120 agitações/min - recíproca). A enzima Carezyme 1000L foi utilizada numa concentração 10 mg proteína/g de bagaço, correspondente a 352 UI de atividade de endoglucanase, em pH=8.0. Nesta condição de pH não foram detectadas atividades de β -glicosidase ou de endoxilanase no preparado comercial. Foram feitos dois controles: um por adição conjunta de celulasas e Luminase e outro somente com celulase. Como controle da carga de proteínas (bloqueio da adsorção improdutiva) foram feitos os mesmos experimentos

anteriormente descritos usando albumina de soro bovino (BSA) numa concentração de 10 mg/ g de bagaço, em lugar da enzima Carezyme 1000L. Os sobrenadantes obtidos nos diferentes tempos foram analisados usando a metodologia descrita na seção 4.5.1.

Figura 14: Esquema do experimento realizado para extrair o máximo de arabinoxilana com extrações sucessivas e lavagens do material resultante da hidrólise. Cores similares indicam o mesmo sólido residual. (—) Bagaço extraído uma vez com Luminase. (—) Bagaço extraído uma vez com tampão. (—) Bagaço extraído pela segunda vez com Luminase. (—) Bagaço extraído uma vez com Luminase e extraído novamente em tampão

Fonte: Arquivo pessoal

4.4.5 Recuperação das xilanas extraídas

Um ensaio em maior escala foi feito com 2,5 g/ms de bagaço pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH, em Erlenmeyer de 250 ml utilizando 20 UI/g de xilanase (Luminase).

A fração líquida obtida no procedimento foi liofilizada, ressuspensa em 10 ml de água destilada e precipitada conforme Buranov et al. (2010) e De Lopez et al (1996).

Parte da amostra foi processada pelo protocolo de De Lopez e colaboradores (1996). A amostra teve seu pH ajustado para 5,0, usando ácido acético glacial (Synth). Foram adicionados 2 volumes de etanol 95% (Synth), e a amostra permaneceu em repouso durante a noite, na temperatura de 4° C. Em seguida o material foi centrifugado (4.750 g) por 15 min. O sólido obtido foi lavado com etanol 75% (Synth) e seco ao ar (fração 1). A fração líquida foi evaporada em estufa com circulação de ar a 30° C, seguido de dissolução do sólido resultante em 2 ml de água destilada (fração 2).

Outra parte de amostra foi submetida ao procedimento descrito por Buranov e colaboradores (2010). A amostra foi colocada em etanol 95% (1:4), seguido de repouso à temperatura ambiente, durante a noite. A fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (4750 g) e seca em estufa com circulação de ar a 30° C, seguido de dissolução do resíduo em 2 ml de água destilada (fração 3). Como o sólido não foi completamente dissolvido, foram adicionados mais 2 ml de água, para sua completa dissolução (fração 4). A fração sólida foi lavada com etanol 75% (Synth) e secada ao ar (fração 5).

4.5 Caracterização das arabinoxilanas extraídas dos bagaços pré-tratados

4.5.1 Composição química das arabinoxilanas extraídas

As arabinoxilanas extraídas dos bagaços pré-tratados foram hidrolisadas com ácido sulfúrico para determinação da sua composição através da sua conversão até monômeros. A metodologia proposta por Sluiter (2008), consiste em adicionar um volume de H_2SO_4 72% (p/p) de forma de obter uma concentração final de H_2SO_4 de 4% (p/p). Posteriormente, as amostras foram autoclavadas por 1 hora a 1 atm e os monômeros (xilose, arabinose e glicose)

liberados foram analisados em HPLC (Waters) em uma coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C. As amostras foram eluídas com 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min e detectadas por índice de refração a 35°C (WATERS 2414) (FERRAZ et al., 2000). Xilose (0,15 g/l) sem autoclavar e após autoclavada nas mesmas condições do ensaio foram analisadas a fim de ter um controle interno do processo e/ou corrigir a decomposição de açúcares por desidratação pelo ácido (SLUITER, 2008).

4.5.2 Cromatografia em camada delgada (TLC)

Foi realizada uma cromatografia para a detecção de açúcares, em placas de sílica gel 60 F254 (Merck), empregando como solvente uma mistura de acetato de etila:ácido acético:propanol:ácido fórmico:água (25:10:5:1:15) (PUCHART; BIELY, 2008). Os padrões e amostras foram colocados a 1 cm da parte inferior da placa, através de aplicações sucessivas de 1 µL (1 a 2 aplicações), e secas em estufa a aproximadamente 45 °C. Uma cuba com tampa foi utilizada para acondicionar o solvente por 15 min antes de colocar a placa de sílica com as amostras em posição vertical. Após o solvente ascender ao topo da placa, esta foi retirada e seca em estufa a aproximadamente 45 °C até que estivesse livre de solvente. A revelação das amostras foi realizada por imersão da placa na solução reveladora e seca em estufa a 110°C por aproximadamente 5 min ou até o aparecimento de marcas. A solução reveladora foi preparada dissolvendo-se 1,8 g de N-(1-Nafitil)-etilenodiamina dihidroclorato (Sigma) em 200 mL de etanol e, sob agitação constante, foram adicionado lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.5.3 Separação cromatográfica das xilanas extraídas enzimaticamente

Os produtos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 10% de Na₂SO₃ e 5% de NaOH extraído com Luminase, foram separados por tamanho por cromatografia de exclusão molecular (GPC) em uma coluna empacotada com gel Sephadex-G75 (80 x 1,6 cm – GE Healthcare), em NaOH pH=10 como eluente, a um fluxo de 0,42 mL/min. Foi injetada uma amostra contendo Blue Dextran (2.10⁶ Da) e Vitamina B12 (1.356 Da), como marcadores da faixa de separação da coluna. Em seguida, um volume de 200 µL

de amostra foi aplicada na coluna. A detecção dos carboidratos eluídos da coluna foi feita pelo método do fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

4.5.4 Determinação dos fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados por espectrofotometria UV em meio alcalino. Especificamente, foi avaliada a liberação dos fenóis durante a extração enzimática utilizando o preparado Luminase nas cargas enzimáticas de 20, 40 e 60 UI por grama de bagaço, nos tempos de hidrólise de 4, 6, 8 e 24 horas. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram analisados em condição alcalina (pH 8) por espectrofotometria UV a 280 nm. A concentração destes compostos foi calculada usando um coeficiente de absorvidade de 20 L cm.⁻¹g⁻¹ (MASARIN et al., 2011; GUERRA et al., 2000).

4.6 Sacarificação enzimática do sólido residual empregando celulasas comerciais

A hidrólise enzimática dos sólidos residuais, obtidos após as extrações com 100 UI de Luminase/g bagaço pré-tratado com 10% de Na₂SO₃ e 5% de NaOH, foi realizada a uma consistência de 5% (p/v). As reações foram conduzidas em tubos de plástico tipo Falcon de 50 mL a 45 °C com agitação recíproca de 120 rpm em agitador termostatizado por banho de água. Os resíduos foram hidrolisados com 10 FPU de celulase (Celluclast)/g de bagaço, e 20 UI de β-glicosidase (Novozyme 188)/g de bagaço em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, contendo azida de sódio a 0,01% (m/v). Amostras foram retiradas nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 h e em seguida fervidas por 5 min. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e a glicose e xilose presentes nos sobrenadantes foram analisados por HPLC (Waters) (Ferraz et al., 2000). As massas de glicose e xilose foram multiplicadas pelos fatores de hidrólise (0,9 e 0,88, respectivamente) e, para determinação da eficiência de hidrólise os resultados foram divididos pela massa de glucana e xilana respectivas, presentes na amostra original. As relações molares (glicose:xilose) foram calculadas nos diferentes tempos de reação.

4.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e calculados os respectivos desvios padrões. Em alguns gráficos não é possível observar a barra de erros por ser inferior a 0,5%. As médias das velocidades iniciais nos experimentos de sacarificação, foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, usando o software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2008).

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados

No presente trabalho o bagaço de cana foi pré-tratado utilizando duas metodologias, com o objetivo de obter níveis diferentes de deslignificação e de remoção de componentes. Um dos processos foi o pré-tratamento químio-termomecânico (QTM) usando licor sulfito alcalino, com diferentes cargas de reagentes. Quimicamente, este pré-tratamento remove principalmente a lignina e preserva grande parte da hemicelulose, alterando também a estrutura dos materiais pré-tratados pelo processo mecânico com o refinador de discos. O rendimento do processo fica acima de 70%, após filtração e lavagem do material pré-tratado em água (MENDES et al., 2011; LAURITO-FRIEND et al., 2013). O outro pré-tratamento realizado no bagaço foi a deslignificação com clorito em meio ácido. Este pré-tratamento remove seletivamente a lignina dos materiais lignocelulósicos (BROWNING 1967), sendo obtidos bagaços tratados por 2 e 4 horas de reação. Os bagaços *in natura* e tratados foram caracterizados físico-quimicamente, sendo avaliadas a composição química, o teor de ácidos hidroxicinâmicos, espectro RMN-2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, grupos ácidos, retenção de água e a área superficial acessível da celulose.

5.1.1 Composição química dos bagaços

A tabela 2 apresenta os resultados de rendimento de teores de lignina, hemicelulose e glucana do bagaço *in natura*, pré-tratados QTM com diferentes cargas de sulfito alcalino e pré-tratados com clorito ácido. Os rendimentos dos bagaços pré-tratados pelo processo QTM variou de 82% a 87%, enquanto dos bagaços deslignificado com clorito ácido foram de 86% e 88%.

É importante colocar em destaque que no presente trabalho os rendimentos nos pré-tratamentos QTM com diferentes cargas de sulfito alcalino foram superiores aos reportados anteriormente por MENDES et al. (2011). Isto porque MENDES et al. (2011) lavaram os bagaços pré-tratados extensivamente até pH final 7; enquanto neste estudo os bagaços pré-tratados não foram lavados, a fim de preservar ao máximo os carboidratos solúveis e também reduzir os custos econômicos e ambientais advindos do processo de lavagem. Assim, nos

bagaços QTM pré-tratados com carga de reagente baixa: QTM2,5%, média: QTM5% e alta: QTM10%, os pHs dos licores após pré-tratamento foram 8,0; 8,5 e 9,8; respectivamente. Os teores de cinzas também foram avaliados, não sendo encontradas diferenças significativas entre os diferentes bagaços (aproximadamente 1,5% para todos os bagaços), portanto o aumento de rendimento dos pré-tratamentos não ocorreu pela adsorção de reagentes químicos por parte das fibras dos bagaços pré-tratados. O ajuste do pH dos experimentos de extração de xilana foram feitos pela adição de tampão fosfato de sódio pH 8,0, 50 mM, não sendo observada alteração do pH da solução tamponada.

Após os pré-tratamentos QTM observa-se que a lignina foi o principal componente removido, sendo sua remoção proporcional ao aumento da carga dos reagentes (Tabela 2). Por consequência, o rendimento das amostras pré-tratadas diminuiu em função da concentração de reagentes aplicados na etapa de cozimento. As remoções de lignina no bagaço pré-tratado QTM foram de 18%; 31% e 48% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente (Tabela 2). A fibrilação (Freenes), uma medida inversamente proporcional ao volume de água coletado, foi menor em função da remoção de lignina. Isto corresponde a um aumento do grau de refino dos bagaços. Considerando que a lignina confere resistência mecânica aos materiais lignocelulósicos, sua remoção aumenta a capacidade da fibra de reter água (HENRIKSSON, 2009). Observa-se que o pré-tratamento também remove parte da hemiceluloses, em níveis de 22% para o pré-tratamento QTM2,5% e QTM5% e 17% para o pré-tratamento QTM10%. É relatado na literatura que os tratamentos alcalinos podem quebrar ligações éster por saponificação, facilitando a dissolução dos complexos lignina-carboidrato (LCC) e de parte das hemiceluloses (CHUNDAWAT et al., 2011). No entanto, trabalhos anteriores mostraram remoções da hemicelulose entre 25-30% após pre-tratamento QTM (MENDES et al., 2011; LAURITO-FRIEND et al., 2013), sugerindo que a retirada da etapa de lavagem preserva mais xilanas no sólido pré-tratado, aumentando o rendimento do processo. O teor de glucana também foi alterado, no entanto em porcentagens menores comparado com os outros componentes. O tratamento do bagaço na menor carga de reagentes removeu 11% de glucana, enquanto as concentrações média e alta removeram 4% e 3% de glucana, respectivamente. A glucana removida provavelmente corresponde a celulose amorfa hidrolisada nas condições do pré-tratamento (COSTA et al., 2016). Nos materiais pré-tratados QTM5% e QTM10% a glucana foi menos solubilizada, indicando uma maior seletividade na remoção de lignina.

Tabela 2: Caracterização química do bagaço *in natura*, pré-tratado com sulfito alcalino e deslignificado com clorito ácido.

Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Freeness	Rendimento (g/100 g de bagaço pré- tratado)	Composição de bagaço (g/100g em base polpa)			Composição de bagaço (g/100g de bagaço original)		
			Lignina	Hemicelulose	Glucana	Lignina	Hemicelulose	Glucana
Não tratado	nd.	100	22,02±0,25	28,54±0,57	38,29±0,18	22,02	28,54	38,29
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH (QTM2,5%)	621 ml	86,76	20,81±0,44	25,65±0,35	39,35±0,12	18,05	22,25	34,14
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH (QTM5%)	608 ml	84,12	18,06±0,63	26,47±1,06	43,81±1,84	15,19	22,26	36,86
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH (QTM10%)	102 ml	81,84	13,78±0,38	28,68±0,55	45,53±0,62	11,28	23,47	37,26
Bagaço delignificado por 2 horas com clorito ácido (D2)	nd.	85,74	11,50±0,35	32,22±0,12	43,09±0,58	9,86	27,62	37,64
Bagaço delignificado por 4 horas com clorito ácido (D4)	nd.	87,86	6,18±0,38	29,19±0,89	44,49±0,91	5,43	25,65	39,09

Freeness - capacidade de drenagem da fibra, característica que pode ser usada para auxiliar no controle do consumo de energia em desfibramento e refinação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3: Principais constituintes da hemicelulose dos diferentes bagaços utilizados.

Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Rendimento (g/100 g de bagaço pré- tratado)	Composição hemicelulose (g/100 g bagaço original)				Soma
		Xilose	Arabinose	Ácidos urônicos	Ácido acético	
Não tratado	100	20,00	1,89	3,42	3,23	28,54
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH (QTM2,5%)	86,76	17,14	1,44	2,89	0,78	22,25
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH (QTM5%)	84,12	17,74	1,85	2,68	ND	22,26
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH (QTM10%)	81,84	18,91	1,78	2,78	ND	23,47
Bagaço delignificado por 2 horas com clorito ácido (D2)	85,74	21,55	2,79	3,29	ND	27,62
Bagaço delignificado por 4 horas com clorito ácido (D4)	87,86	19,72	2,14	3,78	ND	25,65

ND: Não detectado.

Fonte: Arquivo pessoal.

O processo de deslignificação com clorito ácido, por 2 horas (D2) e 4 horas (D4) de reação removeu 55% e 75% da lignina, respectivamente (Tabela 2). A literatura reporta que as frações de polissacarídeos são preservadas até 60% de deslignificação (AHLGREN E GORING, 1971), explicando a perda de 10% da hemicelulose no bagaço D4. No bagaço D2 foram removidos 3% da hemicelulose, devido à remoção conjunta com a lignina.

A principal xilana de gramíneas é a glucorono-arabinoxilana (GAX) (EBRINGEROVÁ, 2006). Assim, o conteúdo de GAX nos bagaços pré-tratados foi calculado pela soma dos seus constituintes principais (xilose, arabinosil, acetil e glucuronosil) (Tabela 3). O pré-tratamento QTM diminuiu o teor de xilose em 14%, 11% e 5% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. A maior parte (76%) dos grupos acetil foi saponificado no tratamento com a menor carga de álcali, não sendo mais detectados nos bagaços pré-tratados com as cargas média e alta de reagentes. A remoção de ácido urônico após o pré-tratamento foi de 16%, 22% e 19% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. Este componente é resistente a condições alcalinas, inclusive mais severas que as empregadas neste estudo, como a polpação kraft de eucalipto. Nesse caso, há formação de ácido hexenurônico que permanece ligado à polpa (GELLERSTEDT, 2009).

A deslignificação com clorito ácido não afetou a composição química da hemicelulose, exceto os ácidos urônico. Este substituinte foi diminuído 4% no bagaço D2 (Tabela 3).

É reportado na literatura que um tratamento alcalino pode quebrar as ligações éter e éster entre a lignina e as hemiceluloses, e os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico e *p*-coumárico) (PENG et al., 2012), porém as condições de temperatura usadas no pré-tratamento QTM com sulfito alcalino favorecem a quebra das ligações éster, sendo necessárias condições mais severas para quebrar as ligações éter (MASARIN et al., 2011). Parte do ácido ferúlico (29%) foi removida pelo pré-tratamento QTM2,5%, não sendo evidenciada a remoção de ácido *p*-coumárico. Nos bagaços QTM5% e QTM10% houve remoção de 19% e 59% de ácido ferúlico, e de 30% e 53% do teor de ácido *p*-coumárico, respectivamente (Tabela 4).

No tratamento do bagaço com clorito (D2) foram removidos 91% e 99% do ácido ferúlico e *p*-coumárico, respectivamente; enquanto o tratamento D4 removeu a totalidade dos ácidos hidroxicinâmicos. Este resultado se explica porque a deslignificação com clorito é um

processo oxidativo que remove seletivamente a lignina e também os ácidos hidroxicinâmicos (SIQUEIRA et al. 2011).

O teor de ácido *p*-coumárico é maior que de ácido ferúlico no bagaço *in natura*. Esta predominância é mantida após o pré-tratamento QTM, enquanto no tratamento D2 se inverte, apesar do baixo conteúdo detectado de ácidos hidroxicinâmicos. Como os ácidos hidroxicinâmicos se encontram ligados à lignina (PENG et al., 2012), a remoção dos ácidos *p*-coumárico e ferúlico de todos os bagaços pré-tratados correlacionaram-se positivamente com a remoção de lignina (Figura 15).

No intuito de verificar de forma mais aprofundada as modificações acarretadas pelos pré-tratamentos, os bagaços foram analisados por RMN bidimensional. Especificamente, foram realizados experimentos de coerência quântica heteronuclear única (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Coherence). Esta técnica detecta e informa o acoplamento entre o carbono e os hidrogênios ligados diretamente a ele ($^1J_{CH}$), representando o resultado em um gráfico 2D ($^1H/^{13}C$). O gráfico é construído pelo cruzamento dos picos entre o sinal do carbono no eixo das ordenadas e do hidrogênio no eixo das abscissas, indicando que existe uma ligação entre estes átomos. Amostras do bagaço sem pré-tratar, pré-tratado pelo processo QTM com as 3 diferentes cargas de sulfito alcalino, e tratado com clorito por 2 horas (D2) foram analisadas. O bagaço tratado por 4 horas com clorito ácido não foi analisado, pois deslignificações superiores a 60% com este processo produzem modificações nas frações polissacarídicas, podendo levar a resultados e interpretações erradas. Na tabela 5 se apresentam os principais sinais de correlação de lignina e carboidratos atribuídos nos espectros de RMN. Os espectros 2D-RMN HSQC $^1H/^{13}C$ se mostram na figura 16A-E; enquanto as principais subestruturas encontradas estão representadas na figura 16F.

Tabela 4: Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço *in natura* e pré-tratados.

	g/100 g base polpa				g/100 g bagaço original		
Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Hidrólise Severa			Rendimento (g/100 g base polpa)	Hidrólise Severa		
	Esteres + Eter %				Ester + Eter %		
	Ferúlico	p-cumárico	Soma		Ferúlico	p-cumárico	Soma
Não tratado	1,47±0,10	3,26±0,05	4,73±0,38	100	1,47	3,26	4,73
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH	1,22±0,38	4,38±0,25	5,60±0,63	86,76	1,05	3,80	4,86
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH	1,42±0,07	2,72±0,26	4,14±0,57	84,12	1,19	2,28	3,48
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH	0,74±0,06	1,87±0,37	2,61±0,65	81,84	0,60	1,53	2,30
Bagaço delignificado por 2 horas com clorito ácido	0,16±0,01	0,02±0,03	0,18±0,2	85,74	0,13	0,02	0,15
Bagaço delignificado por 4 horas com clorito ácido	0,00	0,00	0,00	87,86	0,00	0,00	0,00

Fonte: Arquivo pessoal. Valor ± indica o desvio padrão.

Figura 15: Correlação entre a remoção da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos após os pré-tratamentos. (2,5% Na_2SO_3 + 1,25% NaOH : $\square$; 5% Na_2SO_3 + 2,5% NaOH : $\triangle$; 10% Na_2SO_3 + 5% NaOH : $\star$ Deslignificação com clorito ácido por 2 horas: $\boxplus$ Delignificação com clorito ácido por 4 horas: $\bullet$)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5. Atribuições das principais correlações dos sinais $1H/13C$ no espectro 2D HSQC dos bagaços sem pretratar, QTM pré-tratado com diferentes cargas sulfito e álcali e deslignificado com clorito ácido por 2 horas em DMSO- d_6 . **(A)** Sinais de picos cruzados de lignina e **(B)** polissacarídeos.

A) Sinais de picos cruzados de Lignina

Legenda	$\delta C/\delta H$ (ppm)	Atribuição
-OCH ₃	55.6/3.73	C/H em metoxilas
A _{γ}	59.4 /3.40 e 3.72	C γ /H γ em sub-estruturas β -O-4' normais (γ -hidroxiladas) (A)
I _{γ}	61.3/4.09	C γ /H γ em grupos finais de álcool cinâmico (I)
A' _{γ}	62.7/3.83-4.30	C γ /H γ em sub-estruturas β -O-4' γ -p-coumaroilado (A')
A _{α} /A' _{α}	71.8/4.87	C α /H α em sub-estruturas β -O-4' (A , A')
A' _{$\beta(S)$}	83.0/4.33	C β /H β em sub-estruturas β -O-4' γ -p-coumaroiladas ligadas à unidade S (A')
A _{$\beta(G)$}	83.6/4.29	C β /H β em sub-estruturas β -O-4' ligadas à unidade G (A)
A _{$\beta(S)$}	85.9/4.12	C β /H β em sub-estruturas β -O-4' ligadas à unidade S (A)
S _{2,6}	103.8/6.69	C2/H2 e C6/H6 em unidades de siringil eterificadas (S)
G ₂	110.9/7.00	C2/H2 em unidades de guaiacil (G)
FA ₂	111.0/7.32	C2/H2 em unidades de ácido ferúlico (FA)
PCA _{β} e FA _{β}	113.5/6.27	C β /H β em p-coumaratos (PCA) e ferulatos (FA)
G ₅ /G ₆	114.9/6.72 e 6.94 118.7/6.77	C5/H5 e C6/H6 em unidades guaiacil (G)
PCA _{3,5}	115.5/6.77	C3/H3 e C5/H5 em p-coumaratos (PCA)
FA ₆	123.3/7.10	C6/H6 em ferulatos (FA)
PCA _{2,6}	130.0/7.46	C2/H2 e C6/H6 em p-coumaratos (PCA)
PCA _{α} e FA _{α}	144.4/7.41	C α /H α em p-coumaratos (PCA) e ferulatos (FA)

B) Sinais de picos cruzados de polissacarídeos

Legenda	$\delta C/\delta H$ (ppm)	Atribuição
X ₅	63.2/3.26 e 3.95	C5/H5 em β -D-xilopiranosídeo
X ₂	72.9/3.14	C2/H2 em β -D-xilopiranosídeo
X' ₂	73.5/4.61	C2/H2 em 2- <i>O</i> -acetil- β -D-xilopiranosídeo
X ₃	74.1/3.32	C3/H3 em β -D-xilopiranosídeo
X' ₃	74.9/4.91	C3/H3 em 3- <i>O</i> -acetil- β -D-xilopiranosídeo
X ₄	75.6/3.63	C4/H4 em β -D-xilopiranosídeo
U ₄	81.4/3.22	C4/H4 em ácido 4- <i>O</i> -metil- α -D- glucurónico
U ₁	97.7/5.32	C1/H1 em ácido 4- <i>O</i> -metil- α -D- glucurónico
X' ₁	99.8/4.58	C1/H1 em 2- <i>O</i> -acetil- β -D-xilopiranosídeo
X ₁ /X' ₁	102.1/4.38	C1/H1 em β -D-xilopiranosídeo + 3- <i>O</i> -acetyl- β -D-xilopiranosídeo
Gl ₁	103.3/4.41	C1/H1 em (1→4)- β -D-glucopiranosídeo
Gl ₁	103.6/4.30	C1/H1 em (1→3)- β -D-glucopiranosídeo + (1→6)- β -D-glucopiranosídeo

Fonte: IRNAS (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, P.O. Box 1052, 41080-Sevilla, Espanha).

Os sinais mais importantes para os carboidratos corresponderam a xilana, especificamente aos carbonos (C) e hidrogênio (H) das unidades de xilose, representados como **X₂** (C₂/H₂), **X₃** (C₃/H₃), **X₄** (C₄/H₄), **X₅** (C₅/H₅); e ao C₄/H₄ correlacionado com o ácido 4-O-metil- α -D-glucurônico (**U₄**). Também foram evidenciados claros sinais associados a xilanas acetiladas (3-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo, **X'₃**, e 2-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo, **X'₂**), confirmando que a xilana do bagaço de cana-de-açúcar é parcialmente acetilada na posição C-2 e/ou C-3. Outros sinais de carboidratos detectados foram C₁/H₁ correlacionado com o carbono anomérico do β -D-xilopiranosídeo (**X₁**), 2- e 3-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo (**X'₁**), β -D-glucopiranosídeo (**G_H**) e ácido 4-O-metil- α -D-glucurônico (**U₁**).

A maioria dos sinais de carboidratos observados no espectro de RMN do bagaço deslignificado, foi também observado nos bagaços *in natura* e pré-tratados QTM. No entanto, os sinais de xilana acetilada (**X'₁**, **X'₂**, **X'₃**) foram desaparecendo gradualmente em função do aumento das cargas de reagentes utilizadas no pré-tratamento QTM, confirmando que os grupos acetil ligados à hemicelulose foram hidrolisados e removidos durante o pré-tratamento QTM com sulfito e álcali. A remoção dos grupos acetil reduz a solubilidade da hemicelulose, favorecendo a precipitação e consequentemente a sua retenção na fibra (KONN; PRANOVICH; HOLMBOM, 2006).

Os sinais da lignina foram também observados nos espectros RMN nas diferentes amostras dos bagaços. A maior ligação inter-unidades observadas foi a β -O-4' de alquil-aril éteres (**A**). Também foram detectados sinais intensos no intervalo δ_C/δ_H 62.7/3.83–4.30 (parcialmente sobreposto com os sinais de carboidratos) dos C γ /H γ correlacionados com unidades γ -aciladas (**A'**), sendo mais evidente no bagaço *in natura*, revelando que ligninas do bagaço de cana-de-açúcar são amplamente aciladas na posição γ -OH da cadeia lateral da lignina, principalmente com *p*-coumaratos. Esta informação está de acordo com o publicado por del Río et. al (2015). Outro sinal nesta região do espectro corresponde às correlações C γ /H γ dos grupos terminais de álcool cinâmico (**I**).

Os principais sinais cruzados na região aromática do espectro RMN corresponderam às diferentes unidades de lignina e aos ácidos hidroxicinâmicos, ferúlico (**FA**) e *p*-coumárico (**PCA**). Sinais das unidades guaiacil (**G**) e siringil (**S**) foram observadas no espectro de ligninas alcalinas, sendo a relação S/G similar em todas as amostras, com valores de ~1,1.

Os ácidos hidroxicinâmicos foram encontrados em quantidades importantes nos bagaços *in natura* e pré-tratados. No entanto, a intensidade dos sinais de ácido ferúlico (**FA**) diminuiu gradualmente a medida que a carga de sulfito alcalino aumentou, estando

completamente ausente no bagaço pré-tratado QTM10% (Figura 16D). A diminuição da intensidade dos sinais RMN-2D HSQC, em função do aumento das cargas de sulfito, também foi observado para ácido PCA, no entanto, quantidades significativas de PCA ainda permanecem mesmo na maior concentração de sulfito alcalino (Figura 16D). Os dados dos espectros RMN-2D HSQC obtidos para FA e PCA estão de acordo com a dosagem de ácidos hidroxicinâmicos por HPLC (Tabela 4). É descrito para gramíneas que o PCA se encontra presente na forma de éster e acilando o γ -OH da cadeia lateral da lignina (RALPH, 2010, Del RÍO et al., 2015). Os espectros HSQC das amostras revelam que PCA se apresenta na forma de éster em todas as amostras de bagaço, incluindo as amostras de bagaço pré-tratado, como indica o sinal característico da correlação C_β/H_β em δ_C/δ_H 113.5/6.27. O resto das correlações dos sinais observados no espectro são também característicos do PCA acilando o carbono γ -OH da cadeia lateral da lignina (Del RÍO et al., 2015; POELKIN et al., 2015).

Os espectros RMN do bagaço tratado com clorito ácido por 2 horas (D2) estão de acordo com os resultados de caracterização química de ácidos hidroxicinâmicos (Tabela 4), comprovando a remoção destes ácidos através do mecanismo oxidativo de deslignificação com clorito.

O grau de substituição da xilana foi determinado nos bagaços *in natura* e pré-tratados, pelas relações molares entre a xilose e os substituintes arabinosil, ácidos urônicos e acetil (Tabela 6). Os dados do bagaço *in natura* mostram que o grupo acetil é o maior substituinte da hemicelulose, e que depois do pré-tratamento este componente foi quase totalmente removido. Por outro lado, a relação xilose:arabinose da hemicelulose do bagaço *in natura* foi similar à dos bagaços pré-tratados, enquanto a substituição das hemicelulose com os ácidos glucurônicos apresentou uma pequena diminuição. Este padrão de desacetilação e de desramificação da hemicelulose pelo pré-tratamento sulfito alcalino está de acordo com o reportado por Mesquita et al., (2015). Após os pré-tratamentos as GAX ficam menos substituídas, podendo se associar mais à celulose (KÖHNKE et al., 2011; WANG et al., 2016). Por outro lado, hemiceluloses menos ramificadas, são mais facilmente hidrolisadas por endoxilanases (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012, EBRINGEROVÁ e HEINZE 2000). Varnai et al. (2014), mostraram que o tratamento da medula de cana-de-açúcar com a enzima acetil esterase aumentou a hidrólise dos polissacarídeos. Essa melhoria foi atribuída à remoção enzimática dos grupos acetil das hemiceluloses.

Tabela 6: Relações molares entre os diferentes componentes da GAX dos bagaços utilizados.

Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Relações molares entre os componentes da GAX dos diferentes bagaços		
	xil/ara	xil/ac. Urônicos	xil/acetil
Não tratado	10,6	8,1	2,0
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH	11,9	8,2	7,1
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH	9,6	9,2	-
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH	10,6	9,4	-
Bagaço delignificado por 2 horas com clorito ácido	7,7	9,1	-
Bagaço delignificado por 4 horas com clorito ácido	9,2	7,2	-

Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.2 Retenção de água, grupos ácidos e celulose superficial acessível do bagaço de cana-de-açúcar

Os materiais lignocelulósicos podem reter água naturalmente devido a capacidade de interação desta molécula com os grupos hidroxila expostos dentro da parede celular (IWAMOTO; ABE; YANO, 2008). Durante o pré-tratamento sulfito alcalino ocorre a introdução de íons sulfito na lignina promovendo a sua despolimerização e remoção parcial. A remoção da lignina pode expor grupos hidroxila da celulose e hemicelulose, aumentando a retenção de água. Além disso, parte da lignina residual permanece sulfonada o que contribui para o aumento da sua hidrofilicidade e inchamento das fibras (DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011). Estas características físico-químicas contribuem na diminuição da recalcitrância dos materiais pré-tratados (MENDES et. al., 2011).

A tabela 7 mostra que todos os materiais pré-tratados apresentaram valores de WRV maiores que o material *in natura*, sendo este resultado esperado devido ao menor conteúdo de lignina dos materiais após pré-tratamento. Nas amostras pré-tratadas com clorito, o valor de retenção de água foi maior para o bagaço tratado por 4 horas, evidenciando a relação

inversa entre retenção de água e teor de lignina. Por outro lado, os materiais pré-tratados QMT com diferentes cargas sulfito alcalino mostraram poucas diferenças entre si. Mendes et al. (2013) avaliaram o efeito do tempo do pré-tratamento QTM nas características do bagaço e verificaram uma contínua incorporação de íons sulfito, registrada até 120 minutos. Apesar da contínua incorporação de íons sulfito, valores máximos de WRV de 200% foram observados em 60 minutos de pré-tratamento. Como no presente estudo o tempo de pré-tratamento QTM foi 120 minutos, o WRV encontrado para todas as amostras foi da ordem de 200%, conforme determinado por Mendes et al. (2013).

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de grupos ácidos fracos e fortes das amostras. Os ácidos fracos correspondem aos grupos carboxílicos presentes nas frações polissacarídicas e na lignina das amostras, e os ácidos fortes correspondem aos grupos sulfônicos introduzidos na lignina, como consequência do pré-tratamento QTM (KATZ; BATSON; SCALLON, 1984). Os grupos ácidos foram quantificados no bagaço pré-tratado QTM, e reportados em função da massa do bagaço e do conteúdo de lignina. Os grupos ácidos fortes não aumentaram em função da carga de reagentes, quando analisados em relação à massa de bagaço. Isto se explica pelo teor de lignina presente nos bagaços pré-tratados com as menores cargas. Quando reportados em relação à lignina, o conteúdo de ácidos fortes aumentou em função da carga de reagentes usados no pré-tratamento, mostrando que o pré-tratamento sulfito alcalino foi efetivo em remover a lignina e sulfoná-la, sendo observada uma alta correlação ($R^2=0,96$) entre estes dois parâmetros (Figura 17).

Siqueira et al. (2017) observaram valores inferiores de grupos ácidos fortes para o bagaço QTM10% (218,0 mmol/kg de lignina versus 346,78 mmol/kg no presente estudo). Esta discrepância pode ser devida a diferenças no processamento dos bagaços, considerando que a retirada da etapa de lavagem permite ao material pré-tratado reter uma maior quantidade de grupos sulfônicos.

A remoção de lignina e introdução de íons sulfito nos bagaços produzem substratos menos recalcitrantes, e poderão refletir numa maior hidrólise enzimática da hemicelulose, como ocorre para a celulose (BENDZALOVA et al., 1996; KONN; HOLBOM; NICTULL, 2002; REHBEIN et al., 2010; DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; MENDES et al., 2011; 2013).

A área superficial acessível de celulose dos bagaços pré-tratados foi analisada e os dados obtidos indicam que o aumento da carga de reagentes favorece a acessibilidade das

frações polissacarídicas (Tabela 8). A técnica de coloração de Simons (CS) possibilitou esta análise, a partir das diferenças de afinidade dos corantes Laranja (DO) e azul (DB) com a celulose. O corante DO apresenta uma maior afinidade pela celulose e um raio hidrodinâmico similar as celulasas, quando comparado com DB. Devido ao menor tamanho, o DB se liga em regiões da celulose que o corante DO não consegue acessar (YU; MINOR; ATALLA, 1995). Arantes e Saddler (2011) reportaram que medindo a razão entre a quantidade dos corantes adsorvidos (DO/DB) é possível inferir sobre a celulose superficial acessível nos substratos analisados por CS.

Tabela 7: Grupos ácidos e retenção de água dos diferentes bagaços.

Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Grupo ácido forte		Grupo ácido fraco		Grupos ácidos totais		WRV (%) Retenção de água
	mmol/ Kg bagaço	mmol/ Kg lignina	mmol/ Kg bagaço	mmol/ Kg lignina	mmol/ Kg bagaço	mmol/ Kg lignina	
Não tratado	0,01±0,00	32,41±0,37	0,02±0,00	79,18±12,09	111,59±12,46	0,02±0,00	133,73±5,72
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH	38,78±0,22	180,67±0,56	34,33±02,87	154,43±12,83	335,10±13,12	72,49±2,76	244,11±6,47
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH	58,42±3,19	276,47±15,11	81,93±7,74	387,76±36,63	664,22±26,94	140,35±5,69	240,87±6,90
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH	43,73±0,14	346,78±1,11	49,74±21,43	462,34±22,83	809,12±22,34	93,47±21,47	196,19±4,22
Bagaço delignificado por 2 horas com clorito ácido	-	-	-	-	-	-	171,36±3,93
Bagaço delignificado por 4 horas com clorito ácido	-	-	-	-	-	-	184,03±2,32

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17: Correlação entre a remoção da lignina e a introdução de íons sulfito após pré-tratamento QTM. (2,5% Na_2SO_3 + 1,25% NaOH : $\blacksquare$; 5% Na_2SO_3 + 2,5% NaOH : $\blacktriangle$; 10% Na_2SO_3 + 5% NaOH : $\star$)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 8: Adsorção dos corantes laranja (Direct Orange, DO), azul (Direct blue, DB) e a relação deles (DO/DB), no bagaço *in natura* e pré-tratados.

Pre-tratamento (g/100g de bagaço)	Adsorção ao material (mg corante/g de bagaço)		
	Direct Orange (DO)	Direct Blue (DB)	DO/DB
Não tratado	27,36	27,87	0,98
2,5% Na ₂ SO ₃ 1,25% NaOH	24,48	22,84	1,07
5% Na ₂ SO ₃ 2,5% NaOH	26,16	21,41	1,22
10% Na ₂ SO ₃ 5% NaOH	32,89	21,31	1,54
Delignificação por 2 horas com clorito ácido	31,53	25,07	1,26

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se na tabela 8 que a relação DO/DB no bagaço *in natura* foi 0,98 enquanto nos bagaços pré-tratados foi maior que 1, sugerindo uma maior proporção de celulose acessível as celulases após pré-tratamentos. É reportado que o pré-tratamento QTM com sulfito e álcali e deslignificado com clorito ácido aumentam o acesso à celulose (MENDES et al., 2011; Siqueira et al., 2011, 2013). Os resultados obtidos confirmam estas observações e mostram que este acesso é por aumento de acesso a celulose de moléculas de tamanho maior ou igual ao das celulases, evidenciado pelo aumento na relação DO/DB.

No pré-tratamento QTM com sulfito e álcali, se observa que a relação DO/DB aumenta em função da carga de reagentes. Laurito-Friend et al (2013) observaram que quando o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado nas mesmas condições deste estudo utilizando as cargas alta (QTM10%) e média (QTM5%) de reagentes, a sacarificação da celulose e xilana foi maior para o bagaço QTM10%, validando a previsão de acessibilidade enzimática dada pela relação DO/DB. Siqueira et al. (2017) analisaram a área superficial acessível de celulose do bagaço de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos, observando um valor de DO/DB 1,14 para o bagaço QTM10%. Esse valor foi menor que o obtido neste estudo, diferença atribuída à retirada da etapa de lavagem do pré-tratamento.

Independente das diferenças no valor de CS observados nos dois estudos, observou-se que o aumento da relação DO/DB concorda com os resultados de WRV e grupos ácidos das amostras. Outros trabalhos utilizando a CS descrevem vários fatores que podem afetar os valores de DO/DB, e sugerem que os resultados devem ser analisados no conjunto das amostras e preferencialmente acompanhados de outras análises (ARANTES e SADDLER, 2011).

Por outro lado, o bagaço D2 apresentou valores menores de relação DO/DB quando comparado com o bagaço pré-tratado QTM com a maior carga de sulfito. Embora este resultado parece ser contraditório quando comparados os teores de lignina de ambos os bagaços, é importante evidenciar que a deslignificação por 2 horas não alterou o teor de hemicelulose na amostra, sugerindo que a menor relação DO/DB no bagaço deslignificado possa ser devido ao impedimento físico da hemicelulose à celulose, estando de acordo com os resultados observados para a retenção de água (WRV).

5.2 Extração enzimática da xilana dos bagaços pré-tratados.

A extração das xilanas dos bagaços pré-tratados com licor sulfito alcalino (QTM) e clorito (D), foi avaliada em reações empregando xilanases comerciais bacterianas (Luminase e EDT) e do fungo *T. lanuginosus* (SIGMA). A compilação das atividades de xilanase presentes nos preparados enzimáticos em questão se mostra na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade de xilanases em pH 8,0 e proteínas dos extratos comerciais

Enzima	Fabricante	Micro-organismo	Atividade xilanase (UI/ml)	Proteínas (mg/ml)	Atividade específica (UI/mg)
Xilanase	Sigma Aldrich	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	16,58	0,03	5266,6
Luminase	BASF	<i>Bacillus spp</i>	8719,13	90,04	96,8
EDT-bioleaching	EDT	<i>Bacillus spp</i>	11697,62	108,96	107,4

Fonte: Arquivo pessoal.

A xilanase presente nesses preparados pertence à família 11. Uma característica desta família de xilanases é sua baixa massa molar (20 a 30 kDa) e seu alto ponto isoelétrico, motivos pelos quais são aplicadas na hidrólise de xilanas que se encontram associadas a outros polímeros, como em polpas celulósicas (WALIA et al., 2017). Além disso, tais xilanase apresentam atividade em meio alcalino, possibilitando sua aplicação em processos de branqueamento de polpas (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; WALIA et al., 2017). Não foi detectada a atividade de β -xilosidase nas três preparações enzimáticas.

As enzimas foram utilizadas na extração de xilana dos bagaços pré-tratados em uma atividade correspondente a 20 UI de xilanase por grama de bagaço. Quando analisados os produtos da reação, não foram detectados açúcares monoméricos. Este resultado reforça as informações dos fabricantes de que os preparados não possuem atividades de β -xilosidase; β -glicosidase e α -arabinofuranosidase. A figura 18 mostra os resultados de extração de xilana com os 3 preparados enzimáticos nos diferentes bagaços pré-tratados. Estes dados foram obtidos a partir da análise por HPLC dos sobrenadantes, depois que os oligômeros ali presentes foram monomerizados em meio ácido.

Figura 18: Extração enzimática de xilanas dos bagaços pré-tratados com 20 UI/g de bagaço de xilanas de *Thermomyces lanuginosus* (○); EDT (Δ); Luminase (□), foram aplicadas nos bagaços pré-tratados com clorito ácido por: (—) 2 horas e (—) 4 horas (A); e bagaços pré-tratados com sulfito alcalino: (—) Sulfito 2,5% e 1,25% de NaOH; (—) Sulfito 5% e 2,5% de NaOH; (—) Sulfito 10% e 5% de NaOH (B).

Fonte: Arquivo pessoal

Se observa na figura 18A, que o bagaço deslignificado por 4 horas (D4) apresentou uma maior extração de xilana quando comparado com o tratado por 2 horas (D2). Os rendimentos de extração, obtidos após 24 horas, no bagaço D4 foram similares para os preparados Luminase e EDT, 55% e 54% respectivamente, enquanto que o preparado de *T. lanuginosus* apresentou um rendimento de extração de 36%. Para o bagaço D2 foram obtidos rendimentos de 34%, 37% e 20%, para Luminase, EDT, e *T. lanuginosus*, respectivamente.

De forma geral, a porcentagem de extração do substituinte arabinosil foi similar à da xilana. A extração do substituinte arabinosil do bagaço D4 foram 55%, 52% e 38% para as enzimas Luminase, EDT e *T. lanuginosus*, respectivamente, após 24 horas. No bagaço D2 os rendimentos de extração foram de 27%, 32% e 18% para as enzimas Luminase, EDT e *T. lanuginosus*, respectivamente.

A hidrólise da celulose também foi monitorada, avaliando a glicose presente no sobrenadante das amostras após hidrólise ácida. Os 3 preparados enzimáticos exibiram valores de extração inferiores a 0,4% e 0,2% para os bagaço D4 e D2 respectivamente. Foram feitos controles incubando o substrato no tampão sem adicionar enzima, observando-se valores de extrações de 0,4% e 0,2% para glucana, 15% e 7% para xilana e 1,5% e 0,3% para

arabinosil, para os bagaços D4 e D2, respectivamente. Ao comparar os resultados dos controles com as extrações enzimáticas, se observa que os 3 preparados enzimáticos não agem na celulose dos bagaços deslignificados com clorito ácido; e que parte da xilana e do substituinte arabinosil são extraíveis nas condições levemente alcalinas do ensaio (pH=8). É reportado que as hemiceluloses são facilmente hidrolisáveis em meio levemente ácido (PENG et al., 2012), pelo que o processo de deslignificação com clorito ácido pode quebrar ligações da hemicelulose, diminuindo seu tamanho e favorecendo sua solubilização.

Se observa na figura 18B, que para o pré-tratamento QTM com sulfito e álcali os rendimentos de extração de xilana aumentam em função da carga de reagentes do pré-tratamento, independentemente da enzima usada. No bagaço QTM 2,5% foram observados valores de extração de xilana próximos a 4% para os 3 preparados enzimáticos testados, após 24 horas. Em comparação, o rendimento de extração de xilana do bagaço QTM5% aumentou para 7%. O bagaço pré-tratado QTM10% apresentou rendimentos de extração de 32%, 29% e 25% para os preparados Luminase, EDT e *T. lanuginosus*, respectivamente.

Similar ao observado para os bagaços deslignificados, o substituinte arabinosil foi extraído em valores próximos aos observados para xilana. No bagaço pré-tratado QTM2,5% observou-se extrações próximas de 3% com os preparados Luminase, EDT e de 2% para *T. lanuginosus*, após 24 horas. O bagaço pré-tratado QTM5% mostrou extrações para o substituinte arabinosil de 6% com o preparado Luminase, e próximo a 4% com EDT e *T. lanuginosus*. A extração da arabinose dos bagaços pré-tratados QTM10% foi de 38%, 35% e 32% com os preparados Luminase, EDT e *T. lanuginosus*, respectivamente. Por outro lado, os 3 preparados enzimáticos extraíram glucana em valores inferiores a 0,7%, 0,5% e 0,4% para os bagaços pré-tratados QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente.

Os controles realizados evidenciaram valores de extração de glucana de 0,4%, 0,2% e 0,4% para os bagaços pré-tratados QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. Em relação à xilana, foram observadas extrações de 2,4%, 4% e 7% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. O substituinte arabinosil foi extraído em 0,1%, 0,3% e 1% para os bagaços QTM2,5%, QTM5% e QTM10%, respectivamente. Embora o resultado dos controles de extração de glucana tenham sido menores aos observados nas extrações enzimáticas, os valores obtidos podem ser atribuídos a oligossacarídeos no material pré-tratado devido a retirada da etapa de lavagem. Como relatado anteriormente, o pré-tratamento QTM com sulfito e álcali pode hidrolisar hemiceluloses de baixa massa molar e celulose amorfa (MENDES et al., 2011). Os resultados dos controles mostram que parte

das hemiceluloses dos bagaços pré-tratados QTM são extraíveis em condições levemente alcalinas, sugerindo que a retirada da etapa de lavagem extensiva permite um melhor aproveitamento das hemiceluloses.

Os resultados obtidos com as diferentes enzimas e bagaços, mostram que a xilanase de *T. lanuginosus* foi menos eficiente na extração de xilana quando comparada aos preparados Luminase e EDT, e que a extração enzimática da xilana foi maior nos substratos com menor teor de lignina. Esse efeito pode ser melhor visualizado no gráfico relacionando a lignina removida após pré-tratamento e os rendimentos de extração enzimática de xilana obtidos em cada pré-tratamento (Figura 19).

Figura 19: Correlação entre a lignina removida e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços QTM pré-tratados com: 2,5% Na₂SO₃ + 1,25% NaOH (■); 5% Na₂SO₃ + 2,5% NaOH (▲); 10% Na₂SO₃ + 5% NaOH (★); e deslignificados com clorito ácido por 2 (⊕) e 4 horas (○).

Fonte: Arquivo pessoal

Na figura 19 observa-se que a correlação entre a lignina removida após pré-tratamento e a extração de xilana independe da enzima utilizada. A barreira física imposta pela lignina para acessar os carboidratos tem sido amplamente discutida na literatura (ZHU et al., 2009; GÍRIO et al., 2010; 2011; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010), sendo também reportado este efeito para o pré-tratamento QTM com sulfito e álcali (MENDES et al., 2011; 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2013).

A literatura mostra que além da lignina, os ácidos hidroxicinâmicos também contribuem para a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos (SIQUEIRA et al., 2011).

Durante os pré-tatamentos realizados no presente estudo foi observada a remoção conjunta da lignina e ácidos hidroxicinâmicos, desse modo também foram analisadas as remoções dos ácidos hidroxicinâmicos e o efeito nos rendimentos de extração enzimática da xilana (Figura 20).

Figura 20: Correlação entre os ácidos hidroxicinâmicos removidos e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços QTM pré-tratados com: 2,5% Na_2SO_3 + 1,25% NaOH (□); 5% Na_2SO_3 + 2,5% NaOH (▲); 10% Na_2SO_3 + 5% NaOH (★); e deslignificados com clorito ácido por 2 (⊕) e 4 horas (○).

Fonte: Arquivo pessoal

Se observa na figura 19, que existe uma alta correlação entre a remoção dos ácidos hidroxicinâmicos e a extração da xilana, independente do preparado enzimático utilizado. Verifica-se maiores correlações entre o ácido ferúlico removido após pré-tratamento e a

extração de xilana. Isto pode ser explicado porque o ácido ferúlico, diferente do ácido *p*-coumárico, foi removido em parte pela carga mais baixa de sulfito e álcali, e em sua totalidade pela maior carga.

Os diferentes valores de R^2 observados para os diferentes preparados enzimáticos, tanto na lignina (Figura 19) como nos ácidos hidrocínâmicos (Figura 20) removidos, podem estar associados às características bioquímicas de cada enzima (ponto isoelétrico, temperatura e pH ótimo de atuação, etc.).

Embora os resultados até aqui apresentados mostrem que a lignina e os ácidos hidroxicinâmicos representam um impedimento à extração enzimática de xilana, se observa que amostras com conteúdo similar de lignina apresentam diferenças nos valores de extração. Por exemplo, o bagaço pré-tratado QTM10% e o bagaço D2 apresentaram teores de lignina de aproximadamente 11% e 10 %, respectivamente (Tabela 2), porém os rendimentos de xilana extraída enzimaticamente foram um pouco diferentes: Luminase 32% e 34%, EDT 29% e 37% e *T. lanuginosus* 25% e 20% para o bagaço pré-tratado QTM10% e para o bagaço D2, respectivamente. Por outra parte, quando se comparam as amostras obtidas com carga media e baixa de sulfito alcalino, se observa que apesar da amostra pré-tratada QTM5% apresentar 13% menos de lignina que a pré-tratada QTM2,5%, a hidrólise da xilana aumentou 3 pontos percentuais com Luminase (de 4,0% para 7,0%) ou EDT (de 3,7% para 6,8%) e apenas 1,7% com *T. lanuginosus* (de 3,9% para 5,6%). Siqueira et al., (2013) mostraram que para obter valores de conversão da celulose de 80% é necessário remover 50% da lignina, sugerindo que o conteúdo de lignina dos bagaços QTM2,5% e 5% ainda é alto para conseguir acessar à xilana. No entanto, não explica o observado para o bagaço pré-tratado QTM10% e o bagaço D2 (48% e 55% de remoção de lignina, respectivamente); sugerindo que outros fatores que limitam a extração da xilana além da lignina.

Os valores de área superficial acessível da celulose (DO/DB) foram de 1,54 e 1,26 para o bagaço QTM10% e o bagaço D2, respectivamente. É possível explicar as diferenças entre estes resultados pelos teores de hemicelulose e modificações que os dois pré-tratamentos produzem no bagaço. Todos esses dados em conjunto podem justificar as diferenças obtidas na extração enzimática da xilana. A partir desta observação foi construído um gráfico relacionando a área superficial acessível da celulose (relação DO/DB) com a extração de xilana apenas para o bagaço pré-tratado QTM com sulfito e álcali (Figura 21).

Figura 21: Correlação entre a área superficial acessível da celulose (DO/DB) e os rendimentos de extração enzimática de xilana de bagaços CTM pré-tratados com: 2,5% Na₂SO₃ + 1,25% NaOH (□); 5% Na₂SO₃ + 2,5% NaOH (▲); 10% Na₂SO₃ + 5% NaOH.

Fonte: Arquivo pessoal

A figura 20 mostra altas correlações para a extração de xilana e os valores DO/DB. De forma interessante se observa que os valores de R^2 foram similares para os 3 preparados enzimáticos. Este resultado sugere que as modificações acarretadas pelo pré-tratamento QTM com sulfito alcalino afetam de maneira similar a extração de xilana pelos tres preparados enzimáticos.

Para identificar alguns dos produtos extraídos enzimaticamente dos bagaços pré-tratados, foi feita uma cromatografia (TLC) com os sobrenadantes das amostras após 24 horas de reação (Figura 22).

A figura 22 mostra a presença de xilo-oligossacarídeos, principalmente nas amostras dos bagaços que foram pré-tratados QTM10% e com clorito ácido. Não se observa a presença de açúcares monoméricos nas amostras resultado compatível com as análises dos sobrenadantes no HPLC. Esse resultado é mais uma evidencia da ausência de β -xilosidase, β -glicosidase e α -arabinofuranosidase nos extratos enzimáticos. A amostra controle do pré-tratamento QTM10% apresentou manchas fracas na TLC referentes a oligômeros, enquanto nos controles dos bagaços tratados com clorito não se observam manchas. Estas diferenças podem ser atribuídas à lavagem do bagaço depois do pré-tratamento com clorito, que não

ocorreu no bagaço submetido ao pré-tratamento QTM com sulfito e álcali. Assim, esses fragmentos de xilana podem ser detectados no experimento controle.

Figura 22: Produtos solúveis dos bagaços pré-tratados e extraídos, analisados por cromatografia em camada delgada (TLC).

Fonte: Arquivo pessoal

A partir dos resultados de extração de xilana usando os 3 preparados enzimáticos comerciais e diferentes bagaços pré-tratados, foi possível escolher a Luminase para continuar os estudos. O bagaço pré-tratado QTM2,5% foi deixado de lado, devido à alta recalcitrância apresentada. Entre os bagaços pré-tratados com clorito, o bagaço pré-tratado D4 foi usado como modelo com teor reduzido de lignina e sem ácidos hidroxinâmicos para elucidar o efeito da lignina na extração enzimática de hemicelulose.

5.2.1 Extração enzimática da xilana dos bagaços pré-tratados empregando diferentes cargas de xilanase

Para determinar se a atividade de xilanase (20 UI/g de bagaço) utilizada no experimento anterior foi suficiente para extrair toda a xilana acessível dos bagaços pré-tratados, foram feitos experimentos variando as cargas de xilanase (Luminase) entre 5UI - 100UI por grama de bagaço. As extrações foram realizadas no bagaço pré-tratado QTM com a concentração média de licor sulfito alcalino (QTM5%), com alta concentração de licor sulfito alcalino (QTM10%), e com o bagaço deslignificado com clorito ácido por 4 horas (D4).

Figura 23: Rendimento de extração enzimática de xilana utilizando diferentes cargas de xilanases (Luminase). **A:** Substrato pré-tratado QTM com 5% Na₂SO₃ + 2,5% NaOH. **B:** Substrato pré-tratado QTM com 10% Na₂SO₃ + 5% NaOH. (—●—) 5 UI; (—■—) 20 UI; (—▲—) 40 UI; (—◆—) 60 UI; (—●—) 100 UI por grama de bagaço, respectivamente.

Fonte: Arquivo pessoal

A figura 23A mostra que o rendimento de xilana extraída do bagaço pré-tratado QTM5% foi baixo, não sendo possível aumentar significativamente a extração mesmo usando altas cargas de enzima. Os dados mostram que para as cargas enzimáticas de 5UI, 20UI e 40UI por grama de bagaço, os rendimentos obtidos após 24 horas de reação foram 9,7%; 9,4%; 9,7% respectivamente, ou seja, mesmo aumentando 8 vezes a carga enzimática não foi possível aumentar a eficiência da extração enzimática. No entanto, quando as cargas de xilanase foram aumentadas para 60 UI e 100 UI por grama de bagaço, o rendimento de

extração aumentou para 11,7% e 14%, respectivamente. Estes valores correspondem a um incremento de 17% e 31% de rendimento de xilana, quando a carga enzimática foi aumentada em 12 e 20 vezes, respectivamente. Para o bagaço pré-tratado QTM10% (Figura 23B) observou-se um maior efeito do aumento das cargas enzimáticas e uma maior extração da xilana em comparação com o substrato pré-tratado QTM5%. Os valores de extração de xilana obtidos para as cargas de 5 UI, 20 UI, 40 UI, 60 UI e 100 UI de enzima por grama de bagaço foram de 31,3%, 35,8%, 36,8%, 40,7% e 44,1%, respectivamente, após 24 horas. Em outras palavras, um aumento de 4 (20 UI), 8 (40 UI), 12 (60 UI) e 20 (100 UI) vezes em relação à menor carga enzimática usada (5 UI), produziu os respectivos aumentos nos rendimentos de extração de 12,6%, 14,9%, 23,1% e 29,0%. Os dados evidenciam que os valores de extração de xilana obtidos não foram proporcionais ao incremento das cargas enzimáticas, sugerindo que a extração não foi limitada apenas pela falta de enzima.

A extração enzimática da xilana nos bagaços pré-tratados QTM5% e QTM 10% mostra que em todas as cargas enzimáticas usadas, após 8 horas a velocidade de reação diminui, sendo mais evidente quando observadas as extrações com as maiores cargas enzimáticas. Esta tendência de alcançar um patamar sugere a existência de um impedimento físico à hidrólise. MENDES et al. (2011), mostraram que a adição de uma dose extra de enzima após 48 horas de reação, quando a conversão estava no patamar, não produziu um aumento na conversão de celulose ou hemicelulose do bagaço pré-tratado QTM com sulfito alcalino, sugerindo que a diminuição na taxa de conversão é principalmente devido a mudanças na composição do substrato e ao enriquecimento em lignina. A interação inespecífica lignina-enzima (adsorção improdutiva) também contribui na redução na velocidade e eficiência de conversão durante a sacarificação de substratos lignocelulósicos (BERLIN et al., 2006).

Os rendimentos de xilana em 24 horas de extração com a menor carga enzimática (5UI/g de bagaço) no bagaço QTM10% foi 55% maior que o obtido com a maior carga (100UI/g bagaço) no bagaço QTM5% (Figura 17). Embora os bagaços QTM5% e QTM10% apresentem teores similares de hemicelulose, o aumento da severidade do pré-tratamento promoveu uma maior sulfonação e remoção da lignina e ácidos hidroxicinâmicos, aumentando a área superficial acessível da celulose, o que pode ter aumentado a acessibilidade das xilanases na xilana residual. Similarmente os efeitos destas características físico-químicas na sacarificação de materiais lignocelulósicos pré-tratados tem sido amplamente relatado (ZHU et al., 2009; GÍRIO et al., 2010; VÁRNAI; SIIKA-AHO;

VIKARI, 2010; DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; MENDES et al., 2011; 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2013).

As xilanas do bagaço pré-tratado com clorito por 4 horas (D4) foram hidrolisadas com as cargas de 5UI e 60 UI/g de bagaço. Vale a pena lembrar que este substrato não possui ácidos hidroxicinâmicos e tem a metade do teor de lignina que o bagaço pré-tratado QTM10%.

A figura 24 mostra que os perfis de hidrólise do bagaço D4 foram similares aos obtidos nos substratos preparados pelo processo sulfito alcalino, mas foi observada uma queda na velocidade de reação após 4 horas. Em 24 horas de extração, os rendimentos dos ensaios com as cargas enzimáticas de 5UI e 60 UI foram de 47% e 60%, respectivamente. O aumento de 12 vezes na carga enzimática aumentou em 21,6% a extração das xilanas. Similar ao observado para os bagaços pré-tratados QTM com sulfito alcalino, o aumento da eficiência de extração da hemicelulose não foi proporcional ao aumento das cargas de xilanase.

Figura 24: Rendimento de extração enzimática de xilana com (—●—) 5 UI e (—●—) 60 UI por grama de bagaço de xilanas (Luminase) no substrato deslignificado por 4 horas com clorito ácido.

Fonte: Arquivo pessoal

Apesar do baixo teor de lignina e ausência de ácidos hidroxicinâmicos no substrato D4, existem outros impedimentos à hidrólise da hemicelulose. Neste sentido, é reportado por Hu; Arantes e Saddler (2011) que a despolimerização da celulose por ação das celulasas

poderia expor cadeias de hemicelulose que estão naturalmente presas dentro ou entre as microfibrilas de celulose. Este fenômeno já tinha sido relatado por Pauly et al. (1999), que identificaram uma fração da hemicelulose que só pode ser acessada depois de hidrolisar o material com celulasas. Estes indícios suportam a existência de uma fração hemicelulósica entre as fibrilas de celulose ou em estreita interação. Apesar dos materiais testados terem sido pré-tratados, os resultados sugerem que os pré-tratamentos não têm a capacidade de alterar a organização da fração celulósica o suficiente para liberar todas as hemiceluloses.

5.2.2 Fenóis solubilizados dos materiais tratados com xilanase

Para determinar se as xilanases conseguem solubilizar frações de lignina junto com xilana desde os materiais pré-tratados QTM com sulfito alcalino, foram analisadas amostras de xilanas extraídas dos bagaços pré-tratados QTM5% e QTM10%. Estas amostras corresponderam aos tempos de extração de 4, 6, 8 e 24 horas, usando as cargas enzimáticas de 20UI, 40UI e 60UI por grama de bagaço. Algumas xilanases podem clivar as xilanas em pontos específicos e liberar compostos fenólicos derivados da lignina (HU; ARANTES; SADDLER, 2011), como por exemplo ácidos hidroxicinâmicos esterificados à xilana. Vale a pena lembrar que comparados ao bagaço *in natura*, os bagaços pré-tratados QTM5% e QTM10% preservam 81% e 40% do ácido ferúlico, e 70% e 47% do ácido *p*-coumárico, respectivamente (Tabela 4). Portanto, estes ácidos hidroxicinâmicos poderiam ser liberados no decorrer da hidrólise enzimática, como mostra a figura 25.

Figura 25: Compostos fenólicos liberados durante a extração de arabinoxilana do bagaço pré-tratado pelo processo sulfito alcalino usando diferentes cargas do preparado enzimático Luminase. **A:** Bagaço pré-tratado com 5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH. **B:** Bagaço pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH. (■) Controle sem enzima; (■) 20 UI (■) 40 UI; (■) 60 UI por grama de bagaço, respectivamente.

Fonte: Arquivo pessoal

A figura 25A mostra que aparentemente nos controles da extração enzimática do bagaço pré-tratado QTM5% foram solubilizados mais fenóis que nos ensaios em que se adicionou a xilanase. Os resultados das análises estatísticas em um intervalo de 95% de confiança mostram diferenças significativas para a carga enzimática de 60 UI quando comparada com as cargas de 20 UI e 40 UI no tempo de 24 horas de extração, porém não

mostra diferenças significativas com o controle. Isto sugere que os fenóis totais determinados no substrato QTM5% são produtos da solubilização de componentes do bagaço pré-tratado, porque o mesmo não foi lavado extensivamente.

A mesma análise de fenóis foi feita para os bagaços pré-tratados QTM10% (Figura 25B). Os resultados de extração de fenóis apenas em tampão (controle), foram estatisticamente diferentes nos tempos de extração de 6 e 24 horas. Estes dados foram sempre menores que o obtido pela reação na presença de xilanase. Os resultados obtidos com as cargas de 20UI e 60UI mostram diferenças significativas para o tempo de 24 quando comparado com os tempos de 4 e 6 horas de extração. Para a carga de 40UI foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando o tempo de 24 horas com 4 horas de extração. O conjunto destes dados mostra que no bagaço QTM10% foram liberados compostos fenólicos associados a xilana em função do tempo de extração, sendo atribuídos a complexos lignina-carboidrato (LCC) (HU; ARANTES; SADDLER, 2011).

5.3 Influência do grau de substituição com arabinose na extração enzimática de arabinoxilana.

O efeito do grau de substituição da arabinose na extração enzimática da xilana foi avaliado em um experimento conduzido com duas extrações sucessivas, usando uma alta carga enzimática de Luminase (100UI por grama de bagaço). A amostragem foi feita coletando resíduo e sobrenadante em diferentes tempos de reação. As amostras foram centrifugadas e o sólido resultante das extrações foi lavado com água, e as xilanas solúveis foram caracterizadas. Similar aos resultados informados anteriormente, não foi detectada a presença de açúcares monoméricos nos sobrenadantes das extrações enzimáticas e nas águas de lavagens dos resíduos sólidos. A composição química das xilanas foi majoritariamente de xilose e arabinose, não sendo detectadas quantidades significativas de glicose (menos de 1%). Os resultados obtidos da primeira extração de xilanas estão apresentados na figura 26.

Figura 26: Primeira extração de arabinoxilana do bagaço pré-tratado QTM10%. (A) Cinética da extração. (B) Relação molar de uma arabinose a cada 10 xiloses (Ara/10 xil). (—●—) controle (sem enzima). (—●—) xilanase (100 U/g bagaço).

Fonte: Arquivo pessoal

A cinética da extração do bagaço pré-tratado QTM10% mostra que a maior parte das arabinoxilanas foram solubilizadas nas primeiras horas de extração (Figura 26A). A extração apenas em tampão (controle), solubilizou 6,9% de xilana nas primeiras 4 horas, observando-se uma tendência a atingir um patamar a partir deste ponto (ver material adicional, tabela S1), alcançando um rendimento de 9,5% após 48 horas de extração. As xilanas extraídas no controle provavelmente correspondem àquelas que foram hidrolisadas inespecificamente

durante o pré-tratamento e, que se redepositaram no bagaço pré-tratado. Esta observação é sustentada pelo maior teor de xilana do bagaço pré-tratado, comparado aos resultados nos quais foram feitas lavagens extensivas do material (MENDES et al., 2011, LAURITO-FRIEND et al., 2013) e também pela rápida solubilização das arabinoxilanas no tampão (73% do total solubilizado em 4 horas de extração), sugerindo que a eliminação das lavagens extensivas após pré-tratamento QTM com sulfito alcalino, possibilita um melhor aproveitamento das hemiceluloses. No ensaio usando xilanase, foram extraídas 39% das xilanas em 8 horas de reação e 47% em 48 horas. A maior extração observada pelo tratamento enzimático se deve à diminuição no grau de polimerização da xilana pela xilanase, o que favorece sua solubilização (MOREIRA e FILHO, 2016).

No decorrer da extração foram calculadas as relações molares (xil/ara) da xilana extraída, a fim de monitorar o grau de substituição com arabinose (Figura 26B). Na arabinoxilana do bagaço pré-tratado QTM10% a relação xil/ara foi de aproximadamente 0,9 resíduos de arabinosil para cada 10 xiloses. A xilana extraída no tampão apresentou uma relação xil/ara de aproximadamente 1,6 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses às 2 horas, não mostrando variações significativas no curso da extração, provavelmente associado à rápida solubilização das xilanas durante as primeiras 4 horas. Por sua vez, a xilana extraída com enzima foi menos substituída que a extraída no tampão e ainda apresentou uma pequena variação no seu grau de substituição no decorrer da extração, começando com uma relação de 1,25 resíduo arabinosil a cada 10 xiloses nas primeiras 2 horas, mudando para 1,1 resíduo arabinosil a cada 10 xiloses nas 48 horas de extração.

Os desvios padrões das relações molares (xil/ara) das arabinoxilanas extraídas na condição controle foram maiores que os observados na condição enzimática, sugerindo um padrão de substituição mais homogêneo nas arabinoxilanas extraídas enzimaticamente (Figura 26B). Dependendo da especificidade e modo de ação da enzima, o grau de polimerização da arabinoxilana é reduzido até um tamanho definido, produzindo arabinoxilanas mais homogêneas (BIELY et al., 2016), quando comparado com as clivadas inespecificamente durante o pré-tratamento e solubilizadas no tampão.

Depois da primeira extração foram feitas lavagens sucessivas do resíduo com água destilada (Figura 27).

Figura 27: Recuperação de arabinosilanas por lavagens com água e relação molar xil/ara. (■) Primeira extração. (■) Primeira lavagem. (■) Segunda lavagem. (■) Terceira lavagem. As linhas sobre os pontos e barras indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal

Se observa que após três lavagens dos resíduos, obtidos após extração da xilana com Luminase ou tampão (controle), foi possível aumentar a extração de arabinosilana em 1,4% e 11,2% para o controle e extração enzimática, respectivamente. Conforme foram realizadas as lavagens, a quantidade de xilanas solúveis em água foi diminuindo conjuntamente com a substituição com arabinose. Observa-se um rendimento de extração em tampão (controle) após 48 horas de 9,5% e relação xil/ara de aproximadamente 6. Os rendimentos baixaram para 1,1% e 0,3%, para a primeira e segunda lavagens respectivamente. Os respectivos graus de substituição destas xilanas foram de 1,25 e 0,45 resíduos de arabinosil para cada 10 xiloses. Na terceira lavagem do resíduo foi detectada só a presença de xilose, correspondente a 0,02% da xilana.

Na presença da enzima o rendimento de extração após 48 horas foi de 46,9% caindo para 6,2%, 3,5% e 1,5% na primeira, segunda e terceira lavagens com água, respectivamente. A substituição com arabinose também diminuiu, mas não nas mesmas magnitudes descritas na extração controle. Após 48 horas, as xilanas extraídas enzimaticamente mostraram 1,1 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses, diminuindo para 1, 0,9 e 0,59 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses na primeira, segunda e terceira lavagens respectivamente.

O aumento da extração por lavagens com água destilada pode ser explicado pelo equilíbrio de fases sólido-líquido, em que ocorre a solubilização em água de xilanas adsorvidas na celulose do bagaço pré-tratado, em função da sua concentração no meio reacional, durante o processo de extração.

O bagaço extraído enzimaticamente e lavado com água foi caracterizado quimicamente antes de se realizar outra extração enzimática (Tabela 10). A principal mudança ocorreu no conteúdo de xilana, que reduziu de 23% no bagaço QTM para 15%.

Na segunda extração do bagaço QTM se observa 14,4% de arabinoxilana no controle e 26,3% com Luminase (Figura 28A). Similar à primeira extração, a maior parte das arabinoxilanas foram extraídas no começo da reação; obtendo 9,4% de xilanas no controle e 13,0% de xilanas na reação por 2 horas com a enzima. A partir deste tempo foi observada uma diminuição na velocidade de reação (Tabela S2). No bagaço QTM10% o grau de substituição da xilana foi de 1 resíduo de arabinosil a cada 10 xiloses e depois de extraída, a xilana remanente foi mais linear. Assim, as xilanas extraídas foram menos substituídas com arabinose quando comparadas com a primeira extração (Figura 28B).

Figura 28: Segunda extração de arabinoxilana do bagaço pré-tratado QTM10% pré-extraído com xilanase (100UI de luminase/g de bagaço). (A) Cinética da extração. (B) Relação molar de uma arabinose a cada 10 xiloses (Ara/10 xil). (—●—) controle (sem enzima). (—●—) xilanase (100 UI/g bagaço).

Fonte: arquivo pessoal

O grau de substituição das xilanas extraídas só com tampão (controle) por 2 horas, foi de 0,59 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses e este valor permaneceu praticamente constante nas xilanas extraídas por até 48 horas. Na reação com Luminase, o grau de

substituição aumentou de 0,53 para 0,55 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses nas primeiras 6 horas, mantendo esta proporção até as 48 horas de extração.

Quando comparadas as xilanas obtidas na primeira e segunda extrações se observa que o controle da segunda extração apresentou porcentagens maiores de extração após 48 horas (9,5% versus 14,4%). A segunda extração foi feita no resíduo que já havia sido hidrolisado com Luminase e submetido a sucessivas lavagens com água. A solubilização de mais xilanas no tampão da segunda extração sugere que só uma parte da arabinoxilana hidrolisada pela enzima durante a primeira extração, foi solubilizada nas lavagens com água. A solubilidade das xilanas em água foi menor em função do seu grau de substituição, resultado que corrobora o reportado por Ebringerová (2006). Este efeito também pode ter favorecido a interação da xilana com a celulose (KÖHNKE et al, 2011). Além disto, Teleman et al. (2001) reportam que a água pode ser incorporada entre as cadeias de xilana próximas, ordenando e estabilizando a sua estrutura. Estes fatos explicam em parte a solubilidade parcial em água das xilanas que haviam sido hidrolisadas pela enzima durante a primeira extração.

A xilana obtida após a terceira lavagem do bagaço extraído uma vez com enzima, apresentou o mesmo grau de substituição da xilana extraída na segunda vez, por 2 horas em tampão (controle). Esta observação sugere que as condições de extração do controle como temperatura, condições levemente alcalinas (pH=8,0) e agitação favorecem a extração da xilana retida no bagaço após hidrólise enzimática, quando comparado com a lavagem com água.

O rendimento de extração das xilanas foi maior na primeira extração (46,9%) que na segunda extração (26,3%). Este resultado se deve a menor quantidade de arabinoxilana disponível no material previamente extraído e submetido a segunda extração (Tabela 10).

Depois da segunda extração das xilanas o sólido resultante foi lavado, seguindo o mesmo procedimento feito após primeira extração. Foi recuperado um pouco mais de xilana após as repetidas lavagens dos materiais, totalizando um aumento de 2,4% para o controle e 4,7% para a amostra que havia sido tratada com enzimas (Figura 29).

Figura 29: Recuperação de arabinoxilanas por lavagens com água e relação molar xil/ara após 48 horas de extração. (■) Segunda extração. (■) Primeira lavagem. (■) Segunda lavagem. (■) Terceira lavagem. As linhas sobre os pontos e barras indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal.

O grau de substituição das xilanas recuperadas na segunda extração foi diminuindo com as lavagens em água, não sendo detectada arabinose já na segunda lavagem das amostras. A substituição com arabinose depois da segunda extração para o controle e a enzima foram de 0,59 e 0,56 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses, respectivamente. Após a primeira lavagem com água o grau de substituição da xilana diminuiu no controle (0,23 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses) e na extração enzimática (0,31 resíduos de arabinosil a cada 10 xiloses).

Além da influência das características físico-químicas do substrato pré-tratado QTM com sulfito e álcali que na extração enzimática da arabinoxilana; os resultados aqui apresentados indicam que primeiro são extraídas as xilanas mais substituídas. Este resultado confirma o que está reportado na literatura sobre os fatores que afetam a solubilidade das xilanas e que consequentemente afetam a sua extração (KÖHNKE et al., 2011; SCHELLER e ULVSKOV, 2010; PAULY et al., 2008; EBRINGEROVÁ, 2006; SUN et al., 2004). Além do grau de substituição das xilanas, a extração depende da temperatura, agitação e alcalinidade do meio reacional (PENG et al., 2012). Não obstante, esses efeitos não foram

avaliados para a extração enzimática de hemiceluloses diretamente do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado QTM com sulfito e álcali.

Os xilo-oligômeros (XOs) com grau de polimerização de 2 a 5 (X2 a X5) obtidos em cada etapa da extração foram analisados por TLC (Figura 30). Não foram observados açúcares monoméricos, após 48 horas de reação e posteriores lavagens com água destilada. No controle da primeira extração se observam manchas entre os padrões de xilotriose (X3) e xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5) tanto no controle como na extração enzimática. Estas diferenças na migração de XOs em relação ao padrão podem ser atribuídas a substituições, podendo corresponder por exemplo a Ara²X3 e Ara²X4, respectivamente. Também se observa uma mancha correspondente a xilobiose (X2) nas xilanas extraídas enzimaticamente. O tamanho desta mancha, assim como sua distribuição espalhada chegando quase até o padrão X3, sugere a presença de X2 com e sem substituições. A extração enzimática também apresentou 2 manchas atribuíveis a XOs maiores que X5, não sendo possível inferir sobre seu tamanho devido à ausência de padrões. Tanto nas amostras do controle como do tratamento enzimático, da primeira extração, se observam manchas no local de aplicação da amostra, sugerindo a presença de xilo-oligômeros maiores ou xilanas que não conseguem migrar na placa de TLC. Nas três lavagens consecutivas com água do material extraído com tampão (controle), não se observam manchas definidas de XOs, sugerindo que as xilanas detectadas nas lavagens correspondem a xilanas que não conseguem migrar na placa de TLC, ou que por sua baixa concentração não são detectáveis por esta técnica. Em contrapartida, nas 3 lavagens do material extraído com a enzima foram detectados XOs, que migraram de forma mais alinhada com os padrões X2, X3 e X4. Esta observação está de acordo com as análises químicas mostradas anteriormente que indicam que durante as lavagens são extraídas xilanas menos substituídas em comparação com a extração enzimática em tampão.

Os perfis de migração dos XOs presentes no sobrenadante da segunda extração do controle e da extração enzimática foram similares, apenas diferente em intensidade como consequência das diferenças de concentração das amostras. É importante ressaltar que na segunda extração foi adicionada uma carga extra de enzima que poderia atuar no resíduo (fase sólida) como nas xilanas que ficaram em equilíbrio com a fase líquida. Os resultados da TLC confirmam que a clivagem da xilana não é randômica; e que, mesmo tendo sido hidrolisado duas vezes consecutivas foram gerados XOs na primeira extração nos quais a endo-xilanase não consegue mais agir (MOREIRA e FILHO, 2016). Nas lavagens com água

se observam tamanhos de XOS similares aos do controle e da amostra tratada enzimaticamente, apresentando migrações mais alinhadas com os padrões, de forma similar ao observado durante as lavagens da primeira extração.

Figura 30: TLC dos açúcares solubilizados durante a extração (48 horas) da arabinoxilana do bagaço pré-tratado e nas lavagens com água destilada. Xos: xilo-oligossacarídeos. X1: Xilose. X2: Xilobiose. X3: Xilotriose. X4: Xilotetraose. X5: Xilopentaose. Buffer: fosfato 50 mM pH 8.0 (Controle).

Fonte: Arquivo pessoal

Os resultados da tabela 10 mostram que a extração de xilana foi conjunta com arabinose, e que os tratamentos enzimáticos removem mais xilana quando comparados com o controle. Depois da primeira extração, se observa ainda uma pequena diminuição no teor de lignina dos resíduos, que pode estar associado à solubilização de componentes redepositados após o pré-tratamento. Por outro lado, após a segunda extração, a concentração de lignina e celulose aumentaram no resíduo, como consequência de uma extração mais seletiva da arabinoxilana.

Tabela 10: Composição química do bagaço in natura, QTM pré-tratado com sulfito alcalino e após extração da fração hemicelulósica.

Tratamento	Composição do bagaço (% em base polpa)						Ara/10 xil
	Lignina	Celulose	Xilana	Arabinosil	Acetil		
Não tratado	21,01±0,25	36,53±0,18	20,00±0,36	1,89±0,11	3,23±0,03		0,95
Químico-termomecânico (10% Na ₂ SO ₃ / 5% NaOH)	13,78±0,38	45,53±0,62	23,10±0,31	2,18±0,07	ND		0,94
Bagaço pré-tratado extraído com tampão (BET)	12,63±0,39	46,61±1,63	20,70±0,72	1,39±0,08	ND		0,66
Bagaço pré-tratado extraído com enzima (BEE)	12,30±0,59	56,38±0,45	15,22±0,18	0,80±0,01	ND		0,53
Bagaço pré-tratado extraído com tampão (BEET)	16,98±0,53	57,26±2,19	12,92±0,72	0,05±0,01	ND		0,04
Bagaço pré-tratado extraído com enzima (BEE2)	15,67±0,01	57,34±1,24	11,11±0,68	0,06±0,01	ND		0,06

As extrações foram feitas em tampão fosfato 50 mM pH 8,0 por 24 h a 40 °C. (BEE) Bagaço extraído uma vez com Luminase. (BET) Bagaço extraído uma vez com tampão. (BEE2) Bagaço extraído pela segunda vez com Luminase. (BEET) Bagaço extraído uma vez com Luminase e extraído novamente em tampão. ND: não detectado.

Fonte: Arquivo pessoal

As relações xil/ara apresentadas na tabela 10 evidenciam que as xilanas que ficam no material após extrações são pouco substituídas; sugerindo uma maior interação com a celulose (WANG et al., 2016; KÖHNKE et al., 2011).

5.4 Sacarificação enzimática do sólido residual

Os sólidos resultantes das diferentes extrações de hemicelulose foram hidrolisados com celulases comerciais, para avaliar o efeito da extração na sacarificação (Figura 31).

Figura 31: Hidrólises enzimática da celulose e xilana dos sólidos resultantes após primeira (A e B) e segunda (C e D) extração das xilanas. Bagaço pré-tratado QTM10% e extraído com (—●—) Tampão (pH=8), (—○—) Luminase e (—●—) sem extrair. As barras sobre os pontos dos gráficos indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal

A figura 31A mostra a conversão da celulose do bagaço pré-tratado QTM10% e dos sólidos resultante da primeira extração com tampão (BET) e com enzima (BEE). As hidrólises do bagaço QTM10% e BET foram similares até 2 horas de reação, atingindo valores de 25,0%, 26,9% respectivamente. Neste mesmo tempo a conversão de celulose do BEE foi maior (31,4%). Com o decorrer da reação estas diferenças tornaram-se mais

evidentes, com valores de 80,0%, 86,3% e 90,4% para o bagaço QTM10%, BET e BEE, respectivamente. A partir deste tempo as diferenças tornaram-se menores, atingindo às 72 horas valores de sacarificação de 98% para todas as amostras. O aumento na conversão de celulose dos bagaços que foram submetidos a extração das xilanas concorda com outros estudos (ZHANG et al., 2011; DING et al., 2015; DONDELINGER et al., 2016)

A figura 31C mostra a sacarificação da celulose do bagaço QTM10%, depois de extraído pela segunda vez com Luminase ou tampão. No início da reação, as conversões de celulose do material re-extraído das duas formas foram minimamente superiores ao controle (QTM10%). O rendimento final da sacarificação da amostra proveniente da segunda extração enzimática, foi similar ao controle e à bagaço extraído apenas uma vez com a Luminase (~98%). Por outro lado, a sacarificação do bagaço que tinha sido extraído pela primeira vez com Luminase, e pela segunda vez em tampão foi menor (~92%).

A conversão enzimática da xilana (Figura 31B) foi inferior à da celulose, alcançando nas primeiras 2 horas de reação valores de 17,0%, 18,8% e 25,1% para QTM, BET e BEE, respectivamente. Conforme avançou a hidrólise, a conversão dos bagaços nos quais foi extraída a arabinoxilana atingiu valores similares, sendo observados às 8 horas conversões de 43,2% e 43,6%, para o bagaço BET e BEE, respectivamente, enquanto o bagaço QTM10% registrou uma conversão de xilana de 37%. Esta tendência se manteve no decorrer da hidrólise e nas 72 horas se observam valores de conversão de 82,8%, 97,3% e 93,8% para o QTM10%, BET e BEE, respectivamente.

A conversão de xilana dos bagaços extraídos pela segunda vez foi menor quando, comparados com os extraídos apenas uma vez (Figura 31D). Às 24 horas de sacarificação foram obtidos valores de 60,6%, 64,3% e 70,2% para o QTM10%, BEET (Bagaço extraído 2 vezes com enzima) e BEE2 (Bagaço extraído com enzima e pela segunda vez com tampão), respectivamente. Em 48 horas de hidrólise, os valores de conversão obtidos com os bagaços QTM10% e BEET, foram 79,2% e 79,6% respectivamente; enquanto o BEE2 mostrou uma conversão de 87,1%. Valores similares nas conversões foram observados às 72 horas de reação.

Embora a extração da arabinoxilana com tampão não tenha sido muito expressiva, quando comparada a extraída enzimaticamente, a sacarificação do BET foi maior que a do bagaço QTM10%. Esse resultado pode ser atribuído à remoção de componentes redepositados durante o pré-tratamento que podem inibir as enzimas celulolíticas, como

compostos fenólicos (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012; MOREIRA e FILHO, 2016) e xiloligosacarídeos (QING et al., 2010; BAUMANN et al., 2011; XIMENES et al., 2011). O aumento na sacarificação do material extraído enzimaticamente foi maior, podendo relaciona-lo à maior remoção de hemicelulose. Os dados mostram que a partir de 24 horas de reação os três bagaços ficaram mais recalcitrantes, diminuindo as diferenças na sacarificação (MENDES et al., 2011). A sacarificação do resíduo pré-extraído em enzima e extraído em tampão (BEET) foi um pouco menor quando comparado com o bagaço extraído em tampão (BET). Este efeito pode ser explicado porque a maior extração de hemicelulose dos bagaços extraídos pela segunda vez pode torna-los mais recalcitrantes, considerando que a hemicelulose impede fisicamente a agregação e colapso das microfibrilas de celulose (DUCHESNE et al. 2001; ISHIZAWA et al, 2009; BUSSE-WICHER et al., 2016).

As cinéticas de conversão de celulose e xilana nos materiais após as extrações da fração hemicelulósica, pela primeira e segunda vez apresentaram perfis similares. Não obstante, as conversões de celulose mostraram uma velocidade significativamente maior nas 24 primeiras horas de hidrólise em todos os bagaços testados, quando comparado com as conversões da hemicelulose (tabela **S2**, material adicional). Este resultado poderia ser atribuído à natureza heterogênea da arabinoxilana, e também à deficiência de enzimas no coquetel enzimático, para promover uma maior hidrólise da xilana (MENDES et al., 2011, 2013; QING e WYMAN 2011). Contudo, os materiais extraídos (BET e BEE) apresentaram baixos teores de xilana e um padrão de substituição menor que o bagaço QTM10%, não justificando a presença, nos coquetéis usados para a sacarificação, de um conjunto de hemicelulases com diferentes especificidades. Por outra parte, a diminuição no grau de substituição poderia estar limitando a hidrólise das xilanas devido a uma maior interação com a celulose (KÖHNKE et al., 2011; WANG et al., 2016). Uma terceira hipótese para explicar as diferenças entre as velocidades de conversão da celulose e xilana, seria que, pela interação, a celulose limite a hidrólise da hemicelulose. Como relatado, existe uma fração ou domínio da hemicelulose ocluída entre as cadeias de celulose (PAULY et al. 1999; HU et al. 2011). O fato de que mesmo hidrolisando por duas vezes o mesmo material com altas cargas de enzima, não foi possível extrair 100% da arabinoxilana, sugere que o pré-tratamento não consegue dar acesso a toda hemicelulose. No intuito de estabelecer relações para explicar as diferenças na hidrólise da celulose e hemicelulose, foram calculadas as relações molares entre glicose e xilose (gli/xil) liberados durante as extrações (Figura 32).

A figura 32A mostra as relações molares gli/xil obtidas do bagaço QTM10% antes e depois de extrair a xilana uma vez com tampão (BET) ou Luminase (BEE). Durante a primeira hora de hidrólise os bagaços QTM10% e BET mostraram valores da relação molar gli/xil de 2,4 e 2,8, respectivamente. Conforme transcorreu a hidrólise esta relação foi diminuindo. As 8 horas para o bagaço QTM10% e BET a relação gli/xil caiu para 2,3 e 2,4 respectivamente. A pouca variação na relação gli/xil observado no bagaço QTM10% se explica pelo maior conteúdo de xilana, mostrando uma hidrólise conjunta de celulose e hemicelulose. O bagaço BET mostrou valores maiores da relação gli/xil e uma diminuição mais abrupta, devido a que as xilanas superficiais já tinham sido extraídas no tampão, sugerindo uma maior hidrólise inicial da celulose. Às 72 horas de sacarificação, a relação gli/xil foi de aproximadamente 1,8 para ambos os bagaços.

Figura 32: Relações molares entre glicose e xilose depois da primeira (A) e segunda (B) extração. Bagaço pré-tratado QTM10% e extraído com (—●—) tampão (pH=8), (—●—) Luminase e (—●—) sem extrair. As barras sobre os pontos dos gráficos indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal

Por outro lado, o BEE apresentou uma relação gli/xil de 3,4 no hidrolisado após a primeira hora, aumentando para 4,3 nas 6 horas; sugerindo que as xilanas acessíveis já foram extraídas pela ação da endo-xilanase, e que no início da sacarificação (6 horas), as enzimas hidrolisaram principalmente a celulose. Posteriormente se observa uma diminuição desta relação, obtendo valores de 3,9 às 24 horas, e de 3,2 às 72 horas de sacarificação. Este resultado indica que é necessário hidrolisar parte da celulose para atingir todos os domínios da hemicelulose, mostrando por consequência que o pré-tratamento QTM usando 10% de

Na_2SO_3 e 5% de NaOH não consegue romper a alta organização das cadeias de celulose, que possibilitaria o acesso a todos os domínios da hemicelulose do bagaço.

A figura 32B mostra a relação gli/xil para o bagaço extraído pela segunda vez. Devido ao menor teor de xilana deste material os valores da relação gli/xil são maiores quando comparados com a primeira extração, e as variações são menos expressivas. O bagaço BEET (bagaço extraído enzimaticamente e depois com tampão) mostrou relação gli/xil de 5,4 durante a primeira hora de hidrólise, mantendo-se praticamente constante durante as primeiras 8 horas de reação. A partir das 8 horas se observou uma queda mais expressiva na relação gli/xil, com valores de 4,6 nas 24 horas e 4,1 a partir das 48 horas de reação. O bagaço BEE2 (bagaço extraído duas vezes em sequência com xilanase) mostrou na primeira hora de conversão um valor de gli/xil de 5,1, aumentando para 5,7 às 4 horas de reação. Às 24 horas de reação a relação gli/xil caiu para 5,0 e depois de 48 horas para 4,6. Estes resultados reforçam o que foi discutido na primeira extração, ou seja, a necessidade de hidrolisar parte da celulose para atingir todas as frações da hemicelulose.

5.5 Uso de proteínas auxiliares para aumentar a extração de arabinoxilanas do bagaço pré-tratado com clorito ácido por 4 horas e QTM10%

O experimento anterior mostrou a existência de frações da hemicelulose naturalmente pressas pela alta organização da celulose. Com o objetivo de desestruturar esta organização e aumentar a extração de xilanas foi avaliado o efeito de uma endoglucanase (EG), agindo nas regiões amorfas da celulose. O efeito da endoglucanase foi avaliado individualmente e de forma conjunta com a endo-xilanase Luminase. A extração conjunta, foi realizada de duas maneiras: colocando simultaneamente nos bagaços, e também pré-incubando os bagaços com endoglucanase antes de adicionar a xilanase. Foi feito um controle utilizando albumina de soro bovino (BSA) no lugar da EG. É relatado na literatura que a eficiência das enzimas em substratos lignocelulósicos pode ser diminuída por adsorção improdutiva na lignina (BERLIN et al., 2005). Neste sentido o BSA, foi utilizado com o objetivo de verificar se uma melhora aparente da extração de xilana estaria associada apenas à diminuição da adsorção improdutiva, devido ao aumento da carga de proteínas. O ensaio foi feito com 5UI de Luminase por grama de bagaço, enquanto as quantidades de EG e BSA foram fixados em 10 mg de proteína por grama de substrato.

Os resultados foram calculados como porcentagem de extração de xilana e de modo a representar de forma mais didática os dados, o rendimento de extração obtido com a xilanase foi subtraído do valor obtido nas diferentes condições de extração. A extração de xilana na reação controle (tampão) e só com EG não estão reportadas na figura, já que os valores de extração foram muito baixos. Os resultados dos experimentos utilizando condições similares se apresentam próximos no gráfico e com tonalidades diferentes da mesma cor.

Na figura 33 se mostram os dados obtidos das extrações de xilana para o bagaço tratado com clorito (D4). De forma geral se observa que tanto às 24 como às 48 horas de extração, todas as condições conseguiram solubilizar mais xilana quando comparado com a extração usando só xilanase.

Figura 33: Efeito de proteínas auxiliares na extração da xilana do bagaço pré-tratado com clorito por 4 horas (D4). (A) 24 horas de extração. (B) 48 horas de extração. As proteínas auxiliares foram avaliadas de forma individual, em conjunto com a xilanase Luminase ou após incubação previa por 48 horas. Os resultados apresentados são as diferenças entre o valor de extração obtido em cada condição e o valor de extração pela xilanase. (■) 5 UI Luminase + 10 mg Endoglucanase; (■) 48 horas 10 mg Endoglucanase + 5 UI Luminase; (■) 5 UI Luminase + 10 mg BSA; (■) 48 horas 10 mg BSA + 5 UI Luminase; (■) 48 horas tampão + 5 UI Luminase. As barras dos gráficos indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal

Às 24 horas de extração (figura 33A), se observa que adicionando simultaneamente a EG, ou incubando o bagaço D4 por 48 horas com EG antes de adicionar a xilanase, a extração aumentou 4,5% e 4,9%, respectivamente. Por outro lado, o controle da carga de proteínas, dada pela permuta da EG por BSA, mostrou um aumento da extração de xilana de 4,8% quando adicionado o BSA junto com a xilanase. Este resultado sugere que o efeito positivo observado com a EG foi semelhante ao observado pelo BSA, sendo a causa provável uma diminuição da adsorção improdutiva da xilanase na lignina. A pré-incubação do bagaço

D4 com BSA por 48 horas e posterior adição da xilanase, aumentou a extração em 11,0%, sugerindo que um maior tempo de incubação com BSA pode bloquear mais sítios de união improdutivo (BERLIN et al., 2005), ou ainda ter o efeito de estabilização da xilanase (WANG et al., 2015). Porém, o melhor rendimento de xilana (12,5%) foi obtido pela pré-incubação do bagaço no tampão por 48 horas antes de adicionar a xilanase. Este resultado sugere que os efeitos positivos observados no bagaço D4 estão mais associados ao equilíbrio de fases, pois a concentração de compostos no tampão é menor que em BSA ou endoglucanase, o que pode ter favorecido a extração das xilanas do bagaço.

A figura 33B mostra os resultados obtidos às 48 horas de extração. Usando a xilanase e EG desde o início da reação a extração aumentou em 2,3%, e a pré-incubação por 48 horas com EG e posterior extração com xilanase obteve um rendimento de 6,3%. Apesar do aumento observado, estes resultados confirmam que a EG foi pouco efetiva em aumentar a extração enzimática da xilana no bagaço D4. Por outra parte, quando adicionado BSA conjuntamente ou pré-incubando o bagaço por 48 com esta proteína antes de adicionar a xilanase, a extração de xilana aumentou 5,1% e 11,1%, respectivamente, sugerindo que apesar do baixo teor de lignina, existe adsorção improdutivo no bagaço D4. A extração incubando o bagaço D4 por 48 horas em tampão antes de adicionar a xilanase mostrou um aumento do rendimento de 12,7%, confirmando o efeito positivo de uma incubação previa com tampão.

Os resultados obtidos da extração enzimática da xilana no bagaço D4 usando proteínas auxiliares, mostram que a EG não foi efetiva em desestruturar o arranjo da celulose. A remoção de lignina do bagaço D4 foi 75% e também uma parte da xilana e celulose foi removida (Tabela 2). Como dito anteriormente a deslignificação com clorito altera os carboidratos dos materiais lignocelulósicos tratados quando removidos mais do 60% de lignina (AHLGREN E GORING, 1971), como aconteceu no bagaço D4. É relatado que durante a deslignificação por clorito ácido o grau de polimerização das cadeias de celulose pode ser reduzido, devido à hidrólise ácida ou clivagem oxidativa (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010). Sendo assim, a deslignificação por 4 horas pode ter hidrolisado a celulose amorfa do material, deixando a EG sem alvo de ação. Por outra parte, a incubação dos materiais em tampão por 48 horas antes de adicionar a enzima pode encher as fibras devido as condições de incubação (agitação, temperatura e pH levemente alcalino), aumentando a extração da xilana. Quando esta mesma incubação foi feita em presença de

proteínas não se observa o mesmo efeito, pela adsorção das proteínas nos sítios do substrato alvos da xilanase (WANG et al., 2015), ou simplesmente pelo efeito de equilíbrio das fases.

O efeito da EG na extração enzimática da xilana do bagaço QTM10% foi também avaliado. Os resultados obtidos se apresentam na figura 34.

Figura 34: Efeito de proteínas auxiliares na extração da xilana do bagaço QTM10%. (A) 24 horas de extração. (B) 48 horas de extração. As proteínas auxiliares foram avaliadas de forma individual, em conjunto com a xilanase Luminase ou após incubação previa por 8 ou 48 horas. Os resultados apresentados são produto da resta entre o valor de extração obtido nas diferentes condições menos o valor de extração da xilanase (■) 5 UI Luminase + 10 mg Endoglucanase; (■) 8 horas 10 mg Endoglucanase + 5 UI Luminase; (■) 48 horas 10 mg Endoglucanase + 5 UI Luminase; (■) 5 UI Luminase + 10 mg BSA; (■) 8 horas 10 mg BSA + 5 UI Luminase; (■) 48 horas 10 mg BSA + 5 UI Luminase; (■) 8 horas tampão + 5 UI Luminase; (■) 48 horas tampão + 5 UI. As linhas sobre as barras dos gráficos indicam o desvio padrão.

Fonte: Arquivo pessoal

A diferença do observado no bagaço D4, no bagaço QTM10% foi observada uma diminuição da extração em algumas condições testadas, quando comparadas com a extração

com xilanase em tampão. Além dos tempos de incubação de 48 horas antes de adicionar a xilanase, foi testado também uma incubação previa por 8 horas.

A figura 34A mostra que a adição simultânea de xilanase e EG aumentou a extração em 5,5%. A pré-incubação do bagaço QTM10% por 8 horas com EG aumentou 17,4% a extração, enquanto a pré-incubação com EG por 48 horas antes de adicionar a xilanase, teve um efeito oposto, diminuindo um 21,2% a extração da xilana. A adição de BSA também teve um efeito negativo na extração enzimática de xilana no bagaço QTM10% e quando pré-incubadas por 8 ou 48 horas antes de adicionar xilanase, a extração foi menor que a extração com xilanase. As pré-incubações com tampão por 8 e 48 horas antes de adicionar a xilanase também prejudicaram a extração da xilana. Siqueira et al. (2017) mostraram que os compostos fenólicos liberados durante o pré-tratamento QTM10% podem inibir as enzimas, explicando a diminuição no rendimento de extração, ainda mais considerando que o bagaço após o pré-tratamento não foi lavado. Às 48 horas de extração (Figura 35B), os efeitos negativos e positivos observados às 24 horas, diminuíram. Assim, o efeito de adicionar ao mesmo tempo EG e xilanase ou pré-incubando o bagaço QTM10% com EG por 8 horas antes de adicionar xilanase, aumentaram a extração em 1,9% e 10,8% respectivamente; enquanto a incubação com EG por 48 horas antes de adicionar xilanase diminuiu a extração em 10,8%. A diferença do observado às 24 horas de extração, a adição de BSA e xilanase ao mesmo tempo, melhorou a hidrólise em 2%. Já nas pré-incubações com BSA por 8 e 48 horas antes de adicionar a xilanase, continuaram prejudicando a extração da xilana em 11,0% e 16,1%, respectivamente.

O efeito da incubação em tampão antes de adicionar a xilanase continuou negativo, sendo observados para às 8 e 48 horas de incubação diminuições de 15,3% e 13,4% na extração de xilana. Os resultados obtidos com o bagaço QTM10% mostram que a pré-incubação com EG por 8 horas aumentou a extração da xilana. Estes resultados sugerem que no bagaço QTM10% há regiões na celulose nas quais a EG pode agir, expondo mais xilana para a ação da xilanase. Os resultados obtidos com BSA sugerem que a adsorção improdutiva na lignina provavelmente não afetou o desempenho da xilanase. Este resultado pode ser explicado, considerando o fato de que o pré-tratamento QTM10% introduz íons sulfito na lignina, deixando-a carregada negativamente no pH=8,0 do ensaio. O mesmo pode ocorrer

com a Luminase, provocando repulsões eletrostáticas e consequentemente diminuindo a adsorção improdutiva na lignina do bagaço (SIQUEIRA et al., 2017).

5.5 Recuperação e caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino

Os experimentos de recuperação e caracterização das xilanas extraídas foram feitos utilizando o bagaço QTM10% e a xilanase Luminase. Para ter uma ideia da recuperação e características das xilanas foram feitos experimentos exploratórios usando uma carga enzimática do preparado Luminase de 20 UI por grama de substrato, devido a que os ensaios de hidrólises comparativa foram atemporais a este experimento. As extrações foram feitas segundo o descrito nos materiais e métodos (Seção 4.4.6). Os resultados obtidos com o aumento na escala em termos de massa na extração da xilana com Luminase, foram similares aos observados com uma massa menor. Às 24 horas foram obtidos valores de 34,4% para xilana e 49,6% para o grupo arabinosil comparado com um 34,2% para xilana e 47,4% para o grupo arabinosil, na extração usando 0,5 g e 2,5 g de massa seca, respectivamente.

Após extração, os sólidos resultantes foram lavados extensivamente com água, e foi feita uma incubação em uma solução de NaOH pH=10 sob agitação por 5 minutos, para determinar se depois da recuperação dos sobrenadantes e lavagem do bagaço hidrolisado poderia existir retenção de xilana ou xilo-oligômeros. É importante lembrar que para parar a reação de extração enzimática as amostras foram fervidas, pelo que a incubação com NaOH foi feita a temperatura ambiente. A hidrólise ácida da fração obtida com a incubação alcalina foi analisada por HPLC, mostrando que não é possível extrair mais xilanas ou xilo-oligômeros incubando o substrato hidrolisado em uma solução alcalina.

5.5.1 Recuperação das xilanas extraídas

Para recuperar as xilanas extraídas do bagaço QTM10% por Luminase, foram testados dois protocolos diferentes. Um deles envolvendo uma diminuição do pH, seguido de uma incubação a 4° C, para facilitar a precipitação das xilanas em etanol (DE LOPEZ et al., 1996). O outro protocolo usou um volume maior de etanol e temperatura ambiente (BURANOV et al., 2010). Na figura 35 pode-se visualizar as frações recuperadas com os dois protocolos usados.

Figura 35: Cromatografia em camada delgada (TLC) das frações de xilana recuperadas da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (10% de Na₂SO₃ e 5% de NaOH). Padrões: Ara: arabinose. Cel: celobiose. Gli: glicose. X1: xilose. X2: xilobiose. X3: xilotriose. X4: xilotetraose. Amostras 1 e 2 correspondem ao precipitado e sobrenadante (2 µL) obtidos com o protocolo De Lopez et al. (1996). Amostras 3 (2 µL) e 4 (4 µL) do sobrenadante e amostra, e amostra 5 do precipitado recuperado pelo protocolo de Buranov et al. (2010).

Fonte: Arquivo pessoal.

Em nenhuma das amostras foram observados o aparecimento de manchas correspondentes aos monómeros arabinose, glicose ou xilose. Também não se observou a produção de celobiose. As duas frações sólidas obtidas com os dois diferentes protocolos não produziram manchas na placa de TLC. Este resultado concorda com o previsto, já que estas frações deveriam corresponder a xilanas de alta massa molar que não conseguem ascender na cromatografia. Nas frações líquidas foi possível observar a presença de XOs, correspondentes a xilobiose, xilotriose, xilotetraose, quando comparado com o padrão. As pequenas diferenças nas distâncias de migrações dos XOs nas diferentes frações podem ser devido à presença de grupos pendentes. A diferença na intensidade das manchas é atribuída à aplicação de volumes de amostra diferentes. Porém, da mesma forma que é possível comprovar a presença de xilo-oligômeros até xilotetraose, este ensaio sugere a presença de outros xilo-oligômeros de maior massa, mas devido à ausência de padrões não é possível definir o seu tamanho.

5.5.2 Caracterização das xilanas recuperadas

As frações das xilanas recuperadas pelos métodos de De Lopez et al. (1996) e Buranov et al. (2010), obtidas foram analisadas por permeação em gel, usando uma coluna Sephadex-G75. A figura 36A mostra a eluição do azul de dextrana (20.000 kDa) e da vitamina B12 (1.356 kDa), que delimitam a faixa de separação da coluna. Nas figuras 36B e 36C estão representados os perfis de eluição das frações sólidas (alta massa molar) obtidas pelos dois métodos.

Figura 36: Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex-G75. Em A (—●—) Blue Dextran (20.000 kDa); (—●—) Vitamina B12 (cianocobalamina) (1356,373 Da). Em B (—●—) perfil de eluição da fração 1. Em C (—●—) perfil de eluição da fração 5. Em D (—●—) perfil de eluição da xilana de birchwood.

Fonte: Arquivo pessoal.

Se observa na figura 36B e 36C uma xilana de alta massa molar que eluiu próxima do limite superior da coluna (50 kDa), um pouco depois do pico do Blue Dextran. Foi analisado o perfil de eluição da xilana comercial de birchwood (Figura 36D), e se observou

um comportamento semelhante as frações de xilana 1 e 5. Os perfis mostram também que estas frações não são totalmente puras, já que é possível observar outros picos menores no decorrer da eluição.

Por sua vez as frações líquidas (Figura 37B e 37C) apresentam um grande pico de eluição próximo a região de eluição da vitamina B12 (Figura 37A), sugerindo a presença de xilo-oligômeros de menor massa molar em comparação as frações precipitadas. Os valores de absorbância para estas frações se mostram elevados devido a presença de uma alta concentração de açúcares. Da mesma forma, uma parte destas amostras eluíram em volumes próximos ao do Blue Dextran, mostrando que há xilanas de alta massa molar na fração líquida.

Figura 37: Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex-G75. Em A (—●—) Blue Dextran (2.000 kDa); (—●—) Vitamina B12 (cianocobalamina) (1356,373 Da). Em B (—●—) perfil de eluição da fração 3. Em C (—●—) perfil de eluição da fração 5.

Fonte: Arquivo pessoal.

Assim como nos bagaços pré-tratados, a xilana obtida foi analisada por 2D-RMN HSQC $^1\text{H}/\text{C}^{13}$ em parceria com o Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), na Espanha. A tabela 11 mostra atribuições de sinais de carboidratos complementares aos apresentados para os espectros 2D-NMR HSQC $^1\text{H}/\text{C}^{13}$ dos pré-tratamentos (Tabela 11).

Tabela 11: Atribuições complementares dos sinais dos carboidratos no espectro 2D-NMR HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$.

Legenda	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$	Atribuições
<u>Sinais de carboidratos</u>		
U_{OMe}	60.4/3.51	C/H da metoxila no ácido 4- <i>O</i> -metilglucoronico
Ar_5	61.6/3.44	C_5/H_5 em α -L-arabinofuranosídeo
$\text{X}_{5\text{NR}}$	65.5/370 e 3.06	C_5/H_5 em β -D-xilopiranosídeo (NR)
$\text{X}_{4\text{NR}}$	69.4/3.27	C_4/H_4 em β -D-xilopiranosídeo (NR)
U_5	69.5/4.45	C_5/H_5 no ácido 4- <i>O</i> -metilglucoronico
$\alpha\text{X}_{3\text{R}}$	70.2/3.64	C_3/H_3 em α -D-xilopiranosídeo (R)
U_2	71.8/3.20	C_2/H_2 no ácido 4- <i>O</i> -metilglucoronico
U_3	73.2/3.55	C_3/H_3 no ácido 4- <i>O</i> -metilglucoronico
$\text{X}_{3\text{NR}}$	76.2/3.20	C_3/H_3 em β -D-xilopiranosídeo (NR)
Ar_3	77.7/3.62	C_3/H_3 em α -L-arabinofuranosídeo
Ar_2	80.0/3.80	C_2/H_2 em α -L-arabinofuranosídeo
Ar_4	86.0/3.96	C_4/H_4 em α -L-arabinofuranosídeo
$\alpha\text{X}_{1\text{R}}$	92.1/4.85	C_1/H_1 em α -D-xilopiranosídeo (R)
$\beta\text{X}_{1\text{R}}$	97.3/4.22	C_1/H_1 em β -D-xilopiranosídeo (R)
X_1	101.6/4.29	C_1/H_1 em β -D-xilopiranosídeo
Ar_1	107.0/5.32	C_1/H_1 em α -L-arabinofuranosídeo

R, unidade do terminal redutor; NR, unidade do terminal não redutor

Fonte: IRNAS (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, P.O. Box 1052, 41080-Sevilla, Espanha).

A figura 38 mostra o espectro da xilana extraída pela xilanase e as principais estruturas atribuídas aos sinais encontrados. O espectro da xilana mostra fortes sinais para os carboidratos, enquanto os sinais da lignina só puderam ser observados quando a região aromática foi amplificada 16 vezes. Similar ao observado para os espectros do pré-tratamento, os principais sinais de carboidratos corresponderam aos carbonos (C) e hidrogênio (H) das unidades de xilose, representados como X_1 (C_1/H_1), X_2 (C_2/H_2), X_3 (C_3/H_3), X_4 (C_4/H_4) e o sinal duplo para X_5 (C_5/H_5). Também foram encontrados sinais para arabinose representados como Ar_1 (C_1/H_1), Ar_2 (C_2/H_2), Ar_3 (C_3/H_3), Ar_4 (C_4/H_4) e Ar_5 (C_5/H_5). A relação xil:ara encontrada no espectro foi de aproximadamente 10:1,6. O resultado desta relação no ensaio de extração com 100 UI de xilanase foi de aproximadamente 10:1,25, atribuindo a diferença às diferentes cargas enzimáticas usadas. Outro sinal de carboidrato encontrado correspondeu ao ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurônico representado como U_1 , U_2 , U_3 , U_4 e U_5 . Este ácido não foi detectado no espectro do bagaço pré-tratado QTM10%, provavelmente pela sensibilidade do método, já que havia sido detectado na análise química (Tabela 3). Esta informação indica que a extração enzimática da xilana do bagaço QTM10% foi na forma de glucurono-arabinoxilana. A presença de

sinais atribuídas ao terminal redutor (X_R) e não redutor (X_{NR}) indica que a amostra contém cadeias curtas de xilana, em acordo com o observado nos resultados da SEC.

Figura 38: Espectro 2D-RMN ($\delta C/\delta H$ 52-135/2.4-7.8) da xilana extraída enzimaticamente do bagaço QTM10% e principais estruturas atribuídas aos sinais encontrados. A figura mostra um requadro da região aromática amplificada 16 vezes, contendo os principais sinais atribuídos na região aromática.

Fonte: Arquivo pessoal.

Sinais da lignina residual também foram observados, porém só depois de amplificar o sinal na região aromática. A lignina extraída enzimaticamente só mostrou sinais para as unidades S e G da lignina com uma relação S/G de ~ 1.9 , sendo também encontrados sinais associados com o ácido *p*-coumárico. Esta informação está de acordo com as análises química e espectros 2D-RMN HSQC $^1H/C^{13}$ do bagaço pré-tratado QTM10%, as quais mostraram que o parte do ácido *p*-coumárico resiste as condições de pré-tratamento. Este

resultado corrobora o efeito da solubilização de compostos fenólicos em função do tempo detectada na extração enzimática do bagaço QTM10% (seção 5.2.3). É relatado na literatura que a presença de ácidos fenólicos nas xilanas, confere a estas propriedades antioxidantes diversificando ainda mais suas aplicações (EBRINGEROVÁ, 2006).

A amplificação da região aromática também mostra sinais significativos atribuídos a presença de proteínas, derivadas do uso da xilanase no processo de extração.

6. Conclusões

- A retirada da etapa de lavagem extensiva dos bagaços depois do pré-tratamento quimio-termomecânico (QTM) permitiu um melhor aproveitamento da hemicelulose, refletindo num aumento dos rendimentos do processo quando comparados aos anteriormente reportados pelo nosso grupo de trabalho.
- O aumento das cargas de sulfito e álcali no pré-tratamento QTM melhora as características físico-químicas relacionadas ao aumento da digestibilidade das frações polissacarídicas, e remove progressivamente os substituintes da hemicelulose em relação ao polímero original. Por outro lado, parte do ácido *p*-coumárico resiste às condições de pré-tratamento.
- A extração enzimática da hemicelulose a partir do bagaço pré-tratado QTM e deslignificado foi favorecida pela remoção da lignina, ácidos hidroxicinâmicos e do substituinte acetil. Em relação ao bagaço pré-tratado QTM o aumento progressivo da área superficial acessível de celulose, em função do aumento das cargas de sulfito e álcali, também favoreceu a extração enzimática da hemicelulose.
- O preparado enzimático comercial Luminase apresentou o melhor rendimento de extração entre todas as xilanases testadas, em todos os bagaços pré-tratados.
- Os aumentos nas cargas enzimáticas do preparado enzimático Luminase não mostraram um aumento expressivo nas extrações da xilana em substratos com diferenças no teor de lignina, sugerindo que há outros fatores limitando a acessibilidade enzimática.
- A extração enzimática de xilana a partir do bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito e álcali (10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH), mostrou um aumento na concentração de fenóis totais em função do tempo, sugerindo que o preparado enzimático Luminase pode clivar complexos lignina carboidrato (LCC) e pode extrair ácido *p*-coumárico junto com a xilana.
- A extração enzimática da xilana do bagaço pré-tratado é favorecida pela sua substituição com arabinose, e limitada pela interação com a celulose. Neste sentido, o pré-tratamento quimio-termomecânico não consegue romper por completo a interação xilana-celulose, que proveria acesso a todos os domínios da hemicelulose.
- Durante a extração enzimática com Luminase a xilana pode adsorver no bagaço, sendo parte desta xilana solúvel em água destilada.

- A extração enzimática da xilana do bagaço pré-tratado melhora a hidrólise enzimática dos polissacarídeos residuais, sendo este efeito mais evidente nas primeiras 24 horas de hidrólise.
- Os bagaços pré-tratados submetidos a duas extrações sucessivas com alta carga de enzima mostram uma melhora menos significativa na sacarificação da celulose, quando comparado com o material extraído uma vez, sugerindo que pode ter ocorrido um colapso da matriz lignocelulósica em baixas concentrações de xilana (<15%)
- Proteínas que agem na celulose podem melhorar a extração enzimática de xilana dos bagaços pré-tratados. Esta melhora é mais expressiva se as proteínas auxiliares são pré-incubadas com o substrato antes de adicionar a xilanase.
- As hemiceluloses extraídas enzimaticamente podem ser recuperadas por concentração e posterior precipitação com etanol, podendo-se recuperar frações de alta e baixa massa molar.
- As análises de 2D-RMN mostraram que a glucurono-arabinoxilana extraída enzimaticamente do bagaço QTM10% contém ácido *p*-coumarico, proteínas e baixas quantidades de lignina.

Referências

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009. Disponível em:
- ACHYUTHAN, K. E.; ACHYUTHAN, A. M.; ADAMS, P. D.; DIRK, S. M.; HARPER, J. C.; SIMMONS, B. A.; SINGH, A. K. Supramolecular self-assembled chaos: Polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641–8688, 2010.
- AHLGREN, P.A.; GORING, D.A.I. Removal of Wood components during chlorite delignification of black spruce. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 1272-1275, 1971.
- ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000a. p. 12.
- ALONSO, J. L.; VA, M. J. Xylooligo- saccharides : manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 2000, p. 387–393, 2001.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851- 4861, 2010.
- 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, n. 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.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; WALTON, J. D. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 22, 2010a.

BAUMANN, M. J.; BORCH, K.; WESTH, P. Xylan oligosaccharides and cellobiohydrolase I (TrCel7A) interaction and effect on activity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 45, 2011.

BENDZALOVA, M.; PEKAROVICOVA, A.; KOKTA, B. V.; CHEN, R. Accessibility of swollen cellulosic fibers. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 30, p. 19-32, 1996.

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.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 163-170, 2005.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X.; XU, F.; SUN, R.; KENNEDY, J. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.

BIAN, J. et al. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 236–241, 2013.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures : State of the art. **Biotechnology Advances**, 2016.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 2012.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286 290, 1985

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides Production from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-205, 2010.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme research**, v. 2011, p. 787532, 2011.

BROEKAERT, WILLEM F , CHRISTOPHE M. COURTIN , KRISTIN VERBEKE , TOM VAN DE WIELE , WILLY VERSTRAETE & JAN A. DELCOUR (2011) Prebiotic and Other Health-Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 178-194,

BROWNING, B. **Methods of wood chemistry**. New York: Wiley, 1967.

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

BUSSE-WICHER, M.; GRANTHAM, N. J.; LYCZAKOWSKI, J. J.; NIKOLOVSKI, N.; DUPREE, P. Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. **Biochemical Society transactions**, v. 44, n. 1, p. 74–8, 2016a.

BUSSE-WICHER, M.; GOMES, T. C. F.; TRYFONA, T.; NIKOLOVSKI, N.; STOTT, K.; GRANTHAM, N. J.; BOLAM, D. N.; SKAF, M. S.; DUPREE, P. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 79, n. 3, p. 492–506, 2014.

BUSSE-WICHER, M.; LI, A.; SILVEIRA, R. L.; PEREIRA, C. S.; TRYFONA, T.; GOMES, T. C. F.; SKAF, M. S.; DUPREE, P. Evolution of Xylan Substitution Patterns in Gymnosperms and Angiosperms: Implications for Xylan Interaction with Cellulose. **Plant Physiology**. v. 171, n. August, p. 2418–2431, 2016b.

CARPITA, N. C., RALPH, J., MCANN, M. C. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, 2nd ed. Slp: Willey Blackwell. Edition, 2015. cap. 2. p. 45.

CARROLL A, SOMERVILLE C. Cellulosic biofuels. **Annu Rev Plant Biol**, v. 60. P. 165-182, 2009.

CARVALHO, D. M., MARTINEZ, A., EVTUGUIN, D. V, LUIZ, J., LINDSTRÖM, M. E., Sevastyanova, O. (2017). Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, 156, 223–234.

CARVALHO, D. M. DE, SEVASTYANOVA, O., PENNA, L. S., SILVA, B. P. DA, LINDSTRÖM, M. E., COLODETTE, J. L. (2015). Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, 73, 118–126. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.021>

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CHANDRA, R.; EWANICK, S.; HSIEH, C.; SADDLER, J.N The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, Part 1: A modified Simons' staining technique. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1178-1185, 2008.

CHANDRA, P.R.; EWANICK, S.M.; CHUNG, P.A.; AU-YEUNG, K.; DEL RIO, L.; MABEE, W.; SADDLER, J.N. Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1217-1222, 2009.

CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. Use of the Simons' staining technique to assess cellulose accessibility in pretreated substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 8, p. 230-237, 2012.

CHANG, S.; CHU, J.; GUO, Y.; LI, H.; WU, B.; HE, B. Bioresource Technology An efficient production of high-pure xylooligosaccharides from corncob with affinity adsorption-enzymatic reaction integrated approach. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1043–1049, 2017. Disponível em:

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 25–35, 2012.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 121–145, 15 jul. 2011.

COHEN R., SUZUKI, M.R., HAMMEL, K.E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol** v. 71, p. 2412–2417, 2005

CONAB. Companhia nacional de abastecimento, 2016. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_leve_-_15-16.pdf

COSGROVE, D. J. **Plant Cell Growth and Elongation**: Chichester John Wiley & Sons, 2014, p. 1–12. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001688.pub2.

COSTA, T. H. F.; VEGA-SÁNCHEZ, M. E.; MILAGRES, A. M. F.; SCHELLER, H. V.; FERRAZ, A. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 99, 2016.

DE LOPEZ, S.; TISSOR, 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.

DEL RÌO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, Ángel T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DEL RIO, L. F.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, JN. The Effects of Increasing Swelling and Anionic Charges on the Enzymatic Hydrolysis of Organosolv-Pretreated Softwoods at Low Enzyme Loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1549-58, 2011.

DE VRIES, R. P.; POULSEN, C. H.; MADRID, S.; VISSER, J. *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 243–249, 1998.

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., ZHOU, X., JI, Z., YOU, T., XU, F. How Does Hemicelluloses Removal Alter Plant Cell Wall Nanoscale Architecture and Correlate with Enzymatic Digestibility? **Bioenergy Research**, 1–9, 2015. <http://doi.org/10.1007/s12155-015-9703-1>

DONDELINGER, E.; AUBRY, N.; BEN CHAABANE, F.; COHEN, C.; TAYEB, J.; RÉMOND, C. Contrasted enzymatic cocktails reveal the importance of cellulases and hemicellulases activity ratios for the hydrolysis of cellulose in presence of xylans. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 24, 2016.

DOS SANTOS, L.; GRASSI, C.; LEAL M; D. B.E.; CAMARGO, O.; DREZZA, A. L.I, I. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality **INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY**. p. 40–58, 2015.

DUCHESNE, I., HULT, E. L., MOLIN, U., DANIEL, G., IVERSEN, T., LENNHOLM, H. The influence of hemicellulose on fibril aggregation of kraft pulp fibres as revealed by FE-SEM and CP/MAS 13C-NMR. **Cellulose**, v. 8, n. 2, p. 103–111, 2001.

DUBOIS, M.; GILES, K.; HAMILTON, J.K.; REBES, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and relates substances. **Analytical Chemistry** v. 28, p. 350-356, 1956.

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

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

FARHAT, W.; VENDITTI, R.; QUICK, A.; TAHA, M.; MIGNARD, N.; BECQUART, F.; AYOUB, A. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, n. May, p. 370–377, 2017. Disponível em:

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201-212, 2000.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. **Revista Symposium, Lavras**, v. 6, p.36–41, 2008.

FOELKEL, C. As Biorrefinarias Integradas no Setor Brasileiro de Fabricação de Celulose e Papel de Eucalipto. http://www.eucalyptus.com.br/eucaliptos/PT29_BiorrefinariasCelulosePapel.pdf Acessado em 21/5/2015.

FORD, C.W. Comparative structural studies of lignin-carbohydrate complexes from *Digitaria decumbens* (pangola grass) before and after chlorite delignification. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 101-117, 1986.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, PS. S.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; VENKATESH, B.; E DALE, B. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, n. 4, p. 5-16, 2011.

GELLERSTEDT, G. Chemistry of Chemical Pulping. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**, 2nd ed. Berlin: De Gruyter, 2009, cap. 5, p. 91-120.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-800, 2010.

GLASS, N. L.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H. D.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 477–98, 2013

GLASSER, W.G.; KAAR, W.E.; JAIN, R.K.; SEALEY JE. Separation, characterization and dydrogelformation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymer**. V. 43, p. 367–74, 2000b.

GOURLAY, K.; HU, J.; ARANTES, V.; ANDBERG, M., SALOHEIMO, M., PENTTILÄ, M.; SADDLER, J. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

GUERRA, A.; FERRAZ, A.; COTRIM, A.R.; SILVA, F.T. Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 315-323, 2000.

DUTTA, S.; WU, K. C. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 4615–4626, 2014.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.013>>.

HATFIELD, R.D.; MARITA, J.M.; FROST, K. Characterization of p-coumarate accumulation, p-coumaroyl transferase, and cell wall changes during the development of corn stems. **J. Sci. Food. Agric**. v. 88, p. 2529–37, 2008.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**, Berlin: De Gruyter, 2009, cap. 6, p. 121-145.

HENRIKSSON, G.; Lennholm H. Cellulose and Carbohydrate Chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: De Gruyter, 2009, V.1. cap. 4, p. 71-100.

HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.

HUBBELL, C.A.; RAGAUSKAS, A.J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7410-7415, 2010.

HU, G.; FU, S.; LIU, H.; LUCIA, L. A. The role of absorbed hemicelluloses on final paper properties and printability. **Fibers and Polymers**, v. 17, n. 3, p. 389–395, 2016.

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.

IEA Bioenergy, 2009. Report: IEA Bioenergy Task 42 on Biorefineries. www.ieabioenergy.com/task42-biorefineries.com, accessed on 06.30.2016.

ISHIZAWA, C. I., JEOH, T., ADNEY, W. S., HIMMEL, M. E., JOHNSON, D. K., & DAVIS, M. F. Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover? **Cellulose**, v. 16, n. 4, 677–686, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9313-1>

IWAMOTO, S.; ABE, K.; YANO, H. The effect of hemicelluloses on wood pulp nanofibrillation and nanofiber network characteristics. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1022-1026, 2008.

JAYAPAL, N.; SAMANTA, A. K.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 14–24, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.019>>.

JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; BONOMI, A. The Virtual Sugarcane Biorefinery—A Simulation Tool to Support Public Policies Formulation in Bioenergy. **INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY** p. 62–68, 2015.

KABEL, M. A.; VAN DEN BORNE, H.; VINCKEN, J. P.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 94–105, 2007.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 348–356, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.035>>.

KATZ, S.; BEATSON, R. P.; SCALLON, A. M. The determination of strong and weak acidic groups in sulfite pulps. **Svensk Papperstidning**, v. 87, n. 6, p. 48–53, 1984.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Review Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p.1515–1523, 2009.

KHALFAOUI, M. et al. Statistical thermodynamics of adsorption of dye DR75 onto natural materials and its modifications: Double-layer model with two adsorption energies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 3134–3144, 2014.

KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification and characterization of an α -D-Glucuronidase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p.511–517, 1989.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>>.

KÖHNKE, T., ÖSTLUND, Å., & BRELID, H. Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: Influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2633–2641, 2011. <http://doi.org/10.1021/bm200437m>

KOLENOVÁ, K.; VRŠANSKÁ, M.; BIELY, P. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 338–345, 2006.

KORMELINK F.J.M.; SEARLE-VAN LEEUWEN M.J.F.; WOOD T.M.; VORAGEN A.G.J. Purification and characterization of a (1,4)- β -D- arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 753–758, 1993a.

KORMELINK, F. J.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, a G. Mode of action of (1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase (AXH) and alpha-L-arabinofuranosidases on alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. **Carbohydrate Research**, v. 249, n. 2, p. 345–353, 1993b.

KÖHNKE, T., ÖSTLUND, Å., & BRELID, H. Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: Influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2633–2641, 2011. <http://doi.org/10.1021/bm200437m>

KONN, J.; HOLBOM, B.; NICTULL, O. Chemical reactions chemimechanical pulping: material balances of wood components in a CTMP process. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 28, p. 395-399, 2002.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), **Biochemical Engineering Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 57, p. 45–126.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 100, n. 18, p. 4203–13, set. 2009.

KUMAR, G. P.; PUSHPA, A.; PRABHA H. A review on Xylooligosaccharides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 8, p. 71-74, 2012.

LAINE, C.; HARLIN, A.; HARTMAN, J.; HYVÄRINEN, S.; KAMMIOVIRTA, K.; KROGERUS, B.; PAJARI, H.; RAUTKOSKI, H.; SETÄLÄ, H.; SIEVÄNEN, J.; UOTILA, J.; VÄHÄ-NISSI, M. Hydroxyalkylated xylans - Their synthesis and application in coatings for packaging and paper. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 692–704, 2013.

LAURITO-FRIEND, D. F.; MENDES, F. M.; REINOSO, F. M.; FERRAZ, a.; MILAGRES, a. M. F. 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.

LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1368–1376, 2009.

LI, J.; KISARA, K.; DANIELSSON, S.; LINDSTRÖM, M.E.; GELLERSTEDT, G. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1442–1449, 2007.

LI, Z.; JIANG, Z.; FEI, B.; CAI, Z.; PAN, X. Comparison of bamboo green, timber and yellow in sulfite, sulfuric acid and sodium hydroxide pretreatments for enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 91–99, 2014.

LI, H. Q.; JIANG, W.; JIA, J. X.; XU, J. pH pre-corrected liquid hot water pretreatment on corn stover with high hemicellulose recovery and low inhibitors formation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 292–299, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.089>

LI, F.; REN, S.; ZHANG, W.; XU, Z.; XIE, G.; CHEN, Y., PENG, L. Arabinose substitution degree in xylan positively affects lignocellulose enzymatic digestibility after various NaOH/H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 629–637, 2013.

LI, F.; ZHANG, M.; GUO, K.; HU, Z.; ZHANG, R.; FENG, Y., Peng, L. High-level hemicellulosic arabinose predominately affects lignocellulose crystallinity for genetically enhancing both plant lodging resistance and biomass enzymatic digestibility in rice mutants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 4, 514–525, 2015. <https://doi.org/10.1111/pbi.12276>

MARRIOTT, P. E.; GÓMEZ, L. D., MCQUEEN-MASON, S. J. Tansley review Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. **New Phytologist**, v. 209, p. 1366–1381, 2016.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C.; BARBOSA, M. H.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A molecular description of cellulose biosynthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 895–921, 2015.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. 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.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. 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.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 39, p. 441–448, 2016.

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

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–10, 2016.

NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, p. 1245–1251, 2002.

OLIVEIRA, D. M.; FINGER-TEIXEIRA, A.; RODRIGUES MOTA, T.; SALVADOR, V. H.; MOREIRA-VILAR, F. C.; CORREA MOLINARI, H. B.; CRAIG MITCHELL, R. A.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; DANTAS DOS SANTOS, W. Ferulic acid: A key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1224–1232, 2015.

OTIENO, D. O., AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannoooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 285–292, 2012b.

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.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. Lignocellulosic ethanol : Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015. Disponível em:

PAULY, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; YORK, W. S. Molecular domains of the cellulose / xyloglucan network in the cell walls of higher plants. **The Plant Journal**, v. 20, n. 6, p. 629–639, 1999.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 54, n. 4, p. 559–68, 2008.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; ST?HLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701–720, 2014.

PEREIRA, C. S.; SILVEIRA, R. L.; DUPREE, P.; SKAF, M. S. Effects of Xylan Side-Chain Substitutions on Xylan-Cellulose Interactions and Implications for Thermal Pretreatment of Cellulosic Biomass. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 4, p. 1311–1321, 2017.

POELKING V.G.C, GIORDANO A., RICCI-SILVA M.E., WILLIAMS T.C.R., PEÇANHA D.A., VENTRELLA M.C., RENCORET J., RALPH J., BARBOSA M.H.P., LOUREIRO M. (2015)

Analysis of a modern hybrid and an ancient sugarcane implicates a complex interplay of factors in affecting recalcitrance to cellulosic ethanol production. **PLoS One**, v. 10, n. 8: e0134964.

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

QING, Q.; WYMAN, C. E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 18, 2011. Disponível em:

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9624-9630. 2010.

QUINLAN, R.J.; SWEENEY, M.D.; LO LEGGIO L.; OTTEN, H.; POULSEN, J.-C.N.; JOHANSEN, K.S.; KROGH, K.B.R.M.; JØRGENSEN, C.I.; TOVBORG, M.; ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C.P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G.J; WALTON, P.H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.

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

RALPH SA, RALPH J, LANDUCCI L. (2009) NMR database of lignin and cell wall model compounds. https://www.glbrc.org/databases_and_software/nmrdatabase/ (accessed: January 2009).

RASTALL, B. Functional oligosaccharides: application and manufacture. 2010. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 2010. 1:305–39

RENNIE, E. a.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.013>>.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R. P.; MÄKELÄ, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SELIG, M. J.; THYGESEN, L. G.; FELBY, C. MASTER, M.R. Debranching of soluble wheat arabinoxylan dramatically enhances recalcitrant binding to cellulose. **Biotechnol Lett.** v. 37 p. 633–641, 2015.

SELIG, M. J.; THYGESEN, L. G.; FELBY, C. Correlating the ability of lignocellulosic polymers to constrain water with the potential to inhibit cellulose saccharification. **Biotechnology for Biofuels** p. 1–10, 2014.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SINDHU, R., GNANSOUNOU, E., BINOD, P., & PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203–215, (2016).

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 176, 2017.

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.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011.

SIMMONS, T.J., MORTIMER, J. C., BERNARDINELL, O. D., POPPLER, S. A., BROWN, S. P.; EDUARDO, R.; DUPREE, R.; DUPREE, P. Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. **NATURE COMMUNICATIONS**. p. 1–9, 2016.

SILVA, D. G. **Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual**. 100 p. (Mestrado), Departamento de Biotecnologia: Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, 2016.

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

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory. Technical Report, 14p., 2008.

STOKKE, D.; WU, Q.; HAN, G. **Introduction to Wood and Natural Fiber Composites**. S.l: Willey Blackwell, 2014. Cap. 2. p. 19-57.

SUN, J.X.; SUN,X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195-204, 2004.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 111–122, 2000.

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.

TELEMAN, A. Hemicelluloses and Pectins. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: De Gruyter, 2009, V.1. cap. 5, p. 101-120.

Teleman A., I. P. T. On the accessibility and structure of xylan in birch kraft pulp. **Cellulose**, v. 8, n. 3, p. 209–215, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1013195030404>

TIAN, D.; CHANDRA, R. P.; LEE, J.-S.; LU, C.; SADDLER, J. N. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 157, 2017.

TÖRRÖNEN, A.; ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo- β -1,4-xylanases. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 137–149, 1997.

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**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VARDAKOU, M.; KATAPODIS, P.; TOPAKAS, E.; KEKOS, D.; MACRIS BJ.; CHRISTAKOPOULOS P. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 5, p. 107–12. 2004.

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

VÁRNAI, A.; COSTA, T. H.; FAULDS, C. B.; MILAGRES, A. M.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 153, 2014.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching : a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WAN, Q.; ZHANG, Q.; HAMILTON-BREHM, S.; WEISS, K.; MUSTYAKIMOV, M.; COATES, L.; LANGAN, P.; GRAHAM, D.; KOVALEVSKY, A. X-ray crystallographic studies of family 11 xylanase Michaelis and product complexes: Implications for the catalytic mechanism. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 1, p. 11–23, 2014.

WANG, X., LI, K., YANG, M., & ZHANG, J. Hydrolyzability of xylan after adsorption on cellulose: Exploration of xylan limitation on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, 148, 362–370, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.069>

WENDE, G.; FRY, S.C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of Grass xylans. **Phytochemistry**, v.44, p.1011-1018,1997.

WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, p.75–90,1988.

WYMAN, C. E. et al. Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11052–11062, 2011.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.

YANG, Q.; PAN, X. Pretreatment of Agave americana stalk for enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 336–340, 2012.

YANG, C. H.; YANG, S. F.; LIU, W. H. Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3955–3959, 2007.

YAO, S., NIE, S., YUAN, Y., WANG, S., & QIN, C. Efficient extraction of bagasse hemicelluloses and characterization of solid remainder. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 21–27, 2015.

YU, X.; MINOR, J.L.; ATALLA, R.H. Mechanism of action of Simons' stain. **Tappi Journal**, v. 78, p. 175-180, 1995.

ZHANG, J.; TANG, M.; VIIKARI, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 8–12, 2012.

ZHANG, J.; TUOMAINEN, P.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9090–9095, 2011.

ZHANG, D. S.; YANG, Q.; ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Sulfite (SPORL) pretreatment of switchgrass for enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 127–134, 2013.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J.; WANG, G. S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–8, abr. 2009.

APÊNDICE

Velocidades de conversão para xilana e celulose residual

Tabela S1: Primeira extração com Luminase

Tempo (horas)	Velocidade de extração de arabinoxilana	
	Extração em tampão	Extração enzimática
0-2	2,48±0,20	13,99±0,18
2-4	0,99±0,44	1,98±0,40
4-6	-0,21±0,23	1,47±0,32
6-8	0,15±0,40	2,05±0,60
8-24	0,4±0,02	0,32±0,03
24-48	0,09±0,04	0,12±0,03

Tabela S2: Segunda extração com Luminase

Tempo (horas)	Velocidade de extração de arabinoxilana	
	Extração em tampão	Extração enzimática
0-2	4,73±0,21	6,49±0,15
2-4	0,29±0,22	0,70±0,21
4-6	0,40±0,13	0,75±0,08
6-8	-0,15±0,09	0,15±0,62
8-24	0,08±0,03	0,32±0,07
24-48	0,10±0,04	0,21±0,02

Tabela S3: Velocidades da cinética da sacarificação do material pré-tratado, e pré-tratado e extraído com enzima e tampão pela segunda vez.

Tempo (h)	Velocidade de conversão do bagaço prétratado		Velocidade de conversão do bagaço prétratado extraído com tampão		Velocidade de conversão do bagaço prétratado extraído com Enzima	
	Celulose	Xilana	Celulose	Xilana	Celulose	Xilana
0-1	15,79 ^a ±0,59	11,05 ^b ±0,30	17,68 ^a ±1,00	11,65 ^b ±0,57	20,56 ^a ±0,53	17,96 ^b ±0,29
1-2	9,28 ^a ±0,55	5,90 ^b ±0,40	9,23 ^a ±0,47	7,10 ^b ±0,31	10,80 ^a ±0,47	7,15 ^b ±0,46
2-4	6,00 ^a ±0,43	4,29 ^b ±0,30	6,01 ^a ±0,55	4,63 ^b ±0,47	7,05 ^a ±0,32	3,73 ^b ±0,27
4-6	4,48 ^a ±0,21	3,17 ^b ±0,19	5,57 ^a ±0,11	4,25 ^b ±0,11	5,02 ^a ±0,29	3,31 ^b ±0,71
6-8	3,00 ^a ±0,42	2,34 ^a ±0,46	3,68 ^a ±0,2	3,36 ^a ±0,78	4,13 ^a ±0,29	3,32 ^b ±0,39
8-24	1,75 ^a ±0,02	1,51 ^b ±0,06	1,80 ^a ±0,13	1,62 ^a ±0,13	1,67 ^a ±0,15	1,50 ^a ±0,15
24-48	0,63 ^a ±0,04	0,77 ^b ±0,03	0,54 ^a ±0,08	0,83 ^b ±0,09	0,29 ^a ±0,04	0,67 ^b ±0,08
48-72	0,12 ^a ±0,03	0,15 ^a ±0,04	0 ^a	0,34 ^b ±0,04	0,06 ^a ±0,04	0,34 ^b ±0,06

O valor ± indica o desvio padrão. Letras diferentes entre as velocidades da celulose e xilana indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

Tabela S4: Velocidades da cinética da sacarificação do material pré-tratado, e pré-tratado e extraído com enzima e tampão pela segunda vez.

Tempo (h)	Velocidade de conversão do bagaço prétratado		Velocidade de conversão do bagaço prétratado extraído com tampão		Velocidade de conversão do bagaço prétratado extraído com Enzima	
	Celulose	Xilana	Celulose	Xilana	Celulose	Xilana
0-1	15,79 ^a ±0,59	11,05 ^b ±0,30	19,29 ^a ±0,94	12,83 ^b ±0,71	20,81 ^a ±0,98	17,06 ^b ±0,72
1-2	9,28 ^a ±0,55	5,90 ^b ±0,40	9,51 ^a ±0,22	6,06 ^b ±0,57	7,45 ^a ±0,24	4,32 ^b ±0,20
2-4	6,00 ^a ±0,43	4,29 ^b ±0,30	4,26 ^a ±0,64	3,33 ^a ±0,80	6,56 ^a ±0,12	4,52 ^b ±0,43
4-6	4,48 ^a ±0,21	3,17 ^b ±0,19	5,53 ^a ±0,47	3,86 ^b ±0,75	3,85 ^a ±0,20	2,96 ^b ±0,12
6-8	3,00 ^a ±0,42	2,34 ^a ±0,46	3,51 ^a ±0,93	2,26 ^a ±0,49	3,99 ^a ±0,58	3,37 ^a ±0,60
8-24	1,75 ^a ±0,02	1,51 ^b ±0,06	1,65 ^a ±0,19	1,66 ^a ±0,03	1,65 ^a ±0,08	1,70 ^a ±0,11
24-48	0,63 ^a ±0,04	0,77 ^b ±0,03	0,39 ^a ±0,16	0,64 ^a ±0,05	0,50 ^a ±0,04	0,70 ^b ±0,04
48-72	0,12 ^a ±0,03	0,15 ^a ±0,04	0,05 ^a ±0,07	0,05 ^a ±0,05	0,06 ^a ±0,06	0,01 ^a ±0,03

O valor ± indica o desvio padrão. Letras diferentes entre as velocidades da celulose e xilana indicam diferença estatística significativa (p<0,05)