UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CELSO SANTI JUNIOR

Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de
cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem

Lorena - SP

2011

CELSO SANTI JUNIOR

Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem

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

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Lorena – SP

2011

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.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Santi Junior, Celso

Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem / Celso Santi Junior. – 2011.

104 p. : il.

Dissertação (Mestre 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.

Orientador: Walter de Carvalho

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Composição química 3. Secagem 4. Hidrólise enzimática. I. Título

664.113 - CDU

Dedico este trabalho a toda minha família. Principalmente aos meus pais, pelo amor e suporte, e ao meu saudoso avô Wilson, companheiro inesquecível.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Walter de Carvalho, pela orientação, apoio e dedicação incomparável na realização deste trabalho.

À minha irmã Adriana, por todo amor e zelo e à minha sobrinha Julia, pois “no final do dia, é tudo por ela”.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e pelo exemplo que são.

À minha família de São Paulo, pelo apoio, incentivo e suporte.

Aos meus avós, Wilson e Enedina, *in memoriam*, saudades.

Aos companheiros de laboratório, Hugo, Robson, Sérgio, Felipe, Paula, Jose, Victor, Germano, Fernanda, Débora, Luciane e Djalma, pelas ajudas e por tornar a rotina de laboratório mais prazerosa.

Aos amigos de departamento, por todos os momentos de descontração e alegria.

Aos meus grandes “amigos-irmãos”, pela companhia e amor desde sempre.

À Mariana, por todo amor e companheirismo durante mais uma etapa da minha vida.

À professora Adriane Maria Ferreira Milagres, pelo auxílio e suporte no cumprimento desta etapa.

Ao professor Durval e ao Jorge Rosa, pela colaboração nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao CNPq e a CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

SANTI-JUNIOR, C. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem.** 2011. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2012.

Os materiais lignocelulósicos possuem características que limitam a sacarificação enzimática da celulose. Entre essas características pode-se classificar a porosidade como uma das mais importantes, sendo usualmente mensurada pela técnica de exclusão de solutos. A secagem do material também pode aumentar sua recalcitrância por meio do fenômeno de hornificação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do teor de lignina e da secagem na porosidade e na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. A partir de uma amostra *in natura* quatro amostras com teores de lignina decrescentes foram geradas, utilizando o método de deslignificação por clorito-ácido. Uma fração destas amostras foi seca ao ar em temperatura ambiente e o restante teve seu teor de umidade mantido. A análise das modificações estruturais promovidas pelo tratamento citado foi feita utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). A porometria das amostras, determinada via técnica de exclusão de solutos, foi realizada utilizando 1 g de massa seca de amostra e 20 g de soluções de sondas moleculares com concentração de 1,5% (m/m); após 24 h sob agitação manual ocasional a 25 °C a determinação da distribuição do volume e área superficial de poros foi realizada com base na redução da concentração inicial da solução. O valor de retenção de água das amostras foi calculado via centrifugação. As amostras foram submetidas à sacarificação com cargas enzimática e de surfactante de 10 FPU e 0,025 g de Tween 20 por grama de bagaço, respectivamente. A reação ocorreu a 45 °C sob agitação de 150 rpm e a conversão de celulose foi medida após 2, 8, 24 e 72 h. As amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas apresentaram 14,2; 9,2; 8,0 e 5,9% de lignina, respectivamente, enquanto que a amostra *in natura* foi composta por 20,7%. Por meio das análises feitas por MEV, pôde-se observar que a remoção de lignina acarretou em uma descompactação estrutural dos feixes vasculares. As amostras com maiores teores de lignina apresentaram menores volumes e áreas superficiais de poros e piores conversões enzimáticas de celulose. Para a amostra *in natura* o volume total de poros foi de 0,89 mL/g de bagaço enquanto que para as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas este volume foi de 1,19, 1,77, 1,92 e 2,21 mL/g de bagaço, respectivamente. A secagem reduziu o volume total de poros das amostras deslignificadas por 2, 3 e 4 horas para 1,47, 1,55 e 1,98 mL/g de bagaço respectivamente. Os valores de retenção de água foram similares aos valores de volume total de poros obtidos via técnica de exclusão de solutos. Enquanto cerca de apenas 20% da celulose da amostra *in natura* foi convertida após 72 h de sacarificação, a amostra com o menor teor de lignina apresentou conversão próxima a 100%. A secagem das amostras deslignificadas não alterou as taxas nem os rendimentos de sacarificação. Pode-se concluir então que o teor de lignina desempenha um papel importante na limitação da sacarificação enzimática da celulose, e que sua remoção implica num aumento do volume de poros do material.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Composição química. Secagem. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

SANTI-JUNIOR, C. **Pore size distribution and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples submitted to delignification and drying.** 2011. 104 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena-SP, 2012.

Lignocellulosic materials present characteristics that limit the enzymatic saccharification of cellulose. Among these features, the porosity, usually measured by the solute exclusion technique, can be classified as one of the most important. Drying of the material can also increase its recalcitrance by the hornification phenomenon. In this context, this study aimed to evaluate the influences of lignin content and drying in the porosity and enzymatic saccharification of the sugar cane bagasse. From an *in natura* sample, other four samples with decreasing lignin contents were generated using the method of delignification by acid chlorite. A fraction of these samples was air dried at room temperature and the remainder one was kept wet. The analysis of the structural changes promoted by the aforementioned treatment was performed using scanning electron microscopy (SEM). The samples porometry, carried out using the solute exclusion technique, was performed using 1 g of sample (dry weight) and 20 g of solutions of molecular probes with concentration of 1.5% (w/w); after 24 h under occasional manual agitation at 25 °C, determination of the volume and surface area distribution of pores was carried out based on the reduction of the initial concentration of the solution. The water retention value of the samples was calculated by centrifugation. The samples were subjected to enzymatic saccharification with enzyme and surfactant loads of 10 FPU and 0.025 g of Tween 20 per gram of bagasse, respectively. The reaction was carried at 45 °C under agitation of 150 rpm and the cellulose conversion was measured after 2, 8, 24 and 72 h. Sample delignified by 1, 2, 3 and 4 hours showed 14.2, 9.2, 8.0 and 5.9% of lignin content, respectively, while the *in natura* sample was composed of 20.7%. Through SEM analysis, it was observed that the lignin removal resulted in a material with the vascular bundles structurally less compact and ordered. The samples with higher contents of lignin had lower volumes and surface areas of pores and worse enzymatic cellulose conversions. For the *in natura* sample the total pore volume was 0.89 mL/g of bagasse while for the samples delignified by 1, 2, 3 and 4 hours this volume was 1.19, 1.77, 1.92 and 2.21 mL/g of bagasse, respectively. Drying reduced the total pore volume of samples delignified by 2, 3 and 4 hours to 1.47, 1.55 and 1.98 mL/g of bagasse, respectively. The water retention values were similar to the total pore volume obtained by the solute exclusion technique. While only about 20% of the cellulose in the *in natura* sample was converted after 72 h of saccharification, the sample with the lowest lignin content showed a conversion close to 100%. Drying of the delignified samples did not change rates and yields of saccharification. It can be concluded then that the lignin content plays an important role on limiting the enzymatic saccharification of cellulose, and that its removal implies in increase in the pore volume of the material.

Keywords: Sugarcane bagasse. Chemical composition. Drying. Enzymatic hydrolysis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1.	Produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos	12
2.2.	Materiais lignocelulósicos	14
2.2.1.	Celulose	15
2.2.2.	Hemicelulose	17
2.2.3.	Lignina.....	19
2.3.	Bagago de cana-de-açúcar	21
2.4.	Hidrólise enzimática da celulose	23
2.4.1.	Variáveis que afetam a hidrólise enzimática da celulose	26
2.4.1.1.	Cristalinidade.....	26
2.4.1.2.	Grau de polimerização (DP)	26
2.4.1.3.	Tamanho de partícula	27
2.4.1.4.	Conteúdo e distribuição de hemicelulose e lignina	28
2.4.1.5.	Porosidade da parede celular	29
2.4.1.6.	Hornificação	30
2.5.	Métodos para caracterização da porosidade de materiais lignocelulósicos.....	31
2.5.1.	Termoporometria por calorimetria de escaneamento diferencial (DSC).....	32
2.5.2.	Termoporometria por ressonância magnética nuclear de prótons (¹ H-NMR).....	33
2.5.3.	Cromatografia de exclusão por tamanho inversa (ISEC)	34
2.5.4.	Coloração de Simons	34
2.5.5.	Exclusão de solutos	35
2.5.5.1.	Teoria.....	35
2.5.5.2.	Sondas Moleculares	37
2.5.5.3.	Utilização	37
2.5.5.4.	Precauções	38
2.5.5.5.	Interpretação dos dados	39
2.6.	Relação entre o valor de retenção de água e o ponto de saturação da fibra	43
3.	OBJETIVO.....	46
4.	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1.	Bagago de cana-de-açúcar	47

4.2.	Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar com clorito de sódio em meio ácido, seguida ou não por secagem.....	47
4.2.1.	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
4.3.	Análise composicional das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	48
4.4.	Determinação da distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.....	50
4.4.1.	Avaliação da adsorção inespecífica de dextrana.....	50
4.4.2.	Análise via técnica de exclusão de solutos	51
4.5.	Determinação do valor de retenção de água (WRV) das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	54
4.6.	Sacarificação enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	55
4.6.1.	Definição das cargas de enzima e surfactante	56
4.6.2.	Determinação da atividade de celulases totais.....	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1.	Composição química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido	58
5.2.	Análise da morfologia de amostras de bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura.....	61
5.3.	Determinação da distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido.....	63
5.3.1.	Avaliação da adsorção inespecífica de dextrana.....	63
5.3.2.	Análise via técnica de exclusão de solutos	65
5.4.	Retenção de água pelas amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido	77
5.5.	Sacarificação enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido	80
6.	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos compreendem a maior parte da biomassa vegetal encontrada na natureza e são considerados como um dos recursos biológicos mais abundantes e subutilizados do planeta. Obtidos a partir de resíduos da agroindústria, de angiospermas e gimnospermas, eles podem ser uma fonte renovável de energia e combustível. No Brasil o maior exemplo de aplicação da biomassa é a produção de etanol a partir da sacarose da cana-de-açúcar. Um dos subprodutos desta produção, o bagaço da cana, contém em sua estrutura aproximadamente 40-50% de celulose, que por ação enzimática pode ser clivada em moléculas de glicose, que após fermentação darão origem ao etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico. Entretanto, a sua produção em escala comercial esbarra em limitações técnicas que tornam o processo economicamente inviável. Por exemplo, a conversão enzimática da celulose é afetada negativamente por diversas características do material (cristalinidade da celulose, conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose, porosidade, entre outras).

A estrutura porosa da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar, e dos demais materiais lignocelulósicos, é determinada pelo conteúdo e distribuição de lignina e hemiceluloses. Estes dois componentes formam uma estrutura amorfa que está ligada e envolve as fibrilas elementares de celulose, formando um obstáculo que dificulta ou até impede o acesso de grandes moléculas a estas fibrilas. Sendo assim, as celulasas, enzimas responsáveis pela conversão da celulose à glicose, têm sua ação comprometida, ocasionando baixa taxa e rendimento de hidrólise, visto que esses parâmetros são ditados pelo número de ligações glicosídicas que lhe são acessíveis. Deste modo, visando o aumento tanto desta taxa como deste rendimento, diferentes pré-tratamentos são empregados no bagaço de cana com o objetivo de aumentar tanto o número quanto o tamanho dos poros da parede celular do bagaço. Estes pré-tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos, e têm como objetivos a retirada da fração não-celulósica ou a diminuição da cristalinidade das fibrilas elementares de celulose. Finalmente, com um material mais susceptível a ação enzimática, ou seja, mais poroso, a taxa e o rendimento de conversão de celulose crescem, aumentando a sacarificação deste polissacarídeo.

De fato, os pré-tratamentos acarretam em um aumento da digestibilidade da celulose, confirmando a importância deste passo antes da ação enzimática. Entretanto, uma medida quantitativa das mudanças estruturais do bagaço (formação de novos poros e/ou

aumento de poros existentes na parede celular), ocasionadas por estes pré-tratamentos, raramente é feita. Diversos métodos podem ser aplicados para o estudo da porosidade do material lignocelulósico. No entanto, poucos podem ser empregados no material úmido. Esta limitação torna estes métodos inadequados quando o objetivo do estudo é uma análise quantitativa do volume total de poros no material *in natura*, já que uma vez seco, muitos poros colapsam e podem não ser recuperados integralmente após reidratação. Dentre os métodos que podem ser aplicados a uma amostra úmida estão: a termoporometria por calorimetria de escaneamento diferencial e por ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN), a cromatografia de exclusão por tamanho inversa, a coloração com corante de Simons e a técnica de exclusão de solutos.

A técnica de exclusão de solutos se baseia na acessibilidade de materiais porosos (amostras de bagaço deslignificado, no caso do presente estudo) às moléculas de soluto que variam em massa molar de 180 a 2×10^6 g/mol, como proposto por Stone e Scallan (1968). O princípio desta técnica é: um corpo poroso úmido apresenta seus poros completamente cheios de água. Deste modo, quando adicionado a ele uma solução de solutos pequenos, o esperado é que boa parte destes solutos se difunda para dentro dos poros de tamanho maior ou igual ao seu, equilibrando a concentração dentro e fora dos poros, e consequentemente, reduzindo a concentração inicial da solução. Entretanto, é importante ressaltar que estas moléculas podem se dissolver em três sítios de acúmulo de água diferentes na fibra, além dos poros da parede celular: no lúmen, na superfície da fibra, e nos interstícios entre as fibras. Com um aumento gradual do tamanho dos solutos, o esperado é uma limitação na difusão destes para dentro dos poros do material, ocasionando em uma menor diferença entre as concentrações final e inicial da solução. A partir de um certo tamanho de soluto em diante, ocorre uma estabilização na diferença entre estas concentrações. Neste ponto, conhecido como ponto de saturação da fibra, os solutos utilizados são tão grandes que não entram em poro algum da parede celular do material. Com os valores das concentrações iniciais e finais pode-se calcular o volume de água que foi acessível aos solutos utilizados e assim, sabendo-se o tamanho destes, pode-se inferir a distribuição do tamanho dos poros existentes no material. Neste cálculo o volume de água acessível às sondas de tamanho maior ou igual às aquelas correspondentes ao ponto de saturação da fibra é descontado, já que se trata de um volume de água que está fora dos poros da parede celular (água dos três sítios citados anteriormente). Apenas alguns solutos (polietilenoglicol, dextrana, glicose, maltose e outros oligossacarídeos) podem ser utilizados para a aplicação desta técnica, já que estes devem satisfazer algumas exigências, tais como: o soluto não pode ser

fisicamente ou quimicamente adsorvido pelo material estudado; deve estar disponível em uma grande faixa de massas molares; cada fração de massa molar deve ser monodispersa; não pode apresentar carga; deve ter seu tamanho e forma em solução conhecidos, e sua forma deve ser preferivelmente esférica.

Deste modo o presente estudo propôs, em um primeiro momento, implementar a técnica de exclusão de solutos para avaliar as mudanças ocorridas na estrutura porosa do bagaço de cana pela remoção seletiva de lignina, via reação com clorito de sódio em meio ácido, e pela secagem ao ar em temperatura ambiente. Posteriormente, por meio de ensaios de hidrólise enzimática da celulose, uma correlação entre porosidade e susceptibilidade à sacarificação foi investigada. Sendo assim a proposta deste estudo foi envidar esforços para conhecer melhor a estrutura física do bagaço de cana, conhecimento este que aliado às informações já existentes sobre sua estrutura química fornece dados mais completos sobre a influência de pré-tratamentos na acessibilidade de enzimas à celulose. O fluxograma apresentado na Figura 1 esquematiza a sequência experimental seguida para a realização do presente estudo.

Figura 1. Sequência experimental seguida para a realização do presente estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos

O interesse no uso de biocombustíveis em todo o mundo tem crescido fortemente nos últimos anos devido às limitadas reservas de petróleo, as preocupações com a mudança climática a partir das emissões dos gases do efeito estufa e o desejo de promover economias domésticas rurais (BALAT; BALAT, 2009). Os biocombustíveis produzidos a partir de recursos renováveis (tais como plantas ou resíduos orgânicos) podem ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis e a produção de CO₂, mitigando o aquecimento global. Esta diminuição na emissão de CO₂ se deve ao fato que o CO₂ liberado na queima destes biocombustíveis é igual ao consumido pela planta durante a fotossíntese e, portanto, não aumenta a quantidade líquida de CO₂ na atmosfera (NAIK et al., 2010).

Segundo a Agência Internacional de Energia (IEA, do inglês International Energy Agency) os biocombustíveis podem ser de primeira ou de segunda geração. Por definição os biocombustíveis de primeira geração são aqueles que utilizam como matéria-prima, açúcar, amido e culturas oleaginosas. Enquanto que os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir dos materiais lignocelulósicos (materiais compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina) (EISENTRAUT, 2010).

Os três principais tipos de biocombustíveis de primeira geração produzidos comercialmente, contando com tecnologia de produção bem estabelecida são: biodiesel (bio-ésteres), etanol e biogás. O biodiesel é um substituto do diesel e é produzido através da transesterificação de óleos vegetais e óleos e gorduras residuais, podendo ser utilizado como substituto completo com pequenas modificações no motor. O bioetanol é um substituto da gasolina e é um substituto completo nos chamados veículos flex. É derivado do açúcar ou amido através da fermentação. O biogás, ou biometano, é um combustível que pode ser usado em veículos movidos à gasolina com pequenas adaptações. Pode ser produzido através da digestão anaeróbia de esterco liquefeito e outras matérias-primas de fácil digestão. No momento, o bioetanol, o biodiesel e o biogás são produzidos a partir de commodities, que também são usadas para alimentação. A principal desvantagem dos combustíveis de primeira geração é o debate alimento versus combustível, já que uma das

razões para a alta nos preços dos alimentos é o aumento da produção destes combustíveis (NAIK et al., 2010).

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir da biomassa de uma forma mais sustentável, que é verdadeiramente neutra de carbono ou até mesmo carbono negativo em termos de seu impacto nas concentrações de CO₂. No contexto da produção de biocombustíveis, o termo “biomassa vegetal” se refere principalmente aos materiais lignocelulósicos já que estes representam a maioria dos materiais baratos, abundantes e não alimentares disponíveis a partir de plantas. Atualmente, a produção desses combustíveis não é rentável porque há uma série de barreiras técnicas que precisam ser superadas antes que seu potencial possa ser concretizado. A biomassa vegetal representa um dos recursos biológicos mais abundantes e subutilizados do planeta, sendo visto como uma promissora fonte de matéria-prima para a produção de combustíveis (NAIK et al., 2010). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations) no período de um ano, entre 2008 e 2009, foram produzidos no mundo cerca de 5 bilhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos (Tabela 1), considerando que uma tonelada de resíduos agrícolas contém de 10 a 17 GJ de energia (variação devido o teor de umidade), de acordo com os fatores de conversão utilizados pelo Laboratório Nacional de Oak Ridge, calcula-se que a biomassa vegetal poderia ter gerado 50-85 EJ (1 ExaJoule = 1×10^{18} J), o equivalente a 10-17% da demanda energética mundial em 2008, que foi de aproximadamente 500 EJ (dados da IEA).

Tabela 1. Produção mundial de resíduos lignocelulósicos (adaptado de KUHAD et al., 2011)

Fonte	Produção no ano 2008/2009 (milhões de toneladas)
Trigo	658,0
Cereais secundários	1088,6
Cereais	2191,9
Arroz	445,3
Soja	220,8
Semente de algodão	44,4
Colza	48,0
Amendoin (casca)	35,5
Girassol	27,8
Semente de palma	10,8
Copra	5,3
Açúcar	168,0
Total	4944,4

A biomassa vegetal pode ser simplesmente queimada para produzir calor e eletricidade. No entanto, existe um grande potencial no seu uso para a produção de biocombustíveis líquidos já que ela é composta principalmente de paredes celulares (lignocelulose) das plantas, as quais são compostas tipicamente por 75% de polissacarídeos. A conversão desta lignocelulose em combustíveis líquidos, como o etanol, exige uma série de operações unitárias básicas, incluindo pré-tratamento, produção de enzimas, hidrólise e fermentação. Sendo assim as pesquisas atuais concentram seus esforços na redução do custo destes processos, otimizando, entre outros: a conversão dos polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) a monômeros, a fermentação combinada de xilose e glicose, o gasto energético na etapa de pré-tratamento e a conversão da lignina em produtos de maior valor agregado (NAIK et al., 2010).

2.2. Materiais lignocelulósicos

A lignocelulose é o material fibroso que forma a arquitetura da parede celular das plantas (LANGE, 2007). Ela é composta principalmente por celulose, hemiceluloses, lignina e pequenas quantidades de pectina, proteína, extrativos e cinzas (materiais inorgânicos). Celulose, hemiceluloses e lignina estão presentes em quantidades variáveis nas diferentes partes da planta e estão intimamente associadas para formar a estrutura da parede celular vegetal (Figura 2).

Figura 2. Associações entre os três componentes principais dos materiais lignocelulósicos (adaptado de BOUDET et al., 2003)

A composição da lignocelulose depende da espécie do vegetal, idade e condições de crescimento. A distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina bem como os conteúdos dos diferentes açúcares da hemicelulose e precursores da lignina variam significativamente entre diferentes vegetais (Tabela 2) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Tabela 2. Composição de diferentes materiais lignocelulósicos (adaptado de JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007)

Material	[% da massa seca total]				
	Glicose	Xilose	Arabinose	Manose	Lignina
Folhosas					
Birch	38,2	18,5	- ^a	1,2	22,8
Willow	43,0	24,9	1,2	3,2	24,2
Coníferas					
Spruce	43,4	4,9	1,1	12,0	28,1
Pine	46,4	8,8	2,4	11,7	29,4
Gramíneas					
Wheat straw	38,2	21,2	2,5	0,3	23,4
Rice straw	34,2	24,5	n.d. ^b	n.d. ^b	11,9
Corn stover	35,6	18,9	2,9	0,3	12,3

^aAbaixo do limite de detecção.

^bNão determinado.

2.2.1. Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, no entanto, existem também vários outros tipos de organismos que produzem celulose como as ascídias (tunicados), os oomicetos (“fungos protistas”) e alguns outros protistas e também bactérias do gênero *Acetobacter*. Ela é um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose, na forma de piranose, unidas por meio de ligações β -(1-4)-glicosídicas (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). O tamanho da cadeia molecular é normalmente especificado como grau de polimerização (DP), ou seja, o número de resíduos de glicose que formam a cadeia, e a sua variação está entre 7.000 e 15.000 para celulose de origem vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989).

Duas unidades de glicose adjacentes são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxila no carbono 1 e 4. Como pode ser observado na Figura 3 a posição β da hidroxila no carbono 1 faz com que o resíduo de glicose subsequente fique de cabeça para baixo em relação ao anterior, ou seja, a configuração β impõem uma rotação de 180° em unidades de glicose alternadas. Sendo assim, a unidade que se repete ao longo da cadeia de celulose é um resíduo de celobiose ao invés do resíduo de glicose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; FENGEL; WEGENER, 1989). Duas ligações de hidrogênio entre resíduos de glicose adjacentes – entre as hidroxilas dos carbonos 6 e 2 e entre o oxigênio do carbono 5 e a hidroxila do carbono 3 (Figura 3) – estabilizam a ligação glicosídica e tornam a estrutura rígida. Existem também ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. Estas ligações intermoleculares estão localizadas entre as hidroxilas dos carbonos 6 e 3 (Figura 4), e são responsáveis pela formação de estruturas supramoleculares, resultantes da agregação das cadeias em fibrilas cristalinas elementares de 36 cadeias de celulose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Figura 3. Representação da estrutura linear da celulose (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

No entanto, a organização superfibrilar da celulose contém além de estruturas altamente ordenadas (cristalinas), estruturas menos ordenadas (semi-cristalinas, ou mesmo amorfas). Tem sido sugerido que esta fração amorfa da celulose está localizada tanto na superfície fibrilar, como em segmentos amorfos das fibrilas, intercalando com segmentos cristalinos. Esta segunda hipótese é suportada pelo fato que a celulose submetida à hidrólise ácida severa produz cadeias de celulose cristalina com um baixo grau de polimerização, cerca de 200 (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Apesar do fato de ser um polímero de glicose, a celulose é insolúvel em água. As pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose são tão fortes que apenas alguns reagentes, incluindo ácidos e bases fortes, soluções concentradas de sal e alguns complexos metálicos são capazes de dissolvê-la. A presença de três grupos hidroxila em cada resíduo

de anidro-glicose na cadeia faz a celulose ser muito higroscópica, e rapidamente adsorve e desorve água nas regiões amorfas, nas quais as hidroxilas não estão envolvidas nas ligações inter-cadeias. A biodegradação da celulose por microrganismos é uma parte fundamental do ciclo do carbono (FENGEL; WEGENER, 1989; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991).

Figura 4. Representação das ligações entre duas cadeias de celulose paralelas (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são carboidratos intimamente associados com a celulose na parede celular. Diferentemente da celulose, elas podem ser formadas por cinco anidro-açúcares neutros, as hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose e as pentoses D-xilose e L-arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de grupos acetila, ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira (Figura 5). Sendo assim, elas são classificadas de acordo com o principal açúcar da cadeia do polímero, como por exemplo: xilana (xiloses ligadas por ligação β -1,4) ou mananas (manoses ligadas também por ligação β -1,4) (FENGEL; WEGENER, 1989; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

As cadeias moleculares das hemiceluloses são muito mais curtas que as da celulose, apresentando um DP variando de 100 até cerca de 200 unidades de açúcares. Outra diferença é a presença de grupos laterais e ramificações em alguns casos (LEWIN; GOLDSTEIN, 1991). As hemiceluloses podem se apresentar tanto na forma de homopolímeros (exemplo: xilana, formado por xilose) ou heteropolímeros (exemplo:

glucomanana, formado por glicose e manose). Seu teor varia de acordo com o tipo de material lignocelulósico. As folhosas, por exemplo, contém mais hemicelulose que as coníferas; entretanto, pode-se admitir um valor médio de cerca de 20% (FERRAZ, 2004).

Além do teor, a composição das hemiceluloses também varia entre diferentes vegetais. Em coníferas a maior parte das hemiceluloses são galactoglucomananas parcialmente acetiladas, que representam aproximadamente 16% da madeira, e em menores quantidades estão as arabinoglucuronoxilanas, de 7 a 15%. Os principais açúcares constituintes nas hemiceluloses de coníferas são em ordem decrescente de abundância: manose, xilose, glicose, galactose e arabinose. Já para as folhosas predomina a xilana parcialmente acetilada que representa de 10 a 35% da madeira, enquanto que um pequeno teor de glucomanana, de 2 a 5% também pode ser encontrado. Nas hemiceluloses de folhosas os principais açúcares constituintes em ordem decrescente de abundância, são xilose, manose, glicose e galactose, com menores quantidades de arabinose e ramnose (LEWIN; GOLDSTEIN, 1991). Por sua vez, as hemiceluloses de plantas pertencentes à família das gramíneas (Poaceae), como por exemplo, arroz, trigo, aveia e cana-de-açúcar, são compostas principalmente de glucuronoarabinoxilanas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Figura 5. Representação da estrutura de uma arabinometilglucuronoxilana (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Embora as hemiceluloses sejam, com certas exceções, insolúveis em água, elas podem ser dissolvidas em álcalis fortes. Hemiceluloses são também mais rapidamente hidrolisadas por ácidos do que a celulose. Suas maiores solubilidade e susceptibilidade à hidrólise em relação à celulose resultam das suas estruturas amorfas e menores massas molares (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991).

2.2.3. Lignina

A incorporação da lignina na parede celular dos vegetais permitiu que estes pudessem conquistar a superfície terrestre, já que ela aumenta as propriedades mecânicas de tal forma que plantas grandes como as árvores com alturas maiores do que 100 metros podem permanecer na posição vertical (FENGEL; WEGENER, 1989). Ela é o constituinte não-carboidrato mais abundante da madeira, que preenche os espaços entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses (BERLIN et al., 2005; EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Ela tem a função de conferir rigidez à parede celular, servir como um cimento unindo células diferentes em um tecido (lamela média), atribuir um caráter hidrofóbico à parede celular além de protegê-la contra a degradação enzimática (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A lignina é polimerizada a partir de três monômeros chamados monolignóis, são eles: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Eles são derivados fenilpropano, com diferenças no número de metoxilas ligadas ao anel. Os álcoois coniferílico e sinapílico apresentam uma e duas metoxilas ligadas ao anel aromático, respectivamente, enquanto que o álcool p-cumarílico nenhuma (Figura 6) (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Figura 6. (A) Representação dos três álcoois precursores da lignina; (B) Estrutura básica do fenilpropano (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Sendo assim os três principais tipos de lignina são reconhecidos de acordo com seu conteúdo de monolignóis (Tabela 3). A lignina das coníferas (Figura 7), chamada de lignina guaiacil ou lignina G, consiste quase que exclusivamente de álcool coniferílico, podendo conter pequenas quantidades de álcool p-cumarílico (principalmente na madeira de compressão), e apenas vestígios de álcool sinapílico, quando presente. A lignina das

folhosas é chamada de guaiacil-siringil ou GS, e contém ambos os álcoois coniferílico e sinapílico, desde proporções equivalentes até níveis nos quais o teor de álcool sinapílico é três vezes maior que o de coniferílico. Algumas ligninas de folhosas podem conter também pequenas quantidades de álcool p-cumarílico. Já a lignina de gramíneas, chamada de HGS, contém todos os três monolignóis e tem maior conteúdo de álcool p-cumarílico que os outros tipos de lignina. Neste tipo de lignina o álcool coniferílico aparece como o monômero mais comum (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Tabela 3. Teor de monolignóis (monômeros de lignina) em diferentes vegetais (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009)

Vegetal	Álcool p-cumarílico (%)	Álcool coniferílico (%)	Álcool sinapílico (%)
Madeira mole	<5	>95	0 ou apenas traços
Madeira dura	0-8	25-50	46-75
Gramíneas	5-33	33-80	20-54

Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligação entre as unidades fenilpropano. As mais abundantes são: -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%). Mais recentemente, estruturas do tipo dibenzodioxocinas, que compreendem um acoplamento múltiplo entre três fragmentos fenilpropano via ligações 5-5, β -O-4 e α -O-4, têm sido descritas como formadoras de partes expressivas da estrutura desta macromolécula (CARVALHO et al., 2009).

A terminologia empregada na química da lignina é baseada numa estrutura básica de fenilpropano (Figura 6B). Nessa terminologia considera-se como carbono 1 do anel aromático aquele que está ligado à cadeia propânica. Os carbonos dessa cadeia lateral são, então, denominados respectivamente de α , β e γ , partindo do carbono ligado ao anel aromático (FERRAZ, 2004).

A lignina é capaz de formar ligações covalentes com algumas hemiceluloses, incluindo ligações éter ou éster entre a unidade de lignina e a hidroxila ou grupo carboxílico do carboidrato ou seu derivado. Por exemplo, ligações benzil éster com o grupo carboxila do ácido 4-O-metil-D-glucurônico na glucuronoxilana. Ligações éter mais estáveis, também conhecidas como complexos lignina carboidrato, podem ser formadas entre a lignina e resíduos de arabinose ou galactose presentes em xilanas e mananas. Em geral, plantas herbáceas, como as gramíneas, têm um menor conteúdo de lignina, enquanto

que coníferas têm o maior conteúdo deste componente (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010).

Figura 7. Representação de uma macromolécula de lignina do tipo G (coníferas) (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

2.3.Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C₄, pertencente ao gênero *Saccharum*, monocotiledônea da família das gramíneas (família Poaceae), composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana (Figura 8) (NOGUEIRA, 2008). As cultivares comerciais em uso foram originalmente derivadas de hibridações interespecíficas, entre a espécie produtora de açúcar, *S. officinarum* ('cana nobre'), e as espécies selvagens *S. spontaneum*, *S. edule*, *S. barbieri* e *S. sinense*, seguidas de uma série de retrocruzamentos com *S. officinarum*, devido a problemas de doenças e de adaptação ecológica (ALBINO; CRESTE; FIGUEIRA, 2006).

Figura 8. Representação esquemática de um exemplar de cana-de-açúcar (NOGUEIRA, 2008).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. De acordo com o segundo levantamento da safra 2011/2012 é previsto que no total cerca de 590 milhões de toneladas de cana passem pelas moendas das usinas brasileiras (valor 5,6% menor que o da safra anterior, 2010/2011) gerando cerca de 37 milhões de toneladas de açúcar, 9 bilhões de litros de etanol anidro e 15 bilhões de litros de etanol hidratado. De acordo com este levantamento a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8,4 milhões de hectares (ha), apresentando um aumento de aproximadamente 378,3 mil hectares em relação a safra anterior. O estado de São Paulo é o maior produtor de cana com uma área de 4,44 milhões ha disponíveis para plantio, representando 53% de toda área de cana do Brasil na safra atual (2011/2012), sendo responsável por 54% da produção nacional (CONAB, 2012).

No Brasil a cana-de-açúcar é usada para se obter açúcar, álcool anidro (aditivo de gasolina e álcool hidratado (combustível renovável para veículos) para o mercado interno e externo (GALVÃO; FORMAGGIO; TISOT, 2005).

Após a extração do caldo da cana-de-açúcar, um resíduo fibroso é obtido, o bagaço da cana-de-açúcar. Ele é um dos principais materiais lignocelulósicos que pode ser encontrado em grandes quantidades, principalmente em países tropicais. Ele é produzido em grandes quantidades pelas indústrias de álcool e açúcar no Brasil, Índia, Cuba, China, México, Indonésia e Colômbia. Em geral, 1 tonelada de cana-de-açúcar gera 140 Kg de bagaço (massa seca), e 540 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (massa seca) são processadas anualmente pelo mundo (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

O bagaço de cana apresenta uma grande heterogeneidade de elementos morfológicos, consistindo de feixes de fibras e outros elementos estruturais como vasos e células de parênquima e epiteliais (Tabela 4) (SANJUÁN et al., 2001). Atualmente ele é usado para a produção de energia elétrica por combustão, a chamada co-geração (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). No entanto, por ser composto em grande parte por polissacarídeos, celulose (40-45%) e hemicelulose (30-35%), ele apresenta grande potencial para ser utilizado como substrato para a produção de etanol celulósico (SANJUÁN et al., 2001). Além disso, o bagaço de cana pode ser usado também para produzir compostos químicos tais como furfural ou hidroximetilfurfural e polpa para papel (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Tabela 4. Dimensões dos tipos celulares que compõem o bagaço de cana-de-açúcar. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão calculado a partir de 50 células de cada tipo (adaptado de SANJUÁN et al., 2001)

Tipos celulares	Comprimento (mm)	Largura do lumem (µm)	Espessura da parede celular (µm)	Diâmetro da célula (µm)
Fibra	1,13 (0,56)	12 (1,42)	4,0 (1,11)	20,0 (3,62)
Vaso	1,23 (1,21)	75 (2,54)	2,7 (0,26)	80,4 (6,87)
Parênquima	0,29 (0,01)	57 (3,57)	1,7 (0,17)	60,4 (4,51)

2.4.Hidrólise enzimática da celulose

A completa sacarificação da celulose requer a ação combinada de pelo menos três grupos de enzimas que atuam em sinergia (Figura 9), criando novos sítios de acessibilidade, removendo obstáculos e aliviando a inibição pelo produto. São elas: endo-1,4-β-D-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações -1,4-glicosídicas internas aleatoriamente na cadeia de celulose, principalmente nas regiões amorfas, liberando fragmentos menores; exo-1,4-β-D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), as quais se movem progressivamente ao longo da cadeia de celulose e clivam unidades de celobiose das extremidades; e 1,4-β-D-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose à glicose e também clivam celuoligossacarídeos originando unidades de glicose (CARVALHO et al., 2009; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; PALONEN et al., 2004).

Figura 9. Representação da ação sinérgica do complexo enzimático celulolítico na fibra de celulose (adaptado de ARO; PAKULA; PENTILLÄ, 2005).

Além destas, outras proteínas estão envolvidas no afrouxamento da estrutura da celulose cristalina. As swoleninas se adsorvem na celulose, e mesmo não tendo atividade catalítica, causam o afrouxamento da celulose, o que favorece a sua sacarificação (CARVALHO et al., 2009).

O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* é um dos mais eficientes para a sacarificação da celulose. Ele contém no mínimo duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II), cinco endoglucanases (EG I-V) e duas β -glicosidases. Todas as endoglucanases (exceto a EG III) e celobiohidrolases de *T. reesei*, assim como muitas outras celulasas de outros microrganismos, têm dois domínios, o domínio catalítico (CD) e o domínio de ligação à celulose (CBD), os quais são ligados entre si por uma estrutura flexível rica em serina, treonina, prolina e glicina chamada linker (Figura 10) (LEE; BROWN, 1997; PALONEN et al., 2004).

A função do CBD é trazer o domínio catalítico para um contato estreito com seu substrato e garantir a orientação correta desta ligação, pois como a celulose é um substrato insolúvel, a adsorção das celulasas na sua superfície é o primeiro passo na iniciação da hidrólise (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A remoção do CBD resulta em uma redução significativa da atividade das enzimas na celulose cristalina, provavelmente por causa da diminuição da capacidade de ligação, mas a atividade em oligômeros solúveis de celulose é mantida. Inversamente, CBDs isolados mantêm grande parte da capacidade de ligação na celulose cristalina, mas são desprovidos da ação catalítica. A atividade enzimática muitas vezes é afetada quando o linker é encurtado ou completamente removido sugerindo que este componente deve ser de comprimento e/ou flexibilidade suficiente para assegurar uma ação independente dos dois módulos funcionais (RECEVEUR et al., 2002).

No entanto, as celulasas podem se adsorver a superfície do sólido de forma específica ou não e essas interações normalmente não são covalentes, ou seja, são ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas. Sabe-se que quanto mais hidrofóbica é a superfície do substrato maior é a extensão da adsorção, e como todas as principais celulasas de *T. reesei* têm aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície a interação destas enzimas com a lignina pode ocorrer. Esta adsorção inespecífica na lignina desempenha um papel importante na limitação da sacarificação enzimática de substratos lignocelulósicos, já que diminui a concentração de enzima disponível para a atuação na celulose (PALONEN et al., 2004).

Figura 10. Representação de uma exoglucanase de *T. reesei* e as estruturas que a compõem (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A Tabela 5 contém uma breve revisão sobre o valor do diâmetro das celulasas. Pode-se observar que o diâmetro médio das celulasas pode variar de acordo com o microrganismo produtor e o método de medição utilizado.

Tabela 5. Diâmetro de celulasas medido por diferentes técnicas

Enzima	Microrganismo	Trabalho	Diâmetro (Å)	Técnica
CBH I	<i>Trichoderma reesei</i>	Schmuck et al., 1986	44	SAXS ¹
CBH I	<i>Trichoderma reesei</i>	Abuja et al., 1988a	44	SAXS ¹
CBH II	<i>Trichoderma reesei</i>	Abuja et al., 1988b	54	SAXS ¹
CBH I	<i>Trichoderma reesei</i>	Lee and Brown, 1997	45	TEM ²
CBH II	<i>Trichoderma reesei</i>		44	
CBH I	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Zhang et al., 1998	90	STM ³
EG I	<i>Trichoderma reesei</i>	Abuja et al., 1993	53	SAXS ¹
EG V	<i>Humicola insolens</i>	Davies et al., 1993	42	SAXS ¹
EG V	<i>Humicola insolens</i>	Boisset et al., 1995	42	DLS ⁴
EG III	<i>Trichoderma reesei</i>	Sandgren et al., 2001	40	SAXS ¹

¹ Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS – Small angle X-ray scattering); ² Microscopia eletrônica de transmissão (TEM – Transmission electron microscopy); ³ Microscopia de tunelamento com varredura (STM – Scanning tunneling microscopy); ⁴ Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering).

2.4.1. Variáveis que afetam a hidrólise enzimática da celulose

Vários estudos têm mostrado que a taxa e a extensão da hidrólise da celulose são influenciadas por propriedades físicas e químicas dos substratos. Essas propriedades podem estar relacionadas com a própria fibrila elementar de celulose (cristalinidade e grau de polimerização) ou com o material como um todo (conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose, tamanho de partícula e tamanho e distribuição de poros). Entretanto, nenhum destes fatores sozinho tem sido capaz de explicar o declínio gradual na taxa de hidrólise após uma rápida conversão inicial (ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002; MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

2.4.1.1.Cristalinidade

A influência da cristalinidade na hidrólise enzimática da celulose ainda é divergente entre os trabalhos publicados até hoje. Mesmo que vários autores indiquem que a cristalinidade se correlaciona inversamente com a digestibilidade, outros afirmam que outras características físicas como grau de polimerização, volume de poros e tamanho de partícula podem desempenhar um papel mais expressivo (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; GREG; SADDLER, 1996). O que é certo é que a cristalinidade exerce maior influência nas taxas iniciais de conversão de celulose, ou seja, nas primeiras horas de reação. Isto ocorre, pois em um substrato altamente cristalino, as pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose diminuem seu acesso às celulasas, que após um período inicial de reação transformam estas cadeias, com alto grau de empacotamento, em um material amorfo bem menos organizado, muito mais susceptível à hidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; PURI, 1984).

2.4.1.2.Grau de polimerização (DP)

Alguns pesquisadores utilizando substratos celulósicos relativamente homogêneos mostraram que a massa molar ou grau de polimerização do material residual após hidrólise

é muito similar ou apenas pouco reduzido quando comparado com a amostra original. Entretanto, quando utilizada celulose derivada de materiais lignocelulósicos, observa-se uma diminuição deste grau de polimerização de acordo com o aumento do tempo de reação. Mas como esses substratos foram preparados usando tratamentos químicos, estes podem ter alterado a estrutura molecular inerente do substrato (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). O ponto de convergência entre os estudos até hoje é que o grau de polimerização é essencialmente relacionado com outras características do substrato, principalmente com a cristalinidade. E, até por isso, resultados de estudos que avaliaram cada característica isoladamente indicam que estes parâmetros sozinhos não podem explicar a recalcitrância de substratos lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010; MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Apesar do papel do comprimento da cadeia de glucana ainda não ser muito bem conhecido, acredita-se que cadeias muito extensas reduzem a acessibilidade de reagentes e enzimas, afetando a hidrólise da celulose. A despolimerização depende da natureza do substrato celulósico. Na hidrólise enzimática, endoglucanases clivam em locais internos da cadeia de celulose preferencialmente menos ordenadas, sendo o principal responsável pela diminuição do grau de polimerização dos substratos celulósicos. Entretanto, independentemente do substrato a ser atacado, parece haver um nivelamento do valor do DP da celulose que acarreta no aumento da recalcitrância da celulose cristalina residual. O efeito de diferentes pré-tratamentos no tamanho da cadeia de celulose tem sido estudado, mostrando que há maior redução no grau de polimerização em sólidos preparados por pré-tratamentos que visam a retirada da xilana do que aqueles que visam a remoção da lignina (ALVIRA et al., 2010; PURI, 1984).

2.4.1.3.Tamanho de partícula

Alguns trabalhos dão suporte à teoria de que a redução do tamanho de partícula aumenta a área superficial específica e, conseqüentemente, a acessibilidade da celulose às enzimas (ALVIRA et al., 2010). Já que a adsorção é o passo inicial no processo hidrolítico, parece certo que a área superficial específica deve ter um efeito nas taxas de hidrólise, já que quanto maior a área superficial maior o número de sítios de adsorção disponíveis. Entretanto, com substratos celulósicos como o algodão e celulose microcristalina, existem poucas evidências que suportam essa teoria, pois vários estudos indicam que não há uma

correlação entre tamanho médio de partícula e taxa de hidrólise. Em contraste com a escassez de evidências encontradas para suportar uma correlação entre tamanho de partícula e taxa de hidrólise de substratos celulósicos relativamente puros, existem alguns estudos que suportam essa ligação com substratos lignocelulósicos. Por exemplo, tem sido mostrado que frações de tamanho pequeno são hidrolisadas preferencialmente em estágios iniciais da reação de hidrólise. Os substratos lignocelulósicos são heterogêneos na sua composição em termos de tamanho de partículas, e tem sido mostrado que, dentro da população de partículas de um substrato lignocelulósico, os finos têm um volume de poros significativamente maior, o que acarreta em uma maior susceptibilidade ao ataque enzimático (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Caulfield e Moore, em 1974, já tinham afirmado que diminuir o tamanho das partículas, aumentando a superfície disponível, afeta a taxa e a extensão da hidrólise enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.4.1.4. Conteúdo e distribuição de hemicelulose e lignina

Durante a síntese da parede celular, a hemicelulose é depositada como um constituinte amorfo que ocupa os espaços entre as fibrilas de celulose tanto na parede primária quanto na secundária e então, cada microfibrila pode ser considerada como uma rede de fibrilas elementares de celulose embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina (WAN; WANG; XIAO, 2010). Sendo assim, a presença destes dois componentes limita a eficiência da hidrólise, pois dificulta o acesso das celulasas à celulose, já que ambas cobrem a superfície das fibrilas formando uma barreira física entre a enzima e seu substrato (MUSSATO et al., 2008; YOSHIDA et al., 2008).

Alguns trabalhos que analisaram o efeito da adição de xilanases no processo de branqueamento de polpas Kraft confirmam a hipótese que as hemicelulasas reduzem a acessibilidade da celulose às celulasas. Eles mostraram que as xilanases não apenas hidrolisam a xilana reprecipitada na superfície da fibra como também aumentam a porosidade da fibra da polpa, resultando em um aumento substancial na permeabilidade das fibras das polpas celulósicas. Além disso, a remoção da hemicelulose resulta na solubilização de frações de lignina da biomassa lignocelulósica pré-tratada pela quebra do

complexo lignina-carboidrato melhorando concomitantemente a digestibilidade do substrato (HU; ARANTES; SADDLER, 2011).

Em relação à lignina, é de amplo conhecimento que ela interfere na sacarificação da celulose, já que vários estudos têm mostrado uma correlação inversa entre a taxa e o rendimento de hidrólise e o conteúdo de lignina. Em um estudo que utilizou 147 materiais lignocelulósicos concluiu-se que o conteúdo de lignina é um dos fatores chave na determinação da digestibilidade da biomassa (BERLIN et al., 2005). Sugere-se que a distribuição da lignina no material seja tão importante quanto o seu teor, já que a sua redistribuição pode causar a perda de sítios, até então, acessíveis de celulose (WONG et al., 1988). Além de limitar a hidrólise da celulose pela formação de uma barreira física que restringe o acesso das enzimas, como já citado, várias evidências indicam que as interações lignina-enzima contribuem significativamente na queda da taxa observada durante a hidrólise de substratos lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005). Tem sido mostrado que as celulasas se adsorvem tanto na lignina ligada ao material durante a reação como nos resíduos remanescentes da hidrólise completa, sendo assim, as celulasas que são imobilizadas por meio da adsorção irreversível na lignina ficam indisponíveis para reações posteriores com a celulose, consequentemente diminuindo a taxa de hidrólise de substratos lignocelulósicos (GREGG; SADDLER, 1996). Adicionalmente a melhora desta taxa devido à presença de surfactantes na mistura reacional tem sido atribuída à redução da ligação não produtiva das celulasas à lignina (BERLIN et al., 2005).

2.4.1.5.Porosidade da parede celular

A porosidade é a razão entre os “vazios” ou o volume intersticial de um material e a sua massa. Estes vazios são compostos por buracos e rachaduras dentro de um material que criam uma superfície interna (LANDRY, 2005).

A rede de polissacarídeos e lignina que compõem a parede celular dos lignocelulósicos apresenta uma arquitetura tridimensional na qual os espaços entre os polímeros definem a estrutura porosa da parede celular. A distribuição dos poros na parede de uma célula depende da sua natureza química, ou seja, do teor e distribuição dos polímeros constituintes. A maioria dos poros encontrados na parede celular vegetal tem um raio substancialmente menor do que os das menores proteínas globulares, o que implica em

uma limitação do acesso das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, por exemplo (GARDNER et al., 1999).

Muitos grupos têm mostrado uma boa correlação entre o volume de poros e a digestibilidade de substratos lignocelulósicos, evidenciando que o tamanho e volume dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é realmente um dos principais fatores que limitam a hidrólise da biomassa lignocelulósica (GRETHLEIN, 1985; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Sendo assim, um aumento da porosidade por meio de processos de pré-tratamento pode melhorar significativamente a hidrólise (ALVIRA et al., 2010).

O fato do aumento da porosidade levar a uma maior digestibilidade do substrato parece ser influenciado pelo conteúdo de lignina e sua distribuição no material. Sabendo que um dos principais papéis da lignina é manter a integridade da parede celular e sua estrutura rígida, sua estreita associação com os polissacarídeos nas microfibrilas de celulose impede o intumescimento das fibras, desta forma limitando a acessibilidade das enzimas. É provável também que a distribuição e a composição da lignina sejam tão importantes quanto a sua concentração em termos de acessibilidade para ação enzimática (GREGG; SADDLER, 1996; MOONEY et al., 1998). A remoção da hemicelulose também aumenta o tamanho médio dos poros do substrato e, como consequência, aumenta a probabilidade da celulose ser hidrolisada (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Face ao exposto, pode-se afirmar que a acessibilidade das enzimas à celulose é um fator chave na determinação da digestibilidade enzimática dos substratos lignocelulósicos (ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002).

2.4.1.6. Hornificação

A secagem, apesar de não ser uma característica intrínseca do material lignocelulósico, também pode limitar a hidrólise da celulose. Ela diminui a acessibilidade superficial do substrato pela remoção da água interfibrilar e, conseqüentemente, aumenta a quantidade de ligações cruzadas entre microfibrilas adjacentes devido à formação de pontes de hidrogênio. O colapso dos poros enrijece a fibra e torna a estrutura interna do material menos acessível para as enzimas. Esta série de mudanças químicas e físicas das fibras de celulose durante a secagem e reidratação, que causam sua contração física,

parcialmente reversível, é conhecida como hornificação (DINIZ; GIL; CASTRO, 2004; ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002; PARK et al., 2006).

Diversos trabalhos têm mostrado que a reidratação de fibras hornificadas não é capaz de restaurar sua acessibilidade original, mesmo após tempos prolongados de contato com a água (ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002). Esta mudança drástica nas características dos poros aparentemente pode variar de acordo com o material, já que muitos macroporos e nenhum microporo colapsaram irreversivelmente quando polpas químicas foram secas e reidratadas (STONE; TREIBER; ABRAHAMSON, 1969). Já Hui, Liu e Ni (2009), utilizando polpas mecânicas, observaram que muitos microporos colapsaram; a quantidade de água acessível para solutos com diâmetros menores que 270 Å foi muito menor se comparada com a amostra nunca seca. Entretanto o ponto de saturação da fibra (determinado com um soluto de 560 Å) pouco mudou. Alguns macroporos “reabriram” após a reidratação. Já os microporos foram colapsados irreversivelmente durante o processo. Isso foi atribuído ao fato de que este tipo de polpa mantém quase toda a lignina, o que faz com que o esqueleto do material resista ao total colapso dos poros.

Face ao exposto, percebe-se que a retirada total da umidade original do material lignocelulósico pode acarretar em uma diminuição da sua porosidade, diminuindo a área superficial de contato entre celulose e celulasas (HUI; LIU; NI, 2009; PARK et al., 2006).

2.5.Métodos para caracterização da porosidade de materiais lignocelulósicos

A caracterização dos poros da parede celular, isto é, forma, tamanho e distribuição do tamanho, tem sido proposta como um meio para prever a reatividade do substrato quanto à hidrólise enzimática da celulose (MOONEY et al., 1998; PARK et al., 2006).

Diferentes métodos para estimar a porosidade em materiais lignocelulósicos têm sido desenvolvidos. No entanto, muitos deles, tais como microscopia eletrônica, microscopia de força atômica, adsorção de gás, dispersão de luz e porosimetria por intrusão de mercúrio necessitam de uma amostra seca, além do fato que alguns destes métodos são destrutivos. Para o método de intrusão de mercúrio, por exemplo, as pressões requeridas para encher os poros são excessivamente altas e a precisão do método é reduzida com o aumento de pressão (ISHIZAWA et al., 2007; PARK et al., 2006). Já a

secagem do material lignocelulósico pode mudar drasticamente as características dos poros pelo processo de hornificação. Então, por vários motivos, os métodos que requerem a secagem prévia do material podem possivelmente conduzir a uma determinação não precisa da distribuição do tamanho de poros do material lignocelulósico (HUI; LIU; NI, 2009; PARK et al., 2006). Por sua vez, métodos como a termoporometria por calorimetria de escaneamento diferencial (DSC) e por ressonância magnética nuclear (^1H -RMN), a cromatografia de exclusão por tamanho inversa (ISEC), a coloração com corante de Simons e a técnica de exclusão de solutos podem ser aplicados em amostras úmidas (CHANDRA et al., 2008; HUI; LIU; NI, 2009).

2.5.1. Termoporometria por calorimetria de escaneamento diferencial (DSC)

A termoporometria, também chamada de termoporosimetria, é um método calorimétrico que determina o tamanho dos poros baseado na queda do ponto de fusão ou solidificação de um líquido confinado em um poro, e um calorímetro de escaneamento diferencial (DSC) é o instrumento adequado para uma medida precisa de mudanças de temperatura relativamente pequenas por causa da sua particular sensibilidade a transições exotérmicas de congelamento e endotérmicas de fusão (LANDRY, 2005). A base física para a mudança no ponto de fusão é que a temperatura de equilíbrio para uma transição de fase sólido-líquido é determinada pelo raio de curvatura da interface entre as fases líquida e sólida (LANDRY, 2005; PARK et al., 2006). Sendo assim, em um líquido retido dentro dos capilares de um material poroso, o raio da curvatura está intimamente relacionado com o tamanho do poro. Esta relação recíproca com os diâmetros dos poros permite que o volume de poros acessíveis possa ser determinado pelo cálculo do cumulativo de água ligada congelável em diferentes diâmetros de poros, baseado na equação de Gibbs-Thompson (LANDRY, 2005; YU et al., 2011).

Nos experimentos de termoporometria por DSC, a água absorvida nos materiais é subdividida em três tipos: água ligada não-congelável, água ligada congelável, e água não ligada. A água ligada não congelável é a primeira camada de água adjacente com a superfície e não congela porque o movimento das estruturas das moléculas de água é severamente limitado pela associação com as superfícies. A água ligada congelável tem comportamento termodinamicamente diferente da água não ligada. A quantidade de água

ligada congelável pode ser determinada pela integração de qualquer exoterma (solidificação da água) ou endoterma (fusão da água). No entanto, a água ligada congelável é geralmente caracterizada pela integração de uma endoterma já que, em alguns casos, a curva exotérmica não pode ser detectada durante o resfriamento (PARK et al., 2006).

Uma objecção na aplicação da termoporometria em fibras de polpa é que outros efeitos, como a pressão osmótica, também causam a queda do ponto de fusão da água na parede celular. Uma segunda objecção é que nas medidas de termoporometria a amostra deve ser congelada, procedimento que pode alterar a estrutura das fibras. Infelizmente pouco é conhecido sobre a solidificação da água dentro das paredes celulares e não é certo que tipo de influência o congelamento exerce na medida da distribuição do tamanho dos poros. Enquanto a medição da porosidade via termoporometria tem mostrado estar em concordância com outras técnicas para alguns sistemas, isso não tem sido observado para fibras de polpa. É provável que a relação entre o tamanho dos poros e a temperatura de fusão da água contida nas fibras das polpas seja mais complicada que a descrita pela equação de Gibbs-Thompson (MALONEY; PAULAPURO, 1999).

2.5.2. Termoporometria por ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -NMR)

Enquanto a termoporometria por DSC mede a transferência de calor durante a mudança de fase da água no poro, a termoporometria por ^1H -NMR determina a fração de líquido descongelado como uma função da temperatura, e relaciona esta quantidade de líquido descongelado a uma temperatura específica, com o volume de poros de um tamanho definido. Esta relação considera que a diminuição do ponto de fusão de um sólido cristalino dentro de um poro é dependente do diâmetro deste (ISHIZAWA et al., 2007; STRANGE; RAHMAN; SMITH, 1993). Neste método a amostra é congelada à temperatura de 230 K e depois aquecida; os sinais de RMN da água descongelada são gravados a cada intervalo de 10 K, até que a temperatura de 285 K seja alcançada. A intensidade do sinal de RMN na temperatura de 285 K é diretamente proporcional à quantidade total de água na amostra; a uma temperatura T abaixo de 273K, o sinal de RMN representa a fração de água descongelada na amostra (ISHIZAWA et al., 2007).

2.5.3. Cromatografia de exclusão por tamanho inversa (ISEC)

A cromatografia de exclusão por tamanho inversa (ISEC) e a técnica de exclusão de solutos são técnicas que utilizam princípios semelhantes na determinação da distribuição do tamanho de poros de um material. A cromatografia de exclusão por tamanho inversa (ISEC) tem sido empregada para estudar mudanças nas características dos poros, como o tamanho e distribuição, em polpas que passaram por tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos (YAO; LENHOFF, 2004). Na ISEC, moléculas de massa molar e diâmetro conhecido são usadas como sondas, e são eluídas através de uma coluna empacotada com o material de interesse, o qual age como fase estacionária (ANDREASSON; FORSSTRÖM; WÄGBERG, 2005; KONGDEE et al., 2004). Apenas materiais que não têm afinidade com o material de interesse são usados como sondas e, portanto, o tempo de eluição ou retenção de uma sonda depende apenas do percurso destas moléculas através do material. Sondas grandes, as quais não têm acesso a todos os poros no material, têm menores caminhos a serem percorridos e, conseqüentemente, menores tempos de eluição. Já as sondas menores, como têm acesso a mais poros, têm maiores caminhos a percorrer na coluna e, portanto, maiores tempos de eluição. O perfil de eluição pode ser construído para os materiais a serem caracterizados, com uma série de sondas de tamanhos progressivamente crescentes, usadas para estimar as características dos poros do material utilizado como fase estacionária (KONGDEE et al., 2004).

2.5.4. Coloração de Simons

O método de coloração de Simons, descrito em 1950, foi originalmente desenvolvido como um método de coloração de fibras lignocelulósicas para ser usado na avaliação microscópica de danos mecânicos em fibras de polpas durante o refino (YU; MINOR; ATALLA, 1995). Ele se baseia na adsorção competitiva de dois corantes de algodão (Direct Blue 1 e Direct Orange 15) em ambiente aquoso e pode gerar informações úteis sobre a área superficial total acessível de um substrato poroso, ou seja, a interna mais a externa. O corante laranja tem maior afinidade com a celulose, mas também maior tamanho. Deste modo, as moléculas do corante azul se adsorvem nos poros menores da

fibra, enquanto que as do corante laranja se adsorvem nos poros maiores e na superfície. Se a parede da fibra for acessível, o corante laranja irá penetrar nos poros e deslocar o corante azul, por causa da sua maior afinidade com os grupos hidroxila da celulose. Então, a proporção de corante laranja e azul adsorvida pelo substrato pode prover um indicador da distribuição de poros menores e maiores no substrato poroso (CHANDRA et al., 2008; ESTEGHLALIAN et al., 2001). A adsorção dos corantes na celulose segue a isoterma de Langmuir, a qual pode ser usada em combinação com o coeficiente de extinção de cada corante para calcular a área superficial total da celulose, usando a área interfacial dos corantes e da celulose. Atualmente, a quantificação dos corantes que ficaram no sobrenadante é feita por espectroscopia na faixa do visível, o que elimina a necessidade dos passos de filtração e solubilização dos corantes adsorvidos. Apesar de se mostrar eficiente na comparação da acessibilidade de diferentes materiais lignocelulósicos submetidos a diferentes tratamentos, o método de coloração de Simons é uma técnica semi-quantitativa (CHANDRA et al., 2008; YU; MINOR; ATALLA, 1995).

2.5.5. Exclusão de solutos

2.5.5.1. Teoria

A técnica de exclusão de solutos foi desenvolvida inicialmente por Stone e Scallan (1968a) e posteriormente teve seus procedimentos experimentais descritos em detalhes por Van Dyke (1972).

Ela leva em conta a acessibilidade de diferentes materiais (lignocelulósicos, por exemplo) às moléculas de soluto que variam em massa molar de 180 a 2×10^6 g/mol, e é baseada no seguinte princípio: um corpo poroso imerso em um excesso de água tem adicionado a ele um volume conhecido de uma determinada solução. O sistema é, então, completamente homogeneizado. Se toda a água originalmente associada ao corpo poroso é acessível às moléculas de soluto, ocorrerá a diluição da solução (Caso A, Figura 11). Se uma solução de moléculas grandes é usada (Caso B, Figura 11), então os poros menores do corpo poroso são inacessíveis para as moléculas de soluto; assim, esta água não está disponível para diluição e a solução após ser homogeneizada será pouco menos diluída que

no primeiro caso. Esta diferença na concentração dá o volume de água inacessível ao soluto. Quando a molécula de soluto é tão grande que não pode entrar no corpo poroso (Caso C, Figura 11), o volume de água inacessível é igual ao volume total de água de intumescimento, determinando assim o ponto de saturação da fibra. Uma curva típica relacionando o volume de água inacessível ao diâmetro do soluto é mostrada na Figura 12 (STONE; SCALLAN, 1968a).

Figura 11. Acessibilidade de solutos de diferentes tamanhos à água associada ao corpo poroso (adaptado de STONE; SCALLAN, 1968a).

Figura 12. Padrão de curva de acessibilidade gerado pela técnica de exclusão de soluto (adaptado de LIN et al., 1987).

Embora, em uma primeira vista, esta técnica pareça ser para medir o volume de água inacessível, uma vez que o volume total de água é conhecido também pode fornecer uma medida do volume de água acessível dentro do corpo poroso (água acessível = total de

água de intumescimento – água inacessível). Ao utilizar uma série de moléculas de tamanho crescente, é obtida uma informação quantitativa sobre o volume de poros. O limite máximo de medida de tamanho dos poros é limitado apenas pela disponibilidade de moléculas de soluto suficientemente grandes (STONE; SCALLAN, 1968a).

Resumidamente, pode-se definir que a aplicação desta técnica para descrever a distribuição do tamanho de poros é baseada nas suposições: i) a concentração de moléculas nos poros acessíveis é equivalente a concentração da solução externa, e ii) a completa penetração das moléculas nos poros ocorre quando o diâmetro da molécula é menor que o diâmetro do poro (LIN et al., 1985; STONE; SCALLAN, 1968a).

2.5.5.2.Sondas Moleculares

Para análise da estrutura porosa utilizando a técnica de exclusão de soluto, as sondas moleculares (solutos) têm que possuir várias propriedades: não devem ser adsorvidas fisicamente ou quimicamente pelo material estudado; devem estar disponíveis em uma grande faixa de massas molares; cada fração de massa molar deve ser monodispersa; elas não podem apresentar carga; devem ter seu tamanho e forma em solução conhecidos, e sua forma deve ser preferivelmente esférica. Usualmente têm sido utilizados mono, di, tri e tetra-sacarídeos (glicose, maltose, rafinose e estaquiose) para abranger uma faixa de baixa massa molar, e frações de dextrana ou polietilenoglicol para abranger faixas de massas molares mais altas.

2.5.5.3.Utilização

A técnica de exclusão de solutos tem sido amplamente utilizada na determinação da porosidade de materiais lignocelulósicos, comprovando sua eficiência e qualidade dos resultados gerados. A Tabela 6 relaciona os diversos materiais lignocelulósicos que já tiveram sua estrutura porosa caracterizada por esta técnica.

Tabela 6. Relação dos materiais lignocelulósicos já caracterizados pela técnica de exclusão de solutos

Trabalho	Material	Tratamento
STONE; SCALLAN, 1967	<i>Black Spruce</i>	Polpação Kraft
STONE; SCALLAN, 1968a	<i>Pinus sylvestris</i>	Polpação Kraft
STONE; SCALLAN, 1968b	<i>Black Spruce</i>	Polpação Kraft e sulfito
GRETHLEIN, 1985	Mistura de folhosas	
	<i>Poplar</i>	Hidrólise ácida
	<i>White pine</i>	
GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986	<i>Poplar</i>	Explosão a vapor
WONG et al., 1988	<i>Pinus radiata</i>	Explosão a vapor
BURNS; OOSHIMA; CONVERSE, 1989	Mistura de folhosas	Hidrólise ácida
CONVERSE; OOSHIMA; BURNS, 1990	Mistura de folhosas	Hidrólise ácida
THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992	Mistura de folhosas	Peróxido alcalino
		Organossolve
		Autohidrólise
		Hidrólise ácida
MOONEY et al., 1998	<i>Douglas-fir</i>	Polpação Kraft e sulfito
		Refino mecânico
		Clorito-ácido
HILL et al., 2005	<i>Corsican pine</i>	Anidrido acético
ISHIZAWA et al., 2007	Forragem de milho	Hidrólise ácida
	<i>Aspen</i>	
HUI; LIU; NI, 2009	<i>Birch</i>	Polpas comerciais
	<i>Maple</i>	
HUANG et al., 2010	Sabugo de milho	Ácido fórmico
		Hidróxido de amônio
		Ácido Sulfúrico
		Hidróxido de sódio
		Hidróxido de cálcio

2.5.5.4. Precauções

Quando empregamos a técnica de exclusão de solutos para determinar a distribuição do tamanho de poros da parede celular de um material lignocelulósico, precauções devem ser tomadas. As fibras do material lignocelulósico apresentam três sítios de acúmulo de água, além dos poros da parede celular (V_C): o lúmen das células (V_L), a superfície da fibra (V_F) e os interstícios entre as fibras (V_I) (Figura 13). Caso a interferência desta “água extra-poro” na diluição da solução de sondas não seja descontada, os valores de distribuição do tamanho de poros não serão exatos. Para a correção desta

interferência utilizamos o ponto de saturação da fibra. O volume de poros acessíveis para uma sonda em particular pode ser determinado subtraindo-se o valor de água inacessível para a sonda do valor de água de intumescimento (ponto de saturação da fibra) (GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986; ISHIZAWA et al., 2007; STONE; SCALLAN, 1967).

Um segundo parâmetro que merece atenção especial são as medições das concentrações, final e inicial. Van Dyke (1972) observou que apenas 1% de diferença no valor da concentração final gerou 10% de variação na quantidade de água inacessível. Além disso, erros nas medições de massa da amostra e conteúdo de água também resultaram em variações na quantidade de água inacessível, de 1,5 e 4,2%, respectivamente.

Por último, pode-se destacar a contaminação das soluções de sondas como uma das menores fontes de erro na medição de água inacessível, já que os valores obtidos pelas demais sondas contribuem para aplainar a curva de acessibilidade total.

Figura 13. Sítios de acúmulo de água nas fibras (STONE; SCALLAN, 1967).

2.5.5.5. Interpretação dos dados

Stone e Scallan (1968a) definiram um modelo estrutural para a parede celular de materiais lignocelulósicos com base na acessibilidade destes às macromoléculas. Este modelo estabelece que os poros devem ser considerados como espaços vazios entre lamelas concêntricas, e não como buracos circulares, para que os dados gerados pelos

tradicionais gráficos obtidos via técnica de exclusão de solutos (Figura 12) possam ser interpretados qualitativamente.

De acordo com Stone e Scallan (1968a) o modelo mais provável para a estrutura da parede celular vegetal é o modelo mostrado na Figura 14, o qual é conhecido como modelo multi-lamelar, no qual as lamelas se dispõem lado a lado com distâncias variáveis, determinando assim a área superficial e o volume do poro. Utilizando um modelo quantitativo baseado nesta figura, pode-se então traduzir os dados experimentais de acessibilidade determinados experimentalmente.

Figura 14. Representação do modelo multi-lamelar (STONE; SCALAN, 1968a).

Considerando duas lamelas separadas por uma distância W e contendo um volume de poro ΔV como mostrado na Figura 15, se $\Delta A/2$ é a área de uma face do poro, então:

$$\Delta A = \frac{2\Delta V}{W} \quad (1)$$

Se separarmos a curva de acessibilidade em uma série de intervalos entre os diferentes valores de diâmetro das sondas empregadas, a área superficial de cada intervalo pode ser calculada da mesma maneira, onde $\bar{W}$ é a largura média do poro neste intervalo (Figura 15). Somando as áreas superficiais de todos os intervalos, encontramos a área de superfície total da amostra. A Figura 16 apresenta o tratamento a que os dados obtidos experimentalmente são submetidos para que a área superficial disponível para cada sonda seja calculado.

Figura 15. Modelo para calcular a área superficial (STONE; SCALAN, 1968a).

Considerando que a água na parede celular está, não apenas entre as lamelas, mas dentro delas também, podemos concluir que uma célula intumescida apresenta lamelas mais grossas e, conseqüentemente, menor área superficial total. Adotando esta abordagem e seguindo fielmente o modelo estrutural de microfibrilas de celulose esboçado por Frey-Wyssling (1954), duas lamelas em corte transversal teriam o aspecto mostrado na Figura 17. Nele, as fibrilas elementares consistem de um centro ordenado de celulose incorporado em uma matriz de material desordenado para formar uma lamela. Em uma parede celular intumescida encontra-se água dentro do material desordenado da lamela, e o excesso de água preenche os espaços maiores entre as lamelas. Sendo assim, após a secagem, tanto o material desordenado quanto os espaços entre as lamelas se colapsam, formando uma sólida parede não porosa.

D2_NS							
	D	E	F	G	H	I	J
7						$\Delta A = \frac{2\Delta V}{\bar{w}}$	Área superficial
8			Volume de água inacessível		Varição do Vi		acessível
9							
	Sonda	Diâmetro da sonda (Å)	Diâmetro médio de poro (Å)	Vi (cm³/g)	Volume incremental (cm³/g)	Área incremental (m²/g)	Área cumulativa (m²/g)
10		$\bar{w}$	$\bar{W}$		ΔV	ΔA	$\Sigma \Delta A$
11	Dextran T2000	553	-	1,77	-	-	-
12	Dextran T500	302	428	1,56	0,20	9	9
13	Dextran T250	223	263	1,46	0,10	8	17
14	Dextran T150	178	201	1,39	0,08	8	25
15	Dextran T110	156	167	1,34	0,04	5	30
16	Dextran T70	128	142	1,28	0,07	9	39
17	Dextran T40	100	114	1,19	0,08	15	54
18	Dextran T20	74	87	1,09	0,10	23	77
19	Dextran T10	55	65	0,99	0,10	31	108
20	Dextran T6	44	50	0,92	0,07	30	138
21	Dextran T3,5	35	40	0,84	0,08	39	177
22	Dextran T1	20	28	0,65	0,19	136	314
23	Rafinose	12	16	0,48	0,17	214	528
24	Maltose	10	11	0,42	0,06	111	639
25	Glicose	8	9	0,35	0,07	166	805

Figura 16. Tratamento aplicado aos dados experimentais obtidos via técnica de exclusão de solutos para o cálculo da área superficial acessível para cada sonda.

Seguindo este modelo, a curva de acessibilidade pode ser dividida em duas partes: a primeira é a região de poros pequenos, correspondendo aos poros micro-reticulares ou intra-lamelares; a segunda região é a de poros grandes, correspondendo aos espaços macro-reticulares ou inter-lamelares. Em seu trabalho pioneiro (STONE; SCALAN, 1968a), os autores definiram os valores mostrados na Figura 17 com base na equação 1 e em parâmetros como quantidade e cristalinidade da celulose e área superficial disponível para sondas de 25 Å, já que, com base em dados experimentais, determinaram que poros até este valor de diâmetro estão contidos dentro da lamela, sendo o tamanho que separa os poros intra-lamelares dos inter-lamelares.

Figura 17. Representação do efeito da secagem em duas lamelas em corte transversal (adaptado de STONE; SCALAN, 1968a).

Por final, encerrando o modelo multi-lamelar definido por Stone e Scallan (1968a), uma distribuição espacial dos poros na parede celular foi proposta. Como é bem conhecido, a lignina, na parede celular, encontra-se mais concentrada em regiões mais externas, formando, junto com a hemicelulose, a matriz amorfa que preenche os espaços inter-fibrilares. Deste modo, seria razoável supor que os poros são mais largos entre as lamelas externas da fibra e tornam-se progressivamente mais estreitos em direção ao lúmen, conforme esquematizado na Figura 18 (STONE; SCALLAN, 1968a).

Na Figura 18 A a largura dos poros está relacionada com a fração acumulada da superfície total das lamelas. Já na Figura 18 B esse parâmetro se relaciona com sua localização na parede celular. Sendo assim, o que está sendo mostrado é um modelo com 21 lamelas (Figura 18 B), as quais se relacionam com cada um dos 20 intervalos iguais de fração acumulada da superfície total das lamelas (Figura 18 A); apresentando de forma

visual o tamanho de poro para cada intervalo, de acordo com a sua posição na parede celular.

Figura 18. Representação da distribuição espacial dos poros na parede celular (adaptado de STONE; SCALAN, 1968a).

2.6. Relação entre o valor de retenção de água e o ponto de saturação da fibra

Apesar de gerar dados quantitativos detalhados sobre a estrutura porosa de um material a técnica de exclusão de solutos apresenta desvantagens em relação à praticidade de aplicação. Sendo assim, quando se deseja rapidez em detrimento da precisão e detalhamento de resultados, um método experimentalmente mais simples é uma ferramenta valiosa, tanto no âmbito da pesquisa laboratorial quanto no âmbito da aplicação industrial (SCALLAN; CARLES, 1972).

Muitos anos antes do desenvolvimento da técnica de exclusão de solutos e sua aprovação como uma técnica capaz de determinar de forma inequívoca o ponto de saturação da fibra, uma metodologia já havia sido desenvolvida para determinar o que era denominado como “a afinidade da celulose à água”. De acordo com o procedimento, uma amostra úmida de fibra era centrifugada de tal maneira que a água “extra-parede” era expulsa da amostra. Depois da centrifugação, o conteúdo de umidade da amostra era reduzido para um valor chamado de “valor de retenção de água” (WRV). A técnica foi

originada na década de 40 em trabalhos utilizando fibras têxteis, mas passou a ser extensivamente aplicada para fibras de polpas pelo grupo de pesquisa liderado por G. Jayme que a utilizava para mensurar a hornificação após ciclos de secagem e reidratação (SCALLAN; CARLES, 1972; DINIZ; GIL; CASTRO, 2004).

Em 1972, Scallan e Carles observaram que tanto a técnica de exclusão de solutos como a técnica baseada na centrifugação geravam valores de ponto de saturação da fibra com magnitudes equivalentes para polpas similares, embora os dois métodos até então nunca tivessem sido aplicados em uma mesma amostra. Sendo assim, os autores realizaram um estudo comparativo utilizando um conjunto de 33 amostras compostas por polpas de celulose e amostras de algodão e rayon, confirmando a similaridade dos resultados gerados por ambas as técnicas concluindo, portanto, que essencialmente as mesmas propriedades estavam sendo determinadas por duas técnicas diferentes. Os autores observaram que se a densidade da água nas fibras fosse assumida como sendo 1,0 g/mL, os valores de retenção de água e volume total de poros (ponto de saturação da fibra) poderiam ser comparados na mesma escala.

A capacidade de retenção de água é uma característica física relacionada com os grupos hidroxila expostos no interior da parede celular da fibra (IWAMOTO; ABE; YANO, 2008). A molécula de celulose, por exemplo, contém três grupos hidroxila para cada resíduo de glicose, e pontes de hidrogênio podem ser formadas entre as moléculas de água e estes grupos (MORTON e HEARLE, 2008). As moléculas de água podem se adsorver nos grupos hidroxila situados em diferentes locais da fibra do material lignocelulósico. No entanto, nem todas as hidroxilas estarão ligadas a uma molécula de água, da mesma forma que poderá haver mais de uma molécula de água por grupo hidroxila, por meio de ligações indiretas (Figura 19) (MORTON; HEARLE, 2008).

Figura 19. Representação esquemática da ligação direta (2) e indireta (3) de moléculas de água nas hidroxilas do material lignocelulósico (1) (adaptado de MORTON E HEARLE, 2008).

Mais recentemente, Bendzalova et al. (1996) e também Hui, Liu e Ni (2009) confirmaram que o WRV é uma boa estimativa do ponto de saturação da fibra, permitindo determinar se um material apresenta ou não maior volume de poros na parede celular em relação a outro (LUO e ZHU, 2011). Sendo assim, embora não seja um método absoluto, a simplicidade da técnica faz com que esta ganhe destaque quando a avaliação rápida de muitas amostras é necessária (SCALLAN; CARLES, 1972).

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a influência do teor de lignina e da secagem na distribuição do tamanho de poros e na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Para isso, as seguintes metas foram propostas:

(i) Obter amostras de bagaço de cana-de-açúcar com teores de lignina progressivamente decrescentes, usando o método de deslignificação com clorito de sódio em meio ácido;

(ii) Analisar as mudanças estruturais promovidas nas amostras de bagaço de cana pela deslignificação progressiva;

(iii) Implementar a técnica de exclusão de solutos para determinar a distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço *in natura* e deslignificado, antes e após a secagem ao ar em temperatura ambiente;

(iv) Determinar o valor de retenção de água das amostras de bagaço *in natura* e deslignificado, secas e não secas;

(v) Avaliar a sacarificação enzimática da celulose das amostras supracitadas;

(vi) Definir as correlações entre a sacarificação enzimática, a distribuição do volume e área superficial de poros e o teor de lignina para as amostras de bagaço de cana com teores de lignina progressivamente decrescentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo é proveniente de usina sucroalcooleira. Após secagem ao ar e moagem utilizando moinho de martelo e posterior classificação granulométrica, a fração que passou pela malha com abertura de 0,84 mm (20 mesh) e ficou retida na malha de 0,42 mm (35 mesh) foi selecionada para utilização nos experimentos.

4.2. Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar com clorito de sódio em meio ácido, seguida ou não por secagem

A partir da amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, outras quatro amostras com teores de lignina decrescentes foram geradas. O preparo destas amostras deslignificadas seguiu a metodologia descrita por Browning (1967) para o preparo de holocelulose. O bagaço foi deslignificado em frações de 25 g em béqueres de 1000 mL. A cada fração de 25 g de bagaço, foram adicionados 7,5 g de clorito de sódio e 2,5 mL de ácido acético glacial em 800 mL de água destilada. As reações foram conduzidas a 80°C por até 4 horas. Após cada hora de reação, foram adicionados mais 7,5 g de clorito de sódio e 2,5 mL de ácido acético glacial. Finalizada a reação, o material foi resfriado a 10°C e lavado em sequencia, com água (1670 mL), acetona (410 mL) e água (2000 mL). As amostras de bagaço deslignificado foram obtidas após 1, 2, 3 e 4 horas de deslignificação.

Cerca de metade de cada uma das amostras de bagaço foi seca ao ar em temperatura ambiente por sete dias e a outra metade foi congelada mantendo sua umidade original, de modo a permitir a avaliação da influência do fenômeno de hornificação na hidrólise enzimática e na porosidade das amostras.

4.2.1. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das amostras de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido por 1 e 4 horas, foram obtidas à baixo vácuo utilizando o microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP do Departamento de Engenharia de Materiais (LOM) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

As amostras úmidas foram congeladas em ultrafreezer a -65°C e posteriormente liofilizadas a -40°C e 10^{-1} mbar. Ambas as etapas tiveram duração de 24 horas.

As amostras secas foram fixadas em suporte de alumínio, com fita de carbono, e submetidas ao recobrimento metálico com 25 nm de ouro.

Para a obtenção das imagens, foi utilizado o detector de elétrons secundários de baixo vácuo (VPSE) e uma intensidade de feixe de elétrons de 20 kV.

4.3. Análise composicional das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

A análise da composição química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em triplicata e seguiu a metodologia descrita por Ferraz et al. (2000). No caso da amostra *in natura*, uma extração prévia com etanol foi realizada em Soxhlet. Foram utilizados 1000 mL de etanol 96% e 4,5 g de massa seca de bagaço. A extração ocorreu por 6 h, e o teor de extrativos foi calculado por gravimetria após a massa de material extraído ter sido seca em estufa à 105°C até peso constante.

A hidrólise dos carboidratos foi realizada adicionando 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) a 0,3 g de bagaço (massa seca). A reação ocorreu a 30°C por 1 hora. Após esse período, foram adicionados 79 mL de água destilada, transferindo-se o material para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, que foi autoclavado a 121°C por 1 hora visando hidrolisar os oligossacarídeos remanescentes em monômeros. Após esse período, os frascos foram resfriados em temperatura ambiente e as amostras filtradas em filtro de vidro poroso número 3. O material retido foi lavado abundantemente com água destilada e seco em estufa a 105°C até massa constante, sendo quantificado por gravimetria como lignina insolúvel (Klason). Uma diluição de 1:9 do filtrado em ácido sulfúrico 3% foi utilizada para a determinação de lignina solúvel por espectrofotometria a 205 nm (Equação 2),

usando-se solução de ácido sulfúrico 3% como branco e coeficiente de absorvidade (ϵ) de $105 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$:

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (2)$$

onde A é a absorbância, c é a concentração de lignina solúvel em ácido (g/L) e b é o caminho óptico (cm). O filtrado também foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). A determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foi realizada utilizando-se detector de índice de refração (Waters 2414), coluna BioRadAminex HPX87H a 45°C , ácido sulfúrico $0,005 \text{ mol/L}$ como fase móvel, fluxo de $0,6 \text{ mL/min}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. As amostras foram previamente filtradas em filtro “Sep-Pack C-18”. Todas as concentrações foram determinadas utilizando-se curva de calibração obtida com padrões de grau analítico, e posteriormente convertidas nas respectivas matrizes poliméricas de origem (celulose e hemicelulose) por meio dos fatores 0,9 para glicose, 0,88 para xilose e arabinose, e 0,72 para ácido acético. Para a determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foi utilizado detector de absorção de luz ultravioleta a 280 nm , coluna C18 à temperatura ambiente, solução acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético como fase móvel, fluxo de $0,8 \text{ mL/min}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. As amostras foram previamente filtradas em membrana de celulose com poros de $0,45 \mu\text{m}$. As concentrações de hidroximetilfurfural e furfural foram calculadas também pelo uso de curvas de calibração obtidas com padrões de grau analítico, e posteriormente convertidas utilizando-se os fatores 1,29 e 1,38, respectivamente, para celulose e hemicelulose.

Os teores, em % m/m, de celulose, hemicelulose e lignina nas amostras de bagaço de cana foram posteriormente calculados com base na massa seca de amostra submetida à hidrólise.

4.4.Determinação da distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

4.4.1. Avaliação da adsorção inespecífica de dextrana

Os testes de adsorção foram realizados utilizando a dextrana de menor massa molar (Dextran T1) como adsorbato, diluída em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH ajustado em 7,0 com hidróxido de sódio. Esta dextrana apresenta massa molar ponderal nominal de 1000 g/mol.

Previamente aos ensaios, as amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 3 horas foram lavadas com água destilada (100 mL/g de bagaço), para a remoção de fragmentos microscópicos, compostos solúveis e possíveis resíduos da reação de deslignificação. O bagaço e a água foram adicionados a um béquer e mantidos em temperatura ambiente com agitação ocasional utilizando bastão de vidro. Trocas de água foram realizadas a cada 30 minutos, totalizando quatro trocas para a amostra deslignificada por 3 horas e seis trocas para a amostra *in natura*. Após a lavagem, as amostras foram secas em temperatura ambiente até que o teor de umidade alcançasse valores próximos a 10%.

Os ensaios foram realizados em triplicatas, em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 1,5 g de massa seca de adsorvente e 10 g de solução de dextrana nas seguintes concentrações: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; e 2,00% (m/m); e 10 g de tampão para o “branco”. Os frascos foram mantidos em shaker por 24 h com agitação de 100 rpm a 25 °C. Uma alíquota de cada solução usada foi reservada para a medida da concentração inicial (C_i). Após este período de 24 h, uma alíquota de cerca de 2 mL foi retirada e centrifugada, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração final de dextrana (C_f). Tanto a concentração de dextrana final quanto a inicial foram determinadas com o auxílio de um detector de índice de refração (Waters 2414) acoplado a uma bomba e um injetor manual de cromatografia a líquido. Empregou-se tampão fosfato de potássio 50 mM em pH 7,0 como eluente, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 20 μ L. Foram utilizadas curvas de calibração para esta determinação.

A interpretação dos resultados foi feita analisando a diferença entre as concentrações inicial e final, determinando assim a massa (em miligramas) de dextrana adsorvida por grama de adsorvente, em equilíbrio com a fase aquosa.

4.4.2. Análise via técnica de exclusão de solutos

A determinação da distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço *in natura* (IN) e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas não secas (D1h NS, D2h NS, D3h NS e D4h NS, respectivamente) e secas (D1h S, D2h S, D3h S e D4h S, respectivamente) foram realizadas com base na técnica de exclusão de solutos, proposta por Stone e Scallan (1968) e utilizada por diversos pesquisadores (GRETHLEIN, 1985; LIN et al., 1987; MOONEY et al., 1998; ISHIZAWA et al., 2007; HUI; LIU; NI, 2009; entre outros).

Previamente aos ensaios, as amostras de bagaço foram lavadas com água destilada conforme descrito (item 4.4.1), com trocas de água a cada 30 minutos, totalizando quatro trocas para as amostras deslignificadas e seis para a amostra *in natura*. Além da lavagem as amostras secas ao ar em temperatura ambiente foram reidratadas com água destilada por 24 h.

Os ensaios foram realizados em duplicatas, em frascos de cintilação de polietileno de 20 mL contendo a amostra de bagaço em quantidade suficiente para representar 1,0 g de massa seca e 20 g de solução de sonda molecular preparada em água destilada, como proposto por Thompson (1989). A concentração inicial das soluções de dextranas foi de 1,5% (m/m). Para o “branco”, foram adicionados 20 g de água destilada. Os frascos foram mantidos em shaker por 24 h a 25 °C com agitação manual ocasional. Uma alíquota de cada solução usada foi reservada para a medida da concentração inicial exata (C_i). Após este período de 24 h, o conteúdo de um frasco (Frasco A) de cada duplicata foi filtrado utilizando um aparato de filtração a vácuo composto por cadinho de Gooch com filtro de vidro poroso número 3 (previamente tarado), funil, tubo de ensaio, kitassato e borracha de vedação (Figura 20). Os sólidos retidos foram lavados com aproximadamente 250 mL de água destilada para a remoção das sondas moleculares. Uma alíquota de cerca de 2 mL foi retirada do segundo frasco (Frasco B) de cada duplicata e centrifugada. Tanto o sobrenadante (Frasco B) como o filtrado (Frasco A) foram utilizados para a determinação

da concentração final de dextrana (C_f). Os cadinhos contendo as amostras de bagaço retidas durante a filtração (Frasco A) foram secos em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação da massa seca da amostra (p) e do teor de umidade (cujo valor foi utilizado para aferir a massa seca de bagaço transferida para o frasco B). A concentração final e a inicial das soluções de dextranas foram determinadas por refratometria, utilizando detector de índice de refração (Waters 2414), água destilada como fase móvel, fluxo de 0,4 mL e volume de injeção de 20 μ L. Foram utilizadas curvas de calibração para esta determinação.

Figura 20. Representação esquemática do aparato de filtração.

Antecedendo o cálculo do volume de poros acessíveis para cada sonda molecular, as concentrações finais de cada solução tiveram seus valores subtraídos pelo valor do “branco”, corrigindo assim possíveis interferências de materiais solúveis que possam ter permanecido na amostra, mesmo após sua preparação.

O volume inacessível (d_i) (mL de água por g de substrato seco) para cada sonda foi calculado pela equação 3, que utiliza os valores da concentração inicial e final da solução da sonda (ISHIZAWA et al., 2007):

$$d_i = \left(\frac{W + q}{p} - \frac{W \cdot C_i}{p \cdot C_f} \right) \quad (3)$$

onde W é a massa da solução, q é a massa de água na amostra, p é massa seca da amostra, e C_i e C_f são as concentrações inicial e final da solução, respectivamente.

Uma curva foi ajustada aos pontos experimentais de volume de água inacessível obtidos, utilizando uma função de modelo logarítmico (Equação 4). Para isso foi utilizado o software Statgraphics Centurion XVI.

$$y = a + b \cdot \ln X \quad (4)$$

onde y é o volume inacessível calculado a partir do modelo logarítmico, a e b são os coeficientes de regressão do modelo e X é o diâmetro da sonda, calculado a partir da massa molar ponderal nominal reportada pelo fabricante.

Como proposto por Stone e Scallan (1968a), o volume de água inacessível para a dextrana com massa molar de 2×10^6 g/mol (Dextran T2000; diâmetro de 553 Å) foi considerado como o volume total de poros contidos na parede celular das amostras. Por definição (SCALLAN; CARLES, 1972), o volume total de poros da parede celular é chamado de ponto de saturação da fibra (FSP).

De posse do valor do ponto de saturação da fibra (d_s) e dos respectivos volumes inacessíveis (d_i) para cada sonda de diâmetro i , o volume de poros acessíveis (A_i) foi calculado pela equação 5 (ISHIZAWA et al., 2007):

$$A_i = d_s - d_i \quad (5)$$

Para o cálculo da área cumulativa de poros das amostras, a curva de inacessibilidade foi dividida em uma série de intervalos entre os diferentes valores de diâmetro das sondas empregadas. A área superficial de cada intervalo (ΔA) foi calculada pela equação 6, onde W é a largura média do poro neste intervalo e ΔV o volume de poro. Essa equação baseia-se no modelo de lamelas múltiplas proposto para a estrutura da parede celular vegetal (STONE; SCALLAN, 1968a).

$$\Delta A = \frac{2\Delta V}{W} \quad (6)$$

Os solutos utilizados como sondas moleculares na técnica de exclusão de solutos e suas respectivas massas molares e diâmetros estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Sondas moleculares e suas respectivas massas molares e diâmetros

Sondas	MM (g/mol)	Diâmetro (Å)	Fornecedor
Glicose	180	8*	Sigma-Aldrich
Maltose	342	10*	Sigma-Aldrich
Rafinose	504	12*	Sigma-Aldrich
Dextran T1	1.000	20**	Pharmacosmos
DextranT3.5	3.500	35**	Pharmacosmos
Dextran T6	6.000	44**	Pharmacosmos
Dextran T10	10.000	55**	Pharmacosmos
Dextran T20	20.000	74**	Pharmacosmos
Dextran T40	40.000	100**	Pharmacosmos
Dextran T70	70.000	128**	Pharmacosmos
Dextran T110	110.000	156**	Pharmacosmos
Dextran T150	150.000	178**	Pharmacosmos
Dextran T250	250.000	223**	Pharmacosmos
Dextran T500	500.000	302**	Pharmacosmos
Dextran T2000	2.000.000	553**	Pharmacosmos

* Stone e Scallan (1968a);

** Oliver III et al. (1992).

4.5.Determinação do valor de retenção de água (WRV) das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

A determinação do valor de retenção de água foi realizada de acordo com o proposto por Guo et al. (2011). As amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas (não secas e secas) 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 21). A adaptação da malha de aço no módulo de ultrafiltração, conforme ilustrado pela seta da Figura 21, possibilitou a remoção da água não retida pelas amostras por meio de centrifugação a 4.505 g por 15 min a 25 °C. Finalmente, as amostras foram secas até peso constante em estufa a 105 °C. Utilizando o valor das massas da amostra úmida e seca em estufa, o WRV foi calculado pela equação 7:

$$WRV = \frac{m_0 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (7)$$

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

Figura 21. Representação esquemática do aparato de centrifugação.

4.6.Sacarificação enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

Para os ensaios de sacarificação das amostras de bagaço de cana foi utilizado um preparado enzimático denominado de “Extrato II” (SANTOS, 2010). A caracterização deste extrato, em termos de suas enzimas constituintes e teor de proteínas, é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8. Determinação das atividades enzimáticas e teor de proteínas do “Extrato II” (SANTOS, 2010)

	Extrato II
Celulase total (FPU/mL)	93,5±9,2 ¹
Endoglucanase (UCMC/mL)	925,0
Exoglucanase (UI/mL)	98,0
Celobiase (UCB/mL)	115,8
β-Glicosidase (UI/mL)	139,0
Xilanase (UI/mL)	1249,0
Manganês Peroxidase (UI/mL)	n.d. ²
Lacase (UI/mL)	n.d. ²
Lignina peroxidase (UI/mL)	n.d. ²
Proteínas (mg/mL)	152,45±10,0 ¹

¹Desvio padrão calculado a partir de triplicatas; ²Atividade enzimática não detectada.

Os ensaios de sacarificação enzimática das amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas (não seco e seco) foram realizados em duplicatas e seguiram a metodologia proposta por Santos (2010) e posteriormente modificada por Esteves (2011). Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 12,5 mL de tampão citrato de sódio 100 mM pH 4,8 suplementado com azida sódica 0,02% (m/v), quantidade de bagaço suficiente para representar 1 g de massa seca e 0,025 g de surfactante Tween 20. Esta mistura reacional foi mantida em shaker a 45 °C com agitação de 150 rpm por 24 horas. Após este período uma carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço de atividade de celulasas totais foi adicionada. O volume final dos ensaios foi acertado para 25 mL com água destilada. Para cada condição e cada substrato utilizado, os respectivos brancos de enzima e substrato foram realizados. Os frascos permaneceram em shaker a 45 °C com agitação de 150 rpm. Alíquotas de 0,6 mL foram retiradas nos tempos de 2, 8, 24 e 72 horas. Estas foram fervidas por 5 minutos e posteriormente centrifugadas por 30 minutos a 12.000 g. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar as concentrações de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta eficiência (item 4.3). As conversões de glucana (CG) e xilana (CX) foram calculadas por meio das equações 8 e 9, respectivamente.

$$CG (\%) = \frac{\text{glicose}}{\text{celulose}} \times 0,90 \times 100 \quad (8)$$

$$CX (\%) = \frac{\text{xilose}}{\text{xilana}} \times 0,88 \times 100 \quad (9)$$

onde, tanto os monômeros quanto suas matrizes poliméricas são expressos em massa.

4.6.1. Definição das cargas de enzima e surfactante

Um experimento prévio foi realizado variando a carga enzimática, 5 e 10 FPU/g de bagaço de atividade de celulasas totais, e a presença (0,025 g de Tween 20/g de bagaço) ou não de surfactante, utilizando as amostras com maior e menor teores de lignina, *in natura* e deslignificado por 4 horas, respectivamente. Este ensaio foi conduzido seguindo as mesmas condições descritas no item 4.6.

4.6.2. Determinação da atividade de celulasas totais

A atividade de celulasas totais foi calculada seguindo o procedimento de Ghose (1987). As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 25 mL. Em cada tubo, contendo 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM em pH 4,8, foi adicionado 0,5 mL de diferentes diluições de enzima com atividades para liberar aproximadamente 2,0 mg de glicose (açúcares redutores). À temperatura de 50°C, foi adicionado uma tira de 1,0 x 6,0 cm de papel de filtro Whatman nº 1 (≈ 50 mg) a cada tubo e estes foram incubados por 1 h. Após este período, foram adicionados 3,0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e os tubos foram fervidos por 5 minutos. Todos os tubos, incluindo o zero do espectrofotômetro (enzima e substrato ausentes), o branco do substrato (enzima ausente) e os brancos das enzimas (diluições das enzimas, na ausência de substrato), foram fervidos ao mesmo tempo, e após este período foram transferidos para um banho de água fria. Foram adicionados 20 mL de água deionizada e, após a homogeneização, a intensidade da cor formada em cada reação foi mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm.

Para a determinação da atividade enzimática, foi utilizada uma curva de calibração preparada com glicose. O cálculo de atividade enzimática em FPU (unidade de papel de filtro) foi realizado utilizando a equação 10:

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que liberou 2,0 mg de glicose}} \quad (10)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo foi composto por $41,9 \pm 0,1\%$ de celulose, $26,7 \pm 0,1\%$ de hemicelulose, $20,7 \pm 0,1\%$ de lignina e $5,5\%$ de extrativos, além de $5,2 \pm 0,3\%$ de compostos não detectados pelo método de caracterização química utilizado. Conforme pode ser observado na Tabela 9, em comparação com estudos que utilizaram amostras padronizadas de bagaço de cana-de-açúcar analisadas por diferentes analistas e centros de pesquisa (MILNE et al., 1992; TEMPLETON et al., 2010), o bagaço utilizado no presente estudo apresentou menor teor de lignina e maior teor de celulose. Estas diferenças não são observadas quando se considera como referência uma outra amostra de bagaço utilizada em nosso grupo de pesquisa (CANILHA et al., 2011), cuja composição também é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação entre a composição química da amostra de bagaço de cana-de-açúcar utilizada no presente estudo com dados da literatura. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas

Componentes (%)	Referência			
	Presente estudo	Milne et al., 1992	Templeton et al., 2010	Canilha et al., 2011
Celulose	41,9 (0,1)	38,6	39,0 (0,5)	44,9
Hemicelulose	26,7 (0,1)	23,9	27,7 (1,0)	25,9
Lignina	20,7 (0,1)	23,1	24,8 (0,5)	19,3
Extrativos	5,5	4,4	5,7 (0,4)	8,5
Outros	5,2 (0,3)	10,0	2,8 (2,4)	1,4

Analisando a Tabela 10, pode-se observar que o tratamento do bagaço *in natura* com clorito de sódio em meio ácido foi eficaz na retirada de lignina. Conforme também ilustrado na Figura 22, o teor deste componente foi inversamente proporcional à severidade da deslignificação, ou seja, ao aumento simultâneo das cargas de clorito de sódio e ácido acético e do tempo de reação. Enquanto o material *in natura* foi composto por $20,7 \pm 0,1\%$ de lignina, as amostras submetidas à deslignificação por 1, 2, 3 e 4 horas apresentaram $14,2 \pm 0,3\%$, $9,2 \pm 0,2\%$, $8,0 \pm 0,1\%$ e $5,9 \pm 0,1\%$, respectivamente.

Tabela 10. Composição química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar deslignificadas com clorito-ácido. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas

Componentes (%)	Bagaço deslignificado			
	D1h	D2h	D3h	D4h
Celulose	48,0 (0,7)	51,2 (0,4)	53,2 (0,3)	56,2 (0,8)
Hemicelulose	29,1 (0,2)	30,0 (0,2)	27,7 (0,2)	27,6 (0,6)
Lignina	14,2 (0,3)	9,2 (0,2)	8,0 (0,1)	5,9 (0,1)
Outros	8,7 (1,1)	9,6 (0,4)	11,1 (0,4)	10,3 (1,0)

Figura 22. Teor dos principais componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar deslignificadas com clorito-ácido e *in natura*. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Sabe-se que o clorito de sódio reage com ácidos para formar ácido cloroso o qual então se decompõe para formar dióxido de cloro como produto principal, e íons clorato e cloreto como subprodutos. No entanto, as reações que ocorrem neste sistema não são bem definidas, e os produtos formados dependem da temperatura, pH e outros fatores (BROWNING, 1967).

Ford (1986) utilizando a gramínea *Digitaria decumbens*, mostrou que o tratamento com clorito em meio ácido ocasionou uma perda de arabinose e galactose, com concomitante aumento da proporção de xilose susceptível à oxidação. Além disso, foi observada a decomposição de ácidos fenólicos, mais precisamente o ácido p-cumárico, responsáveis pela formação dos complexos lignina-carboidrato. Ahlgren e Goring (1971) observaram que até uma remoção de cerca de 60% de lignina, de uma amostra de *black spruce*, o procedimento de deslignificação com clorito de sódio em meio ácido foi seletivo.

Maiores valores de remoção foram obtidos apenas em detrimento da recuperação de carboidratos, já que uma perda de hemicelulose foi evidenciada pela queda do teor de manose e galactose no material. Os autores atribuem este limite de especificidade ao teor de lignina que é necessário ser removido para que a fração de carboidratos enfim seja exposta. No entanto o estudo mostrou que a seletividade do processo de deslignificação por clorito de sódio é muito maior do que a dos processos de polpação convencionais, Kraft e sulfito, oferecendo vantagens para o estudo dos efeitos físico-químicos causados pela deslignificação seletiva do material lignocelulósico.

De acordo com o balanço de massa para os componentes das amostras de bagaço antes e após a deslignificação (Figura 23), o tratamento com clorito de sódio em meio ácido não causou solubilização da celulose, enquanto que uma pequena solubilização de hemicelulose foi observada. Duas reações podem promover a solubilização de ambos os polissacarídeos no tratamento com clorito-ácido: degradação oxidativa e/ou hidrólise ácida. A degradação oxidativa dos polissacarídeos não é específica e seria mais acentuada caso a reação ocorresse em pH neutro. Já a hidrólise ácida apresenta mais efetividade nas hemiceluloses. Por ter grau de polimerização inferior ao da celulose e conter ramificações, elas são reconhecidamente mais susceptíveis a estas reações, mesmo que em condições brandas como as encontradas na reação com clorito-ácido (HUBELL; RAGAUSKAS, 2010).

Figura 23. Balanço de massa dos componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar deslignificadas com clorito-ácido e *in natura*. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Segundo Browning (1967), a perda de pentosanas (xilanas, no caso) aumenta com o aumento da temperatura usada durante a cloração. Quanto à celulose, apesar de nenhuma solubilização ter sido observada, espera-se que uma diminuição da massa molar (grau de polimerização) das cadeias tenha ocorrido (HUBELL; RAGAUSKAS, 2010). Ainda de acordo com Browning (1967), uma perda considerável de polissacarídeos ocorre somente quando a deslignificação é conduzida por completo.

5.2. Análise da morfologia de amostras de bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura

As micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), das amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 1 e 4 horas estão dispostas na Figura 24. As estruturas apresentadas são feixes vasculares, formados por vasos cercados por fibras, facilmente identificados quando cortes transversais são empregados (SIQUEIRA et al., 2011). Pode-se observar também a presença de células com menor comprimento cobrindo estes feixes vasculares, identificadas, de acordo com Santos (2010), como células de parênquima.

Pela análise das micrografias, pode-se observar que o tratamento com clorito de sódio em meio ácido causou algumas mudanças estruturais no bagaço de cana, no que diz respeito ao seu desfibramento. Na amostra de bagaço de cana *in natura* (Figura 24 A-B), as células estão bem agrupadas formando um feixe celular compacto e ordenado. Já nas amostras tratadas com clorito-ácido por 1 hora (Figura 24 C-D) e 4 horas (Figura 24 E-F), pode-se observar um desfibramento evidente, maior no caso do tratamento mais severo. Este desfibramento pode ser consequência da remoção da lignina da lamela média, que é responsável pela união das células (FENGEL; WEGENER, 1989).

Mussato et al. (2008), a partir de micrografias obtidas por MEV, também observaram mudanças estruturais no bagaço de malte de cevada após tratamentos com ácido sulfúrico diluído e hidróxido de sódio, os quais removeram as frações de hemicelulose e lignina, respectivamente. Os autores destacaram que o material não tratado apresentou fibras compactas e altamente ordenadas, enquanto que, após a remoção de ambos os componentes citados, as mesmas estavam separadas, formando uma estrutura mais exposta, aumentando assim sua área superficial externa.

Figura 24. Micrografias obtidas por MEV das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito-ácido por 1 e 4 horas, ampliadas 100 vezes (A, C e E, respectivamente) e 300 vezes (B, D e F, respectivamente).

O trabalho de Liao et al. (2005) avaliou as mudanças estruturais ocasionadas pela remoção de lignina (clorito-ácido) e hemicelulose (ácido sulfúrico diluído) por MEV, entretanto o substrato estudado foi esterco bovino. Foi observado que quando apenas um dos dois componentes foi retirado, ainda assim as fibrilas de celulose ficaram cobertas pelo componente mantido na amostra. No entanto, quando ambos, lignina e hemicelulose, foram removidos, a estrutura do material mostrou grande alteração, deixando as fibrilas de celulose expostas e muito mais susceptíveis ao ataque enzimático.

5.3.Determinação da distribuição do volume e área superficial de poros das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido

5.3.1. Avaliação da adsorção inespecífica de dextrana

Para os dois adsorventes utilizados na avaliação do comportamento de adsorção da dextrana de menor massa molar (Dextran T1), bagaço de cana *in natura* e deslignificado por 3 horas, os valores de massa de dextrana adsorvida por grama de adsorvente (q_e) foram muito baixos. Como pode ser observado na Figura 25, os valores de q_e para estas duas amostras de bagaço foram de 0,5 e 1,5 mg/g, respectivamente. Estes valores se referem a ensaios utilizando solução de dextrana com concentração inicial de cerca de 1,5% (m/m), concentração esta empregada nos experimentos de exclusão de solutos conduzidos para a caracterização da distribuição de volume de poros das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Diversos estudos têm sido realizados investigando o uso do bagaço de cana-de-açúcar como adsorvente de diferentes tipos de moléculas. Por exemplo: Oliveira, Resende e Romanielo (2010) obtiveram um valor máximo de q_e de 149,3 mg de proteína/g de bagaço em efluente da indústria de laticínios. Gurgel, Freitas e Gil (2008) utilizaram o bagaço de cana na adsorção de metais pesados, obtendo 416,7 mg de chumbo/g de bagaço como valor máximo de q_e . Já McKay, Geundi e Nassar (1996) obtiveram valor de q_e máximo de 157,4 mg de corante Basic Blue 69/g de bagaço.

Os baixos valores de q_e obtidos para a adsorção de dextrana no presente estudo (Figura 25) demonstram que os bagaços *in natura* e deslignificado não são bons adsorventes de dextrana, ou seja, corroboram com o trabalho de Stone e Scallan (1968a) que define as frações de dextrana como sondas adequadas para a utilização na técnica de exclusão de solutos por não serem adsorvidas por materiais lignocelulósicos. Em seu trabalho, estes autores salientaram a importância da não adsorção das moléculas de soluto na superfície das fibras já que a sua ocorrência acarretaria em uma redução da concentração da solução e, conseqüentemente, em um aparente aumento na acessibilidade. Ainda no estudo de Stone e Scallan, foi observado que, mesmo aumentando a concentração de dextrana em dez vezes, nenhuma diferença no valor de água inacessível foi observada,

ou seja, a ocorrência de uma possível adsorção destes solutos mostrou ser uma fonte insignificante de erro. No presente estudo, aumentou-se a concentração de dextrana em vinte vezes e o comportamento também foi condizente com o observado por Stone e Scallan (dados não apresentados). Vale salientar que Wickramasinghe et al. (2009) e Susanto, Franzka e Ulbricht (2007), em trabalhos com membranas de ultrafiltração à base de celulose, também confirmaram que dextranas não se adsorvem significativamente em celulose.

Figura 25. Comparação dos valores de massa de adsorbato/grama de adsorvente (q_e) obtidos no presente estudo com aqueles reportados em trabalhos que utilizaram bagaço de cana como adsorvente para diferentes tipos de adsorbatos.

A baixa adsorção de dextrana nas amostras de bagaço, evidenciada pelos pequenos valores de q_e apresentados na Figura 25, pode ser explicada pelo modelo cinético de adsorção denominado modelo de difusão nos poros.

Os modelos cinéticos descrevem os processos dinâmicos que ocorrem na adsorção e que são governados pelas resistências à transferência de massa: resistência no filme (difusão externa) e resistência à difusão na estrutura de poros do adsorvente (difusão interna). Usualmente, o estágio de transferência de massa assume um modelo de 3 passos: (i) difusão no filme externo através da camada limite (que limita a interface líquido-sólido), (ii) adsorção a um sítio superficial, e (iii) transferência de massa para o interior da partícula adsorvente com base em uma difusão nos poros ou na superfície do sólido (GOMES, 1996; MCKAY, 1998; MCKAY; GEUNDI; NASSAR, 1996).

Com base nos trabalhos de McKay, Geundi e Nassar (1996) e McKay (1998), os quais utilizaram bagaço de cana na adsorção de corantes, pode-se inferir que a causa da diminuição das concentrações finais de dextrana observada no presente estudo se

assemelha àquela observada em ambos os trabalhos citados, que é a difusão destes solutos na água contida no interior dos poros do bagaço, seguindo a primeira Lei de Fick. Esta lei postula que, para que aconteça o fenômeno da difusão, a distribuição espacial de moléculas não deve ser homogênea, devendo existir uma diferença ou gradiente de concentração entre dois pontos do material, de forma que a densidade da corrente de partículas seja proporcional ao gradiente de concentração (LIU et al., 2004).

Sendo assim, o modelo cinético de adsorção aparentemente adotado pelas moléculas de dextrana nas amostras de bagaço consiste justamente na premissa em que se baseia a técnica de exclusão de solutos de Stone e Scallan (1968a), que é a difusão das moléculas de soluto da solução de dextrana para a água contida nos poros do material lignocelulósico. Considerando que nos ensaios de adsorção as amostras, secas em temperatura ambiente, continham cerca de apenas 10% de umidade, pode-se atribuir os valores de q_e obtidos a uma baixa acessibilidade das moléculas de dextrana aos poros do material e não a uma possível adsorção na superfície de algum componente.

5.3.2. Análise via técnica de exclusão de solutos

Previamente a apresentação e discussão dos resultados obtidos pela técnica de exclusão de solutos, vale ressaltar que, de acordo com Grethlein (1985), os tamanhos dos poros são calculados a partir dos diâmetros nominais das sondas moleculares utilizadas. Sendo assim, podem não representar exatamente seus valores reais no material lignocelulósico. Embora sejam valores razoáveis, eles são chamados valores nominais, porque não são absolutos, foram calculados a partir das massas molares nominais reportadas pelos fabricantes das sondas. No caso do presente estudo, o cálculo do raio hidrodinâmico das frações de dextrana utilizou os valores de massa molar ponderal média (M_w) disponibilizados pelo fornecedor (Pharmacosomes A/S, Dinamarca). Esses valores foram determinados a partir de curvas de distribuição de massa molar obtidas por cromatografia de permeação em gel (CPG) para cada fração de dextrana e, de acordo com informações do fornecedor, as distribuições Gaussianas obtidas geralmente mostram que em uma fração podem ser encontradas moléculas com massas molares variando de 10 até aproximadamente 35% em relação ao valor de M_w . Atualmente a caracterização detalhada desta distribuição de massa molar observada nas frações de dextrana pode ser realizada

utilizando a CPG em combinação com um sistema de detecção múltipla, capaz de determinar a massa molar absoluta e o raio hidrodinâmico das moléculas (MALVERN, 2011).

A determinação da distribuição do volume de poros de um material lignocelulósico, por meio da técnica de exclusão de solutos, é realizada obtendo-se primeiro a curva de inacessibilidade. Nela o volume de poros inacessíveis a diferentes sondas moleculares (eixo y) são plotados contra os diâmetros destas sondas (eixo x). Sendo assim, as curvas de inacessibilidade obtidas para as amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas não secas (D1h NS, D2h NS, D3h NS e D4h NS, respectivamente) e secas (D1h S, D2h S, D3h S e D4h S, respectivamente) estão dispostas na Figura 26.

Na curva de inacessibilidade o volume de água inacessível para a sonda de 553 Å de diâmetro (Dextran T2000) é um importante parâmetro da porosidade do material, sendo chamado “ponto de saturação da fibra” (FSP). O FSP foi originalmente descrito por Tiemann (1906) como o teor de umidade no qual o lúmen das células (V_L), a superfície da fibra (V_F) e os interstícios entre as fibras (Figura 13) não contêm água, mas a parede celular está completamente saturada com água em estado líquido, representando assim a fração de “água ligada” na matriz da parede celular (BERRY; RODERICK, 2005).

A retenção deste volume de água pela parede celular vegetal se deve às ligações químicas por pontes de hidrogênio mantidas entre as moléculas de água e os grupos hidroxila acessíveis do material. Esta ligação ocorre porque as forças atrativas entre os grupos hidroxila do material e as moléculas de água excedem as forças atrativas entre as próprias moléculas de água e, devido à natureza bipolar das moléculas de água, outras moléculas de água se alinham acima destas que estão ligadas aos grupos hidroxila do material, formando ligações de hidrogênio para produzir camadas de hidratação. O número médio de camadas de hidratação no FSP é estimado em cerca de cinco ou seis, mas as moléculas de água não são necessariamente distribuídas uniformemente – alguns sítios podem armazenar dez camadas enquanto outros, apenas duas (BERRY; RODERICK, 2005).

Os valores do FSP das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo estão dispostos na Tabela 11, a qual também apresenta uma revisão dos valores reportados para este parâmetro em diferentes tipos de biomassa, determinados utilizando a técnica de exclusão de solutos.

Figura 26. Distribuição do volume de poros inacessíveis das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo. IN (A), D1h NS (B), D1h S (C), D2h NS (D), D2h S (E), D3h NS (F), D3 S (G), D4h NS (H) e D4h S (I). Pontos experimentais (•); Curva ajustada (—); Intervalo de confiança para $p < 0,05$ (---).

Tabela 11. Comparação entre os valores de ponto de saturação da fibra (FSP) e de área superficial ($ASA_{50 \text{ Å}}$) e volume de poros ($VA_{50 \text{ Å}}$) acessíveis a uma molécula com 50 Å de diâmetro, obtidos pelo presente estudo e demais trabalhos da literatura

Material	Tratamento	FSP (mL/g)	$ASA_{50 \text{ Å}}$ (m ² /g)	$VA_{50 \text{ Å}}$ (mL/g)	Trabalho
<i>Black spruce</i>	<i>In natura</i>	0,42	n.d. ¹	n.d. ¹	STONE; SCALLAN, 1967
	Polpação Kraft	1,22	n.d. ¹	n.d. ¹	
<i>Pinus sylvestris</i>	Polpação Kraft + branqueamento	1,25	115	0,49	STONE; SCALLAN, 1968a
<i>Black spruce</i>	<i>In natura</i>	0,50	n.d. ¹	n.d. ¹	STONE; SCALLAN, 1968b
	Polpação sulfito	2,00	n.d. ¹	n.d. ¹	
	Polpação Kraft	1,60	n.d. ¹	n.d. ¹	
Mistura de madeira de folhosas	<i>In natura</i>	0,51	11	0,06	GRETHLEIN, 1985
	Hidrólise ácida	1,05	140	0,69	
<i>Poplar</i>	<i>In natura</i>	0,53	7	0,03	
	Hidrólise ácida	0,87	88	0,45	
<i>White pine</i>	<i>In natura</i>	0,49	14	0,09	
	Hidrólise ácida	0,70	80	0,37	
Espiga de milho	<i>In natura</i>	2,03	n.d. ¹	n.d. ¹	LIN et al., 1985
	NaOH	2,18	n.d. ¹	n.d. ¹	
	FeTNa ²	2,14	n.d. ¹	n.d. ¹	
<i>Poplar</i>	<i>In natura</i>	0,55	25	0,15	GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986
	Explosão a vapor (238 °C; 2 min)	0,90	105	0,60	
	Explosão a vapor (238 °C; 5 min)	0,95	115	0,60	
	Explosão a vapor (238 °C; 20 min)	1,00	110	0,60	
<i>Pinus radiata</i>	Explosão a vapor	1,24	215	1,11	WONG et al., 1988
	Explosão a vapor + lavagem alcalina	0,92	91	0,34	
	Explosão a vapor + lavagem alcalina + clorito	1,08	84	0,39	

Continua

Continuação

Tabela 11. Comparação entre os valores de ponto de saturação da fibra (FSP) e de área superficial (ASA_{50 Å}) e volume de poros (VA_{50 Å}) acessíveis a uma molécula com 50 Å de diâmetro, obtidos pelo presente estudo e demais trabalhos da literatura

Material	Tratamento	FSP (mL/g)	ASA _{50 Å} (m ² /g)	VA _{50 Å} (mL/g)	Trabalho
Mistura de madeira de folhosas	<i>In natura</i>	0,76	15	0,10	THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992
	Peróxido alcalino	1,41	71	n.d. ¹	
	Organossolve	1,46	95	n.d. ¹	
	Autohidrólise	1,11	48	n.d. ¹	
	Hidrólise ácida	1,33	128	0,63	
<i>Douglas-fir</i>	Polpação Kraft	1,20	n.d. ¹	0,90	MOONEY et al., 1998
	Refino mecânico	0,14	n.d. ¹	0,10	
	Refino mecânico + clorito	2,10	n.d. ¹	0,60	
	Refino mecânico + sulfito	2,50	n.d. ¹	0,30	
Forragem de milho	<i>In natura</i>	n.d. ¹	n.d. ¹	0,20	ISHIZAWA et al., 2007
<i>Aspen</i>		1,40	n.d. ¹	0,30	HUI; LIU; NI, 2009
<i>Birch</i>	Polpas comerciais	1,36	n.d. ¹	0,41	
<i>Maple</i>		1,19	n.d. ¹	0,39	
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>In natura</i>	0,89	56	0,32	Presente estudo
	Clorito-ácido (1 h) seco ao ar	1,19	115	0,67	
	Clorito-ácido (1 h) não seco	1,19	109	0,63	
	Clorito-ácido (2 h) seco ao ar	1,47	142	0,83	
	Clorito-ácido (2 h) não seco	1,77	138	0,81	
	Clorito-ácido (3 h) seco ao ar	1,55	144	0,84	
	Clorito-ácido (3 h) não seco	1,92	175	1,02	
	Clorito-ácido (4h) seco ao ar	1,98	192	1,12	
	Clorito-ácido (4 h) não seco	2,21	172	1,00	

¹Valor não determinado; ²Tartarato de sódio e ferro

Pode-se observar que, no presente estudo, as amostras com menor teor de lignina apresentaram maior FSP; logo, maior porosidade (Figura 27). Enquanto que a amostra *in natura* apresentou um FSP de 0,89 mL/g, as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas não secas apresentaram valores de FSP iguais a 1,19, 1,77, 1,92 e 2,21 mL/g, respectivamente. Este incremento no FSP pela remoção da lignina ocorre por dois motivos: primeiro porque tratamentos químicos visando à remoção da lignina quebram ligações químicas cruzadas no interior da fibra responsáveis pela manutenção da rigidez do material, aumentando assim a sua capacidade de intumescimento (BEECHER; HUNT; ZHU, 2009). Em segundo, porque a lignina, dentre os três principais componentes da biomassa, é o que apresenta menor afinidade com a água. Por exemplo, dados para *Eucalyptus regnans* mostram que, em relação à madeira intacta, a lignina apresentou uma capacidade de sorção de água de 60%, enquanto que para os carboidratos, hemiceluloses e celulose, este valor foi de 156 e 94%, respectivamente (BERRY; RODERICK, 2005).

Figura 27. Correlação entre o teor de lignina e o ponto de saturação da fibra das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Conforme citado por Stone e Scallan (1967) Stamm (1964) apresentou uma revisão dos valores de FSP, obtidos por diferentes técnicas, para diferentes tipos de madeira, holocelulose, hemicelulose, lignina, algodão e polpas de vários rendimentos, encontrando, em todos os casos valores próximos de 0,30 mL/g. No entanto, Stone e Scallan (1967), questionando esta constância do FSP para materiais tão diferentes, utilizaram duas técnicas distintas, uma baseada em isotermas de dessorção de água e outra baseada na exclusão de solutos pela água contida no material, para a determinação do FSP de polpas Kraft de *black spruce* de diferentes rendimentos, além da amostra referência (madeira *in natura*). Eles

observaram que os valores de FSP obtidos por ambas as técnicas apresentaram concordância e foram substancialmente maiores que os valores reportados por Stamm. A amostra referência apresentou um FSP de 0,42 g/g, enquanto que valores maiores que 1,00 mL/g foram obtidos para polpas de rendimento inferiores a 78% (25% de lignina). De forma semelhante, todos os valores de FSP revisados e obtidos pelo presente estudo (Tabela 11) foram superiores a 0,30 mL/g, com exceção da amostra de *douglas-fir* submetida a refino mecânico utilizada por Mooney et al. (1998).

Lin et al. (1985), utilizando espiga de milho, uma gramínea, mostraram que a amostra *in natura* apresentou um FSP de 2,03 mL/g e, após tratamento com 1,5 N de hidróxido de sódio ou de tartarato de sódio e ferro, este valor subiu para 2,18 e 2,14 mL/g, respectivamente. O teor de lignina que era de 10% no material não tratado, caiu para 4 e 6% após os respectivos tratamentos, justificando o aumento do FSP. Thompson, Chen e Grethlein (1992) também alcançaram maiores valores de FSP por meio da remoção de lignina, utilizando tratamentos com etilenodiamina ou peróxido alcalino sobre uma mistura de madeiras de folhosas. Aumentando a razão glucana/lignina de 1,55 para 2,08 e 2,03 o FSP aumentou de 0,76 para 1,46 e 1,41 mL/g, após os tratamentos com etilenodiamina e peróxido alcalino, respectivamente. Como representante de madeira de coníferas, pode-se citar o trabalho de Mooney et al. (1998), no qual utilizou-se polpa de *douglas-fir* após refino mecânico. Antes da deslignificação com clorito-ácido, a polpa apresentou um teor de 27,0% de lignina, o qual foi reduzido a 8,2% após o procedimento; como consequência, o FSP, que era de 0,14 mL/g, aumentou para 2,10 mL/g, seguindo a tendência observada na literatura e no presente estudo.

Vale ressaltar que, conforme mostrado por Stone e Scallan (1968b) quando os conteúdos de lignina e hemicelulose são reduzidos durante a polpação, o ponto de saturação da fibra aumenta até o ponto em que a estrutura de poros finalmente colapsa. Este comportamento foi observado tanto para polpa sulfito como para polpa Kraft de *black spruce*. As polpas com rendimentos próximos a 60% apresentaram valores de FSP de 2,00 e 1,60 mL/g, respectivamente; no entanto, quando polpas com menores rendimentos foram obtidas, menores foram seus respectivos valores de FSP.

Após a secagem ao ar livre em temperatura ambiente, todas as amostras, com exceção da amostra deslignificada por 1 hora, apresentaram uma redução no volume total de poros em relação às amostras não secas, como pode ser observado na Figura 26.

A perda de acessibilidade das sondas moleculares ocasionada pela secagem do material pode ser explicada pelo fenômeno de hornificação, o qual acarreta em um

aumento da quantidade de ligações cruzadas entre microfibrilas adjacentes devido à remoção da água interfibrilar, causando o colapso de alguns poros do material (DINIZ; GIL; CASTRO, 2004). Este colapso pode ser parcialmente revertido por meio da reidratação do material (ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002).

Com relação à manutenção do FSP da amostra deslignificada por 1 hora durante a secagem, esta pode ser explicada pelo fato que a lignina ainda presente em grande quantidade (14,2%) foi capaz de manter a estrutura da parede celular rígida o suficiente para evitar a aproximação e formação de ligações cruzadas entre as microfibrilas, suposição esta suportada pelo trabalho de Jayme e Hunger (1956), citado por Diniz, Gil e Castro (2004), no qual os autores descrevem o processo de hornificação como sendo característico essencialmente de polpas de baixo rendimento.

Stone e Scallan (1968a) analisaram o efeito da secagem na estrutura porosa de uma amostra de polpa Kraft branqueada de *Pinus sylvestris* e relataram que, após a secagem, o FSP, que era de 1,25 mL/g, caiu para 0,70 mL/g. Os autores não descreveram, porém, o procedimento de secagem. Já Wong et al. (1988) estudaram o efeito de duas estratégias de secagem na porosidade de uma amostra de *Pinus radiata* pré-tratada por explosão a vapor; a primeira, ao ar livre em temperatura ambiente por quatro dias, e a segunda em estufa por 12 horas. Eles observaram que a secagem em estufa foi mais drástica do que a secagem ao ar em relação ao FSP, já que o valor deste parâmetro caiu de 1,01 mL/g para 0,55 e 0,38 mL/g nas amostras secas ao ar e em estufa, respectivamente. Luo e Zhu (2011) utilizando amostras de *lodgepole pine* e *aspen* pré-tratadas com sulfito e refinadas por refinador de disco e polpa de eucalipto branqueada mostraram que, tanto o método quanto o tempo de secagem afetam a estrutura porosa do material. Os métodos de secagem estudados, em ordem crescente de severidade foram: ao ar com temperatura de 23,8 °C e umidade relativa de 50%, e em estufa a 105 e a 150 °C. Eles observaram que, quanto maior a temperatura e o tempo de secagem, maior é o grau de hornificação da fibra, ou seja, menor é o volume de poros.

A partir dos dados de inacessibilidade, o volume e a área superficial de poros acessíveis para cada sonda molecular foram calculados, conforme descrito no item 4.4.2. As curvas de volume de poros e área superficial acessíveis assim obtidas estão dispostas nas Figuras 28 e 29, respectivamente. Pode-se observar que, quanto maior a drasticidade da deslignificação, maior é o volume e a área superficial de poros acessíveis da amostra, comportamento este que corrobora com os dados de FSP.

A remoção de lignina, como supramencionado, aumenta a porosidade do material. Segundo Stone e Scallan (1968a), este incremento ocorre principalmente nas regiões mais externas da parede celular, as quais são mais ricas em lignina em relação às regiões mais próximas ao lúmen. Com menos lignina, a água tem maior facilidade em intumescer a fibra, alterando assim a conformação espacial da matriz da parede celular do material pela formação de novos poros e/ou aumento dos já existentes (BEECHER; HUNT; ZHU, 2009; HUI; LIU; NI, 2009).

A correlação entre a porosidade e a digestibilidade de um material pode ser estabelecida determinando os valores de volume e área superficial acessíveis a uma sonda com tamanho equivalente ao das celulasas. No entanto, como destacado por Thompson (1989), as diferentes fontes e condições de produção de celulasas implicam em uma grande variação no tamanho e na massa molar destas enzimas, o que dificulta o estabelecimento de uma estimativa universal das suas dimensões. No mesmo trabalho, Thompson descreve uma compilação realizada por Cowling (1975) acerca de dados de massa molar, determinados por cromatografia de permeação em gel (CPG), de celulasas obtidas de várias fontes. Os resultados mostraram que, se as celulasas são esferas hidrodinâmicas em solução, seus diâmetros estariam na faixa de 24-77 Å, enquanto que, se elas são elipsoides com uma relação axial de cerca de seis, seus tamanhos variam entre 13 x 79 Å a 42 x 252 Å em largura e comprimento, respectivamente. A variabilidade de dados aumenta quando outros trabalhos são comparados entre si. Van Dyke (1972) utilizou dimensões elipsoidais para descrever o formato das celulasas (35 x 210 Å), enquanto que Stone et al. (1969) concluíram que as celulasas utilizadas, produzidas por microrganismos do rúmen de bovinos, tinham diâmetros na faixa de 30-40 Å. O presente estudo, seguindo diversos trabalhos (GRETHLEIN, 1985; GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986; ISHIZAWA et al., 2007; MOONEY et al., 1997; THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992), além dos dados revisados (item 2.4), considerou as celulasas como moléculas esféricas, com diâmetro médio de 50 Å, para correlacionar a porosidade do material com a sua digestibilidade, ou seja, utilizou os valores do volume ($VA_{50\text{Å}}$) e da área superficial ($ASA_{50\text{Å}}$) acessíveis a uma sonda molecular com diâmetro de 50 Å. Vale ressaltar que uma correlação fidedigna entre as acessibilidades das moléculas de dextrana e das celulasas deve ser estabelecida considerando suas dimensões hidrodinâmicas em um mesmo solvente, o que atualmente é possível apenas utilizando a CPG combinada a um sistema de multidetecção. Esta necessidade de uma ferramenta para a determinação destas dimensões sem uso de padrões é evidenciada pelo trabalho de Frigon et al. (1983), o qual mostrou que

mesmo sob condições iônicas adequadas para a CPG, proteínas globulares não foram eficientes como padrões para a determinação do tamanho de dextranas, devido principalmente à falta de correlação entre o volume de retenção e o raio hidrodinâmico destas moléculas.

Figura 28. Distribuição do volume de poros acessíveis das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Sendo assim, uma breve revisão dos valores reportados na literatura para esses dois parâmetros está disponível na Tabela 11, juntamente com os valores obtidos pelo presente estudo. Deve-se destacar que, apesar de representarem propriedades diferentes, estes parâmetros são equivalentes e apresentam uma correlação linear com R^2 de 1,000.

Conforme pode ser observado na Tabela 11 a amostra de bagaço *in natura* apresentou um $VA_{50\text{\AA}}$ de 0,32 mL/g equivalente a uma $ASA_{50\text{\AA}}$ de 56 m²/g. Para as amostras designificadas por 1, 2, 3 e 4 horas não secas, os valores de volume acessível foram de 0,63, 0,81, 1,02 e 1,00 mL/g, correspondendo a valores de área superficial acessível de 109, 138, 175 e 172 m²/g, respectivamente.

Figura 29. Distribuição da área superficial de poros das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Grethlein (1985) empregou o pré-tratamento contínuo (em reator do tipo *plug flow*) com ácido sulfúrico diluído (0,41-1,00%, 200-220 °C, 6,0-7,8 s) em três diferentes substratos e observou que, em todos os casos, houve um incremento na $ASA_{50\text{\AA}}$. Este

incremento foi substancialmente maior para as duas amostras de madeira de folhosas (uma mistura de *birch* e *maple*, e *poplar*) do que para a amostra de *white pine* (conífera), que foi de 14 para 80 m²/g. Para a mistura de madeira de folhosas, o valor de ASA_{50Å} aumentou de 11 para 140 m²/g; para *poplar*, de 7 para 88 m²/g. Já Grous, Converse e Grethlein (1986), utilizando uma amostra de *poplar* com ASA_{50Å} de 25 m²/g, observaram que, independentemente do tempo do tratamento por explosão a vapor em processo de batelada conduzido a 238 °C (2, 5 e 20 minutos), as amostras pré-tratadas não apresentaram grande variação no valor de ASA_{50Å}, 105, 115 e 110 m²/g, respectivamente.

Em termos de volume e área acessíveis a uma molécula com diâmetro de 50 Å verificou-se que a secagem das amostras ao ar livre em temperatura ambiente, acarretou em efeito diferente do observado para o FSP (Tabela 11). Enquanto que a secagem, de modo geral, não alterou de forma relevante os valores de VA_{50Å} e ASA_{50Å}, uma queda substancial foi observada para os valores de FSP, com exceção da amostra deslignificada por 1 hora. Comportamento diferente foi observado no trabalho de Wong et al. (1988), onde, como já citado, uma amostra de *Pinus radiata* foi seca de duas maneiras diferentes, ao ar livre por quatro dias e em estufa por 12 horas. O VA_{50Å}, que inicialmente era de 0,60 mL/g, foi reduzido para 0,35 e 0,15 mL/g, respectivamente. O efeito da secagem observado por este trabalho pode ser explicado pelo fato de que a biomassa pré-tratada por explosão a vapor tem o seu teor de hemiceluloses reduzido (no caso do trabalho citado, para zero). As hemiceluloses por se localizarem nos espaços interfibrilares da parede celular dificultam a ocorrência do fenômeno de hornificação, pois impedem a agregação de microfibrilas de celulose (DUCHESNE et al., 2001), deste modo o comportamento observado no presente estudo é atribuído à manutenção, quase que integral, deste componente nas amostras de bagaço, mesmo após o tratamento com clorito de sódio.

Pela análise dos dados de área cumulativa das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo (Tabela 12), pode-se observar que as diferenças entre as amostras não secas e secas não corroboram com as diferenças observadas entre os valores de ponto de saturação das mesmas (Tabela 11). Nenhuma perda consistente de acessibilidade foi observada, desde o maior até o menor diâmetro médio de poro estudado, 9 Å (média do diâmetro das duas menores sondas utilizadas). Deste modo, pode-se afirmar então que a diminuição do FSP pela secagem ocorreu devido ao colapso de poros com diâmetros inferiores a 9 Å.

Tabela 12. Área cumulativa das amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas não secas e secas

Diâmetro médio de poro (Å)	Área cumulativa (m ² /g)								
	IN	D1h NS	D1h S	D2h NS	D2h S	D3h NS	D3h S	D4h NS	D4h S
428	4	7	8	9	10	12	10	12	13
263	7	14	14	17	18	22	18	21	24
201	10	20	21	25	25	31	26	31	34
167	12	24	25	30	31	38	31	37	42
142	16	31	33	39	41	50	41	49	55
114	22	42	45	54	55	68	56	67	75
87	31	61	64	77	79	98	80	96	107
65	43	85	90	108	111	137	112	135	150
50	56	109	115	138	142	175	144	172	192
40	71	139	147	177	182	225	184	221	246
28	126	247	260	314	322	398	326	391	436
16	212	416	438	528	542	669	549	657	734
11	257	503	530	639	657	810	664	796	889
9	323	634	668	805	828	1021	837	1003	1120

5.4.Retenção de água pelas amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido

A Tabela 13 apresenta os valores de retenção de água determinados para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido, secas à temperatura ambiente ou não. Pode-se observar que, com o aumento da drasticidade de deslignificação, ou seja, com a redução do teor de lignina, aumenta-se o valor de retenção de água pela amostra. Para a amostra *in natura* o WRV foi de 0,99 g/g. Já para as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas não secas os valores deste parâmetro foram de 1,41, 1,61, 1,77 e 1,89 g/g. Após a secagem, os valores de WRV foram reduzidos para 1,15, 1,45, 1,54 e 1,71 g/g, respectivamente.

Sendo a capacidade de retenção de água uma característica física relacionada com os grupos hidroxila expostos no interior da parede celular da fibra, já era esperado que as amostras contendo menores teores de lignina resultassem em maiores valores de retenção de água, já que uma maior quantidade de hidroxilas, tanto da celulose quanto da hemicelulose, estaria acessível para a adsorção de moléculas de água. Nesse contexto, é

importante ressaltar mais uma vez que a lignina é o componente do material lignocelulósico que apresenta menor afinidade com a água (BERRY; RODERICK, 2005).

Tabela 13. Valor de retenção de água e ponto de saturação da fibra das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Amostra	WRV (g/g)	FSP (mL/g)
IN	0,99	0,89
D1h NS	1,41	1,19
D1h S	1,15	1,19
D2h NS	1,61	1,77
D2h S	1,45	1,47
D3h NS	1,77	1,92
D3h S	1,54	1,55
D4h NS	1,89	2,21
D4h S	1,71	1,98

Pejic et al. (2008) utilizaram amostras de fibras de *Cannabis sativa* submetidas ao tratamento com clorito de sódio para avaliar a influência da lignina no valor de retenção de água. Enquanto a amostra não tratada apresentou 6,06% de lignina, com um WRV de 0,60 g/g, as amostras tratadas por 15 e 60 minutos, com 40 e 50% a menos de lignina, apresentaram valores de WRV de 0,72 e 0,80 g/g, respectivamente. Já Iwamoto, Abe e Yano (2008) obtiveram um valor de retenção de água de 3,27 g/g utilizando polpa de *Picea sitchensis* (conífera) deslignificada com clorito de sódio em meio ácido (0,1% de lignina), valor substancialmente maior que os encontrados no presente estudo provavelmente devido ao teor extremamente reduzido de lignina.

Trabalhando com amostras de *Pinus contorta* (conífera) tratadas por processo organossolve (etanol) ou por explosão a vapor, Chandra et al. (2009) observaram que as amostras tratadas por explosão a vapor, contendo maior teor de lignina (45-58%), exibiram menores valores de retenção de água em relação às amostras tratadas pelo processo organossolve, o qual gerou amostras com menores teores de lignina (21-25%). Embora os valores de retenção de água encontrados tenham se correlacionado bem com os dados de porosidade e sacarificação enzimática obtidos no estudo, ficou evidente que houve uma sensibilidade limitada deste método na comparação de diferentes condições de um mesmo tipo de pré-tratamento. Kumar et al. (2011) avaliaram o efeito do teor de lignina na capacidade de retenção de água de amostras de *douglas-fir* pré-tratadas a vapor e posteriormente deslignificadas pelo método de clorito-ácido. A partir da amostra controle (42,8% de lignina) quatro amostras com teor de lignina decrescente foram geradas,

contendo 38,2, 29,7, 22,4 e 10,9% de lignina, além de uma amostra completamente deslignificada. Foi observado que, quanto menor o teor de lignina maior foi o valor de retenção de água. A amostra não deslignificada apresentou valor de WRV de 121,3%, enquanto que as amostras deslignificadas apresentaram valores de 150,9, 177,2, 195,4 e 219,7%, respectivamente. Um valor de 250,2% de WRV foi obtido para a amostra completamente deslignificada. Deste modo, os autores concluíram que a retirada da fração de lignina por meio da reação com clorito de sódio em meio ácido acarreta em um aumento da capacidade de intumescimento do material.

Parte das diferenças observadas entre os valores de WRV e FSP (Tabela 13) pode ser atribuída ao fato que em alguns casos a centrifugação não é capaz de remover toda a água retida, e sim apenas reduzir esta quantidade, não fornecendo, portanto, uma estimativa exata da quantidade de água retida no material fibroso em estado de saturação (MORTON E HEARLE, 2008). Apesar disso, Scallan e Carles (1972) utilizando diferentes tipos de polpas e amostras de algodão e rayon observaram uma boa correlação entre o ponto de saturação da fibra e o valor de retenção de água até o valor de 1,80 g/g, já que, a partir deste, o método por centrifugação gerou valores cada vez mais baixos de WRV. Os autores concluíram que, quanto mais intumescida é uma parede celular, mais susceptível ela está à compactação e desestruturação quando uma determinada força é aplicada, o que ocasiona em uma remoção de parte da água contida dentro dos poros.

Figura 30. Correlação entre o valor de retenção de água e o teor de lignina (A) e o ponto de saturação da fibra (B) das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Com base nos dados apresentados na Figura 30, pode-se afirmar que o valor de retenção de água é uma medida que oferece informações tanto sobre a porosidade do

material quanto sobre a sua composição química. No presente estudo o WRV apresentou correlações com o teor de lignina e o ponto de saturação da fibra com R^2 de 0,849 e 0,926, respectivamente, corroborando com os dados da literatura, os quais confirmam a relação entre o WRV e estas propriedades do material lignocelulósico. Sendo assim, quando se deseja praticidade e rapidez na obtenção de resultados em detrimento de informações mais precisas e detalhadas, a determinação deste parâmetro via centrifugação ganha destaque.

5.5. Sacarificação enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido

É amplamente aceito que a lignina interfere negativamente na sacarificação da celulose durante a conversão da biomassa (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 2002). Embora o efeito primário da lignina seja o de limitar a sacarificação da celulose pela formação de uma barreira física que restringe o acesso das enzimas ao substrato, há também de se levar em consideração que a interação inespecífica lignina-enzima tem uma contribuição para a queda na taxa e eficiência de conversão durante a sacarificação de substratos lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005).

Considerando que o presente estudo visou encontrar uma correlação direta entre a porosidade e a digestibilidade enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar com teores de lignina progressivamente menores, um experimento prévio foi realizado visando definir as condições nas quais o efeito da adsorção improdutivo de celulasas na lignina fosse anulado, possibilitando atribuir toda e qualquer melhora na digestibilidade das amostras ao incremento da porosidade via remoção de lignina. Sabendo que o uso de surfactantes como Tween 20 ocasiona redução desta adsorção não produtiva melhorando os rendimentos de sacarificação enzimática (SANTOS et al., 2011), estes ensaios preliminares foram realizados utilizando amostras de bagaço *in natura* e deslignificado por 4 horas (maior e menor teores de lignina, respectivamente) na presença (0,025 g/g de bagaço) ou ausência de Tween 20. Adicionalmente, duas cargas enzimáticas (5 e 10 FPU/g de bagaço) foram testadas com o objetivo de analisar se o aumento da quantidade de enzimas iria proporcionar de fato, um ganho nas taxas de sacarificação, assegurando que houvesse quantidade de enzima suficiente e adequada para que as diferenças entre as

diferentes amostras de bagaço de cana pudessem ser refletidas nos resultados de conversão enzimática.

Os resultados obtidos nos experimentos preliminares são apresentados nas Figuras 31 e 32. Analisando a cinética da conversão de glucana para a amostra de bagaço *in natura* (Figura 31 A), pode-se observar que a reação que apresentou menor valor de conversão, $11,62 \pm 1,00\%$ após 72 h, foi a realizada na ausência de surfactante e contendo a menor carga enzimática testada (5 FPU/g de bagaço); a reação contendo 10 FPU/g de bagaço e 0,025 g de Tween 20/g de bagaço apresentou uma conversão de $16,45 \pm 1,71\%$. Quanto à cinética de conversão de xilana pode-se observar que as reações contendo surfactante alcançaram maiores valores de conversão, $10,44 \pm 1,17\%$ e $11,36 \pm 1,23\%$ (Figura 31 B). Na ausência do surfactante apenas $5,94 \pm 0,52\%$ e $8,17 \pm 0,41\%$ da xilana presente nas amostras foi convertida, nas reações com carga enzimática de 5 e 10 FPU/g de substrato, respectivamente. Já para a cinética de conversão de glucana (Figura 32 A) e xilana (Figura 32 B) da amostra de bagaço deslignificado por 4 horas, fica evidente que a carga enzimática foi o fator determinante para que uma maior conversão fosse alcançada; nas reações contendo 10 FPU/g de substrato mais de 90% da glucana e 80% da xilana presentes no material foram convertidas, enquanto que nas reações contendo apenas 5 FPU/g de bagaço estas conversões foram de cerca de 70% e 65%, respectivamente.

O efeito positivo do surfactante na sacarificação da amostra *in natura*, não observado para a amostra deslignificada por 4 horas, pode ser explicado pelo fato de que a lignina desempenha um papel importante sobre a sacarificação enzimática. Este papel foi bem elucidado pelo trabalho de Eriksson, Börjesson e Tjerneld (2002), no qual os autores observaram que a adição de Tween 20 não diminuiu a adsorção da celulase testada (CBH I) em substratos à base de celulose com alto grau de pureza (Avicel e spruce explodida a vapor após deslignificação), enquanto que, para o substrato lignocelulósico (spruce explodida a vapor), todos os surfactantes não iônicos testados reduziram a adsorção da enzima. A explicação sugerida pelos autores para o efeito do surfactante na hidrólise de lignocelulósicos é que a parte hidrofóbica do surfactante se liga por meio de interações hidrofóbicas com a lignina e o grupo hidrofílico do surfactante impede a ligação não produtiva de celulasas na lignina. Considerando que os domínios (ou módulos) de ligação de todas as celulasas de *Trichoderma reesei* (exceto a endoglucanase 3) têm aminoácidos hidrofóbicos expostos na superfície (por exemplo, o CBD da CBH I apresenta três tirosinas expostas), espera-se que o efeito negativo da lignina na sacarificação enzimática da celulose seja mesmo mais aparente em amostras mais lignificadas.

Figura 31. Cinética da sacarificação enzimática de glucana (A) e xilana (B) da amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

A melhora na sacarificação da celulose da amostra *in natura* pela adição do surfactante Tween 20 foi de cerca de 40% utilizando 5 FPU/g de bagaço, enquanto que um aumento de apenas 10% foi observado utilizando o dobro da carga enzimática. Este efeito mais proeminente do surfactante na sacarificação da celulose com baixa carga enzimática está de acordo com o observado por Kaar e Holtzaple (1998), que submeteram uma amostra de forragem de milho pré-tratada com hidróxido de cálcio à sacarificação enzimática empregando cargas enzimáticas que variaram de 1 a 15 FPU/g de substrato, com ou sem 0,15 g de Tween 20/g de substrato. Após 100 h de sacarificação, foi observado que a adição de surfactante na reação conduzida com a menor carga enzimática ocasionou em um aumento no rendimento de glicose de cerca de 40% em relação à reação sem

surfactante; já para a reação contendo a maior carga enzimática este incremento foi reduzido pela metade.

Figura 32. Cinética da sacarificação enzimática de glucana (A) e xilana (B) da amostra de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado por 4 horas.

Apesar da necessidade de mais experimentos para afirmar que a melhora nas reações de sacarificação da amostra *in natura*, promovida pela adição de surfactante, esteja relacionada exclusivamente a não adsorção das celulasas à lignina, chegou-se à conclusão de que o uso de surfactante e de uma maior carga enzimática seriam critérios importantes para se atribuir a este componente (lignina) a atuação como barreira física limitante para o acesso das enzimas aos substratos e, ao mesmo tempo, se maximizar a conversão das diferentes amostras de bagaço de cana, independentemente de sua composição.

Face ao exposto, os ensaios de sacarificação enzimática das amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas, não secas (D1h NS, D2h NS, D3h NS e D4h NS, respectivamente) e secas (D1h S, D2h S, D3h S e D4h S, respectivamente), foram realizados na presença de 0,025 g de Tween 20 + 10 FPU de celulasas para cada 1 g de amostra.

A Figura 33 apresenta as cinéticas de sacarificação dos polissacarídeos (glucana e xilana) presentes nas diferentes amostras. Analisando a cinética da conversão de glucana (Figura 33 A) e xilana (Figura 33 B), pode-se observar que quanto menos lignificadas são as amostras, maiores são os rendimentos de conversão no final das 72 horas de reação. Enquanto a amostra de bagaço *in natura* teve $19,96 \pm 1,42\%$ de glucana convertida em glicose em 72 h de hidrólise, as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas não secas apresentaram conversões de $63,58 \pm 4,17\%$, $83,88 \pm 1,40\%$, $84,10 \pm 0,53\%$ e $95,84 \pm 1,77\%$, respectivamente. Com relação à conversão de xilana, apenas $8,87 \pm 1,24\%$ foi alcançado para a amostra *in natura*, enquanto que, as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas não secas apresentaram conversões de $50,40 \pm 3,28\%$, $67,66 \pm 1,22\%$, $73,10 \pm 0,42\%$ e $85,50 \pm 5,21\%$, respectivamente. Os maiores valores de conversão de glucana e xilana alcançados pelas amostras menos lignificadas devem-se ao fato que a remoção da lignina acarretou em um aumento na acessibilidade das enzimas, como evidenciado pelos maiores valores de $VA_{50\text{\AA}}$ e $ASA_{50\text{\AA}}$ (item 5.3.2) apresentados por estas amostras, ou seja, os dados de porosidade obtidos via técnica de exclusão de solutos foram capazes de predizer a susceptibilidade das amostras em estudo à ação enzimática.

Siqueira et al. (2011) estudaram os fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose baseando-se nos tipos de células que compõem a cana-de-açúcar: vaso, fibra e parênquima. Para isso as amostras de cana foram separadas em duas frações: “pith” (região central, medula) e “rind” (região externa, córtex) e então, ambas as frações foram progressivamente deslignificadas com clorito em meio ácido. Análises topoquímicas foram realizadas por microespectrofotometria celular na região do ultravioleta para determinar a distribuição de lignina (280 nm) e ácidos hidroxicinâmicos (315 nm) nos diferentes tipos celulares, presentes nas amostras. As reações de hidrólise enzimática foram conduzidas com uma carga enzimática de 10 FPU de celulasas + 20 UI de β -glicosidases, para cada 1 g de amostra. A celulose da amostra de “pith” não tratada foi rapidamente hidrolisada a glicose, alcançando 63% de conversão depois de 72 h de reação, enquanto que amostra de “rind” não tratada apresentou apenas 20% de conversão, indicando que as células de parênquima menos lignificadas, as quais ocorrem principalmente na região do “pith”,

foram significativamente menos recalcitrantes que as fibras e vasos predominantes na região do “rind”. A redução do teor de lignina do “pith” (de 12 para 7%) não melhorou a eficiência de conversão de celulose, enquanto que para o “rind” essa redução (de 19% para 7%) ocasionou em um valor de conversão três vezes maior, 60%.

Figura 33. Cinética da sacarificação enzimática de glucana (A) e xilana (B) das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e deslignificado por 1, 2, 3 e 4 horas não secas e secas utilizando 0,025 g de Tween 20/g de bagaço e carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço.

Mooney et al. (1998) utilizaram quatro diferentes tipos de polpas de *douglas-fir* na tentativa de elucidar o papel que a lignina desempenha na limitação da sacarificação enzimática da celulose; uma Kraft (4,4% de lignina), uma obtida por refino mecânico (RMP) (27,3% de lignina), e outras duas geradas a partir desta última pelos tratamentos com clorito-ácido (8,2% de lignina) ou sulfito de sódio (30,9% de lignina). Os ensaios de sacarificação enzimática foram realizados utilizando uma carga enzimática de 60 FPU/g de

celulose. Eles observaram que as polpas que apresentaram maior $VA_{50\text{\AA}}$, Kraft (0,9 mL/g) e deslignificada com clorito (0,6 mL/g) alcançaram maiores valores de conversão de celulose após 96 h de reação, 90 e 100%, respectivamente. Enquanto que a RMP (0,1 mL/g) e a gerada pelo processo de sulfonação (0,3 mL/g), apenas 25 e 50%, respectivamente. Este comportamento também pôde ser observado considerando o FSP das amostras, com exceção da amostra de polpa sulfonada. Ela apresentou valor de FSP de 2,5 mL/g, maior que os valores obtidos para as polpas Kraft (1,2 mL/g), RMP (0,14 mL/g) e deslignificada com clorito (2,1 mL/g). Esta discrepância pode ser explicada considerando que o processo de sulfonação introduz grupos ácidos sulfônicos hidrofílicos na lignina, resultando em um substrato com maior capacidade de reter água, ou seja, dependendo do tratamento utilizado, o aumento do FSP pode não levar a um incremento da porosidade e concomitante ganho de acessibilidade às celulases.

Alguns autores observaram uma boa correlação entre a área superficial acessível a uma molécula de 50 Å ($ASA_{50\text{\AA}}$) e os rendimentos de glicose após 2 horas de sacarificação (GRETHLEIN, 1985; THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992; WONG et al., 1988). Esta relação deve-se ao fato que a porosidade de uma amostra deve ser um fator crucial para a conversão da celulose nas primeiras horas de sacarificação, pois esta conversão inicial é ditada pelo número de ligações glicosídicas que são acessíveis às enzimas (GRETHLEIN, 1985).

No presente estudo quando a conversão de glucana após 2 horas de sacarificação foi plotada em função da $ASA_{50\text{\AA}}$ (Figura 34 A) uma correlação linear com baixo valor de coeficiente angular foi obtida. Ou seja, a conversão de glucana, principalmente das amostras de bagaço deslignificado, não aumenta muito com o incremento da $ASA_{50\text{\AA}}$ pela remoção de lignina. Isso pode ser explicado com base nos teores de xilana das amostras. Todas as amostras apresentaram teores de xilana semelhantes. Sendo assim, sabendo que este componente cobre as fibrilas de celulose na parede celular, formando uma barreira física que impede o acesso das celulases (YOSHIDA et al., 2008), espera-se que estas amostras apresentem semelhante acessibilidade à celulose; logo, valores de conversão similares. Como pode ser observado na Figura 34 B a conversão de xilana apresenta uma boa correlação linear com a $ASA_{50\text{\AA}}$ ($R^2 = 0,895$), na qual o aumento da $ASA_{50\text{\AA}}$ acarreta em valores muito maiores de conversão. Deste modo, pode-se afirmar que nas duas primeiras horas de reação, a área superficial acessível de celulose pouco variou entre as amostras deslignificadas, já que esta acessibilidade era ditada pela quantidade de hemiceluloses do material, que permaneceu praticamente inalterada após o processo de

deslignificação (item 5.1). Assim conforme o transcorrer da conversão de xilana, pelas xilanases presentes na reação, mais acessíveis se tornaram as fibrilas de celulose. Essa hipótese é corroborada pela correlação positiva entre a $ASA_{50\text{\AA}}$ e a conversão de glucana após as 72 horas de sacarificação (Figura 34 C), o que demonstra que em períodos mais avançados da reação as hemiceluloses “devolveram” para a lignina o papel de principal limitador da sacarificação enzimática da celulose.

Figura 34. Correlação entre a área superficial acessível a uma molécula de 50 Å de diâmetro e a conversão de glucana (A) e xilana (B) após 2 horas e a conversão de glucana após 72 horas (C) das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Grethlein (1985) empregou o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em três diferentes substratos, uma mistura de madeira de folhosas, *poplar* e *white pine*, com o objetivo de relacionar o incremento na conversão de celulose ao aumento da porosidade do material. Os ensaios de sacarificação enzimática foram realizados utilizando uma mistura contendo 17 FPU/g de substrato de atividade de celulasas totais, suplementada com

celobiase. A mistura de madeira de folhosas não tratada apresentou uma $ASA_{50\text{\AA}}$ de 11 m^2/g . Após ser submetida ao tratamento ácido (1% de ácido por 7,8 segundos a 220°C) este valor aumentou para 140 m^2/g , aumento este que foi refletido na digestibilidade das amostras, já que, enquanto a amostra não tratada apresentou conversão de celulose de 4,1 e 15,3% após 2 e 24 horas de reação, respectivamente, para a amostra tratada estes valores foram de 64,0 e 87,0%. E este comportamento se repetiu para *poplar* e *white pine*. Com o tratamento ácido (0,41% de ácido por 6 segundos a 200°C) a $ASA_{50\text{\AA}}$ da amostra de *poplar* aumentou de 7 para 88 m^2/g , aumentando a conversão de celulose de 3,5 para 39,0% e de 17,3 para 85,6% nos tempos de 2 e 24 horas de reação, respectivamente. Já para a amostra de *white pine* a $ASA_{50\text{\AA}}$, que era de 14 m^2/g , subiu para 80 m^2/g após o tratamento com uma carga de 1% de ácido sulfúrico por 7 segundos a 220°C . Este aumento na porosidade da amostra foi responsável pelo incremento na conversão de celulose de 3,2 para 26,4% em 2 horas de reação e de 10,0 para 33,9% após 24 horas. O aumento da porosidade, ocasionado pela remoção de hemiceluloses por meio do tratamento com ácido sulfúrico diluído, apresentou uma correlação linear com o incremento da conversão de celulose após 2 horas de reação ($R^2 = 0,97$).

Outro trabalho em que uma correlação entre porosidade e conversão inicial de celulose pôde ser traçada com alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,89$) foi o desenvolvido por Wong et al. (1988). Neste trabalho uma amostra de *Pinus radiata* foi submetida à explosão a vapor, variando o grau de severidade com base na carga de SO_2 , temperatura e tempo de residência. Enquanto a amostra submetida à condição mais branda, capaz de diminuir o teor de hemiceluloses de 23,0 para 9,5%, levou a uma conversão de celulose de 7,5% em 2 horas de reação, na condição mais severa (teor de hemiceluloses reduzido a 0%) esta conversão foi de 32,4%. Esta maior reatividade se deve a uma maior $ASA_{50\text{\AA}}$, 46 m^2/g contra 131 m^2/g . Visando estudar o efeito da lignina tanto na porosidade quanto na digestibilidade, os autores obtiveram um novo conjunto de amostras utilizando a condição mais severa de tratamento. Após o tratamento uma parte das amostras foi lavada com água e o restante foi submetido a uma lavagem alcalina com hidróxido de sódio e posterior deslignificação pelo método de clorito-ácido. No entanto, menores valores de $ASA_{50\text{\AA}}$ e de conversão de celulose foram obtidos para a amostra deslignificada em relação à amostra lavada com água. Este efeito negativo foi atribuído a uma possível redistribuição de lignina que, por ser apenas parcialmente solúvel em soluções cáusticas diluídas, pode ter se redepositado cobrindo as superfícies das microfibrilas de celulose e então reduzindo

o volume de poros acessíveis e a digestibilidade da amostra de modo que o tratamento com clorito não foi suficiente para reverter este quadro.

Thompson, Chen e Grethlein (1992) utilizaram uma mistura de folhosas para comparar quatro pré-tratamentos com base na conversão de celulose e área superficial disponível - peróxido alcalino, organossolve (etilenodiamina), hidrólise ácida e autohidrólise. Para todas as amostras uma carga enzimática de 40,8 FPU/g de madeira foi utilizada nos ensaios de sacarificação. Analisando os resultados obtidos, pode-se observar que a hidrólise com ácido sulfúrico diluído apresentou o melhor resultado. Por meio deste tratamento a $ASA_{50\text{\AA}}$ que era de $15 \text{ m}^2/\text{g}$ no material não tratado, passou para $128 \text{ m}^2/\text{g}$, aumentando concomitantemente os valores de conversão de celulose em 2 e 24 horas de reação, de 9,8 e 14,7% para 71,0 e 97,7%, respectivamente. De modo geral, todos os tratamentos foram eficientes, tanto para o incremento da $ASA_{50\text{\AA}}$ quanto para o aumento da susceptibilidade da amostra à sacarificação enzimática. A maior reatividade das amostras, atribuída à retirada de lignina, no caso do peróxido alcalino e organossolve, e hemiceluloses, no caso da hidrólise ácida e autohidrólise, permitiu que uma correlação linear entre $ASA_{50\text{\AA}}$ e conversão de celulose em 2 horas de reação fosse obtida, com coeficiente de determinação de 0,89.

Conforme pode ser observado pela Figura 33, a secagem ao ar livre em temperatura ambiente não afetou a digestibilidade das amostras em 72 h de hidrólise, uma vez que as conversões de glucana obtidas para as amostras deslignificadas por 1, 2, 3 e 4 horas foram de $64,28 \pm 0,90\%$, $79,01 \pm 2,92\%$, $86,13 \pm 3,31\%$ e $99,85 \pm 2,05\%$, respectivamente. Tal comportamento já era esperado uma vez que, conforme já discutido no item 5.3.2, não houve perda substancial na área acessível a uma molécula com diâmetro supostamente similar ao das celulasas após a secagem das amostras. Aparentemente o processo de hornificação ocasionou apenas a perda de poros com diâmetros inferiores a $9 \text{ \AA}$ (Tabela 12).

Vale ressaltar que alguns experimentos preliminares de sacarificação de amostras de bagaço deslignificadas e secas em estufa a 105°C mostraram uma diminuição de até 24% na eficiência de conversão enzimática de celulose após 72 h de hidrólise (dados não apresentados). Comportamentos semelhantes, devidos à ocorrência de hornificação em temperaturas elevadas, também foram observados por Chandra al. (2008) e Luo e Zhu (2011). Entretanto, para reproduzir as condições reais de secagem, nas quais o bagaço perde umidade para o ambiente em temperaturas amenas, o procedimento de secagem ao ar em temperatura ambiente foi escolhido para ser avaliado neste estudo.

Como pôde ser observado, mediante a análise dos resultados obtidos pelo presente estudo, a medida do volume e/ou da área superficial acessível para o complexo enzimático celulolítico, via técnica de exclusão de solutos, pode ser usada para prever a reatividade do material estudado. O ponto de saturação da fibra e o valor de retenção de água, apesar de apresentarem correlação linear com os dados de conversão enzimática (Figura 35), podem em alguns casos não refletir mudanças na acessibilidade das enzimas à celulose já que ambos os parâmetros representam o volume total de poros. No presente estudo, por exemplo, as modificações promovidas pela secagem na estrutura porosa das amostras de bagaço não afetaram as eficiências de sacarificação já que apenas poros com tamanhos menores do que os das celulasas colapsaram irreversivelmente.

Figura 35. Correlação entre a conversão de glucana após 72 horas de sacarificação enzimática e o ponto de saturação da fibra (A) e o valor de retenção de água (B) das amostras de bagaço utilizadas no presente estudo.

Outro ponto evidenciado pelos resultados obtidos é que a eficiência de um pré-tratamento no aumento da digestibilidade de um substrato é ditada pela capacidade que ele tem de desestruturar a parede celular. A quebra das ligações que unem os componentes da parede e a remoção destes aumenta a acessibilidade das enzimas ao seu substrato, acarretando em maiores taxas e rendimentos de conversão de celulose. No caso, a especificidade do tratamento com clorito-ácido permitiu avaliar que a remoção da lignina por si só pode não ser capaz de aumentar a taxa inicial da sacarificação da celulose, caso o teor de hemiceluloses seja mantido. Ou seja, como ambos os componentes atuam como uma barreira física entre as celulasas e as microfibrilas de celulose, ambos precisam ser

removidos para que o aumento da porosidade do material represente um aumento da acessibilidade à celulose.

Por último, vale ressaltar que os resultados detalhados sobre a porosidade de um material lignocelulósico gerados pela técnica de exclusão de solutos, capazes de correlacionar as propriedades física (porosidade) e química (teor de lignina) de um material lignocelulósico com a sua resposta ao tratamento enzimático, fazem desta técnica uma ferramenta valiosa para o estudo da utilização de diferentes tipos de biomassa na produção de etanol celulósico.

6. CONCLUSÕES

Com base na discussão dos resultados obtidos pelo presente estudo, pode-se concluir que:

(i) O método de deslignificação por clorito de sódio em meio acidificado por ácido acético foi eficiente na retirada seletiva de lignina, permitindo a manutenção dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) na fração sólida;

(ii) As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que a remoção de lignina ocasionou mudanças estruturais no bagaço de cana, evidenciadas pelo desfibramento das células;

(iii) A técnica de exclusão de solutos foi implementada com êxito, já que os dados gerados pela aplicação do método estão de acordo com a literatura. Quanto maior o teor de lignina menor o volume e área superficial de poros da amostra. Já a secagem ao ar em temperatura ambiente ocasionou apenas o colapso de poros com diâmetros inferiores a 9 Å;

(iv) Quanto maior o teor de lignina menor o valor de retenção de água da amostra. Além disso, os valores obtidos por este método foram similares e apresentaram boa correlação com os pontos de saturação da fibra obtidos via técnica de exclusão de solutos;

(v) Quanto maior o teor de lignina menor a sacarificação enzimática da celulose. A secagem não apresentou efeito negativo na sacarificação das amostras, pois não alterou o volume nem a área superficial de poros com diâmetro médio de 50 Å, valor estimado como representativo para o diâmetro médio das celulasas;

(vi) A sacarificação enzimática da celulose, a distribuição do volume e área superficial de poros e o teor de lignina apresentaram boas correlações, com coeficientes de determinação superiores a 0,780. Quanto maior o teor de lignina menor a porosidade e a sacarificação enzimática.

REFERÊNCIAS

ABUJA, P. M.; SCHMUCK, M.; PILZ, I.; TOMME, P.; CLAEYSSSENS, M.; ESTERBAUER, H. Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **European Biophysics Journal**, v. 15, p. 339-342, 1988a.

ABUJA, P. M.; PILZ, I.; CLAEYSSSENS, M.; TOMME, P. Domain structure of cellobiohydrolase II as studied by small angle X-ray scattering: Close resemblance to cellobiohydrolase I. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 156, p. 180-185, 1988b.

ABUJA, P. P.; HAYN, M.; CHEN, H.; ESTERBAUER, H. The structure of endoglucanase I (*Trichoderma reesei*) in solution. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 93, p. 181, 1993.

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.

ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 82-91, 2006.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for na efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANDREASSON, B.; FORSSTRÖM, J.; WAGBERG, L. Determination of fibre pore structure: influence of salt, pH and conventional wet strength resins. **Cellulose**, v. 12, p. 253-265, 2005.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.

BALAT, M; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BEECHER, J. F.; HUNT, C. G.; ZHU, J. Y. Tools for the characterization of biomass at the nanometer scale. In: LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. **The nanoscience and technology of renewable biomaterials**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2009, cap. 3, p. 61-90.

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.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.B.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes – A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 163-170, 2005.

BERRY, S. L.; RODERICK, M. L. Plant-water relations and the fibre saturation point. **New Phytologist**, v. 168, p. 25-37, 2005.

BOISSET, C.; BORSALI, R.; SCHÜLEIN, M.; HENRISSAT, B. Dynamic light scattering study of the two-domain structure of *Humicola insolens* endoglucanase V. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 376, p. 49-52, 1995.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 576-581, 2003.

BROWNING, B. **Methods of Wood Chemistry**. New York: John Wiley and Sons, 1967. 882p.

BURNS, D. S.; OOSHIMA, H.; CONVERSE, A. O. Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20/21, p. 79-94, 1989.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

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

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CAULFIELD, D.; MOORE, W.E., Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Wood Science**, v. 4, p. 375-379, 1974.

CHANDRA, R. P.; EWANICK, S. M.; CHUNG, P. A.; AU-YEUNG, K.; RIO, L. D.; 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.; 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.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T., Fundamental factor affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 5-37, 2000.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, Safra 2011/2012, Segundo levantamento, Agosto/2011**. Disponível em: www.conab.gov.br. Acessado em: 21 nov. 2011.

CONVERSE, A. O.; OOSHIMA, H.; BURNS, D. S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 67-73, 1990.

COWLING, E. B. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 5, p. 163-181, 1975.

DAVIES, G. J.; DODSON, G. G.; HUBBARD, R. E.; TOLLEY, S. P.; DAUTER, Z.; WILSON, K. S.; HJORT, C.; MIKKELSEN, J. M.; RASMUSSEN, G.; SCHÜLEIN, M. Structure and function of endoglucanase V. **Nature**, v. 365, p. 362-364, 1993.

DINIZ, J. M. B. F.; GIL, M. H.; CASTRO, J. A. A. M. Hornification – its origin and interpretation in wood pulps. **Wood Science Technology**, v. 37, p. 489-494, 2004.

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, p. 103-111, 2001.

EISENTRAUT, A. **Sustainable production of second-generation biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries**. Paris: International Energy Agency, 2010, 217 p. Information Paper.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1: Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. 308p.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353–364, 2002

ESTEGHLALIAN, A. R.; BILODEAU, M.; MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulose enzymes? **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1049-1054, 2001.

ESTEGHLALIAN, A. R.; MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. Cellulases: Agents for fiber modification or bioconversion? The effect of substrate accessibility on cellulose enzymatic hydrolyzability. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, v. 21, p. 21-36, 2002.

ESTEVEZ, P. J. 2011. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

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

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.

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.

FREY-WYSSLING, A. The fine structure of cellulose microfibrils. **Science**, v. 119, p. 80-82, 1954;

FRIGON, R. P.; LEYPOLDT, J. K.; UYEJL, S.; HENDERSON, L. W. Disparity between stokes radii of dextrans and proteins determined by retention volume in gel permeation chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1349-1354, 1983.

GALVÃO, L. S.; FORMAGGIO, A. R.; TISOT, D. A. Discrimination of sugarcane varieties in Southeastern Brazil with EO-1 Hyperion data. **Remote Sensing of Environment**, v. 94, p. 523-534, 2005.

GARDNER, P. T.; WOOD, T. J.; CHESSON, A.; STUCHBURY, T. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 11-18, 1999.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOMES, C. M. P. **Recuperação de ouro por permuta iônica com resinas usadas**. 1996. 164 p. Dissertação (Mestrado) Universidade do Porto, Porto, 1996.

GREGG, D. J.; SADDLER, J. N., Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 375-383, 1996.

GRETHLEIN, H. E. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Bio/Technology**, v. 3, p. 155-160, 1985;

GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of *poplar*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 274-280, 1986;

GUO, W-J.; WANG, Y.; WAN, J-Q.; MA, Y-W. Effects of slushing process on the pore structure and crystallinity in old corrugated container cellulose **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1-7, 2011.

GURGEL, L. V. A.; FREITAS, R. P.; GIL, L. F. Adsorption of Cu(II), Cd (II) and Pb(II) from aqueous single metal solution sugarcane bagasse and mercerized sugarcane bagasse

chemically modified succinic anhydride. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 922-929, 2008.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HILL, C. A. S.; FORSTER, S. C.; FARAHANI, M. R. M.; HALE, M. D. C.; ORMONDROYD, G. A.; WILLIAMS, G. R. An investigation of cell wall micropore blocking as a possible mechanism for the decay resistance of anhydride modified wood. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p. 69-76, 2005.

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**, 2011. In press.

HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Understanding the key factors for enzymatic conversion of pretreated lignocellulose by partial least square analysis. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 384-392, 2010.

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

HUI, L.; LIU, Z.; NI, Y. Characterization of high-yield pulp (HYP) by the solute exclusion technique. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6630-6634, 2009;

ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; SCHELL, D. F.; JOHNSON, D. K. Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2575-2581, 2007;

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.

JAYME, G.; HUNGER, G. Verhornungserscheinungen an Cellulosefaserstrukturen in elektronenoptischer Sicht. **Monatshefte für Chemie**, v. 87, p. 8-23, 1956.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.

KAAR, W.E.; HOLTZAPPLE, M.T. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 419-427, 1998.

KONGDEE, A.; BECHTOLD, T.; BURTSCHER, E.; SCHEINECKER, M. The influence of wet/dry treatment on pore structure-the correlation of pore parameters, water retention and moisture regain values. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 39-44, 2004.

KUHAD, R. C.; CHANDNA, P.; LATA; SINGH, A. Composting of Lignocellulosic Waste Material for Soil Amendment. In: SINGH, A; PARMAR, N.; KUHAD, R. C. **Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol**. New York: Springer, 2011. cap. 6, p. 107-128.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA. R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 201-208, 2012.

LANDRY, M. R. Thermoporometry by differential scanning calorimetry: experimental considerations and applications. **Thermochimica Acta**, v. 433, p. 27-50, 2005.

LANGE, J. P. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 39-48, 2007.

LEE, H. J.; BROWN, M. A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: a high resolution electron microscopy study. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 127-136, 1997.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood Structure and Composition**, New York: Marcel Dekker, 1991. 512p.

LIAO, W.; WEN, Z.; HURLEY, S.; LIU, Y.; LIU, C.; CHEN, S. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, 1017-1030, 2005.

LIN, J. K.; LADISCH, M. R.; PATTERSON, J. A.; NOLLER, C. H. Determining pore size distribution in wet cellulose by measuring solute exclusion using a differential refractometer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 976-981, 1987;

LIN, K. W.; LADISCH, M. R.; VOLOCH, M.; PATTERSON, J. A., NOLLER, C. H. Effect of pretreatments and fermentation on pore size in cellulosic materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1427-1433, 1985;

LIU, C.; BAMMER, R.; ACAR, B.; MOSELEY, M. E. Characterizing non-gaussian diffusion by using generalized diffusion tensors. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 51, p. 924-937, 2004.

LUO, X.; ZHU, J. Y. Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 92-99, 2011.

MALONEY, T. C.; PAULAPURO, H. The formation of pores in the cell wall. **Journal of pulp and paper science**, v. 25, p. 430-436, 1999.

MALVERN. Disponível em: <www.malvern.com>. Acesso em: 18 nov. 2011.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MCKAY, G. Application of surface diffusion model to the adsorption of dyes on bagasse pith. **Adsorption**, vol. 4, p. 361-372, 1998.

MCKAY, G.; GEUNDI, M. E.; NASSAR, M. M. Pore diffusion during the adsorption of dyes onto bagasse pith. **Trans IChemE**, v. 74, p. 277-288, 1996.

MILNE, T. A.; CHUM, H. L.; AGBLEVOR, F.; JOHNSON, D. K. Standardized analytical methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 2, p. 341-366, 1992.

MOONEY, C. A; MANSFIELD, S. D; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 113-119, 1998;

MORTON, W. E.; HEARLE, J. W. S. **Physical properties of textile fibres**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008. 746p.

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

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.

NOGUEIRA, L. A, H. **Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES and CGEE Organização, 2008. 316p.

OLIVEIRA, V. M. F.; RESENDE, M. M.; ROMANIELO, L. L. Avaliação do uso do bagaço de cana na adsorção de proteína do soro do leite. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu. **Livro de resumos**. Foz do Iguaçu: Cubo, 2010, p. 333.

OLIVER III, J. D.; ANDERSON, S.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M.; DEEN, W. M. Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with ficoll. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, p. 214-228, 1992.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PARK, S.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H.; PAWLAK, J. J. Changes in pore size distribution during the drying of cellulose fibers as measured by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 97-103, 2006;

PEJIC, B. M.; KOSTIC, M. M.; SKUNDRIC, P. D.; PRASKALO, J. Z. The effects of hemicelluloses and lignin removal on water uptake behavior of hemifibers. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7152-7159, 2008.

PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1219-1222, 1984.

RECEVEUR, V.; CZIZEK, M.; SCHÜLEIN, M.; PANINE, P.; HENRISSAT, B. Dimension, Shape, and Conformational Flexibility of a Two Domain Fungal Cellulase in Solution Probed by Small Angle X-ray Scattering. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 40887-40892, 2002.

SANDGREN, M.; SHAW, A.; ROPP, T. H.; WU, S.; BOTT, R.; CAMERON, A. D.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C.; JONES, T. A. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* Family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 295-310, 2001.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURBADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 59, p. 447-450, 2001;

SANTOS, V. T. O.; ESTEVES, P. J.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1089-1098, 2011.

SANTOS, V. T. O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

SCALLAN, A. M.; CARLES, J. E. The correlation of the water retention value with the fibre saturation point. **Svensk Papperstidning**, v. 17, p. 699-703, 1972.

SCHMUCK, M.; PILZ, I.; HAYN, M.; ESTERBAUER, H. Investigation of cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* by small angle X-ray scattering. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 397-402, 1986.

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. 27, p. 395-401, 2011.

STAMM, A. J. **Wood and Cellulose Science**. New York: The Ronald Press, 1964. 549p.

STONE, J. E.; SCALLAN, A. M. (1967) The effect of component removal upon the porous structure of the cell wall of wood. II Swelling in water and the fiber saturation point. **Tappi Journal**, v. 50, p. 496-501, 1967;

STONE, J. E.; SCALLAN, A. M. A Structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 2, p. 343-358, 1968a;

STONE, J. E.; SCALLAN, A. M. The effect of component removal upon the porous structure of the cell wall of wood. III A comparison between the sulphite and Kraft processes. **Pulp and Paper Magazine of Canada**, p. 69-74, 1968b;

STONE, J. E.; TREIBER, E.; ABRAHAMSON, B. Accessibility of regenerated cellulose to solute molecules of a molecular weight of 180 to 2×10^6 . **Tappi Journal**, v. 52, p. 108–110, 1969.

STRANGE, J. H.; RAHMAN, M.; SMITH, E. G. Characterization of porous solids by NMR. **Physical Review Letters**, v. 71, p. 3589-3591, 1993.

SUSANTO, H.; FRANZKA, S.; ULBRICHT, M. Dextran fouling of polyethersulfone ultrafiltration membranes – Causes, extent and consequences. **Journal of Membrane Science**, v. 296, p. 147-155, 2007.

TEMPLETON, D. W.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, J. B.; WOLFRUM, E. J. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9054-9062, 2010.

THOMPSON, D. N. **The effects of physical and chemical constraints on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials**. 1989. 144 p. Thesis (Master of Science), Department of chemical engineering, Michigan State University, Michigan, 1989.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H-C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 155-163, 1992.

TIEMANN, H. D. Effect of moisture upon the strength and stiffness of wood. **US Department of Agriculture for Service Bulletin**, v. 70, 144 p., 1906.

VAN DYKE, B. H. **Enzymatic hydrolysis of cellulose – A kinetic study**. 1972. 330 p. Cambridge: University of Pennsylvania, 1972, 330 p. Thesis (Ph.D), Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1972.

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

WAN, J. Q.; WANG, Y.; XIAO, Q. Effects of hemicellulose removal on cellulose fiber structure and recycling characteristics of eucalyptus pulp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4577-4583, 2010.

WICKRAMASINGHE, S. R.; BOWER, S. E.; CHEN, Z.; MUKHERJEE, A.; HUSSON, S. M. Relating the pore size distribution of ultrafiltration membranes to dextran rejection. **Journal of Membrane Science**, v. 340, p. 1-8, 2009.

WONG, K. K. Y.; DEVERELL, K. F.; MACKIE, K. L.; CLARK, T. A.; DONALDSON, L. A. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 447-456, 1988.

YAO, Y.; LENHOFF, A. M. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 273-282, 2004.

YOSHIDA, M.; LIU, Y.; UCHIDA, S.; KAWARADA, K.; UKAGAMI, Y.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; FUKUDA, K. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, p. 805-810, 2008.

YU, X.; MINOR, J. L.; ATALLA, R. H. Mechanism of action of Simons' stain. **Tappi Journal**, v. 6, p. 175-180, 1995.

YU, Z.; JAMEEL, H.; CHANG, H-M.; PARK, S. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9083-9089, 2011.

ZHANG, Y. Z.; LIU, J.; GAO, P. J.; MA, L. P.; SHI, D. X.; PANG, S. J. Structure investigation of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma pseudokoningii* S38 with a scanning tunneling microscope. **Applied Physics**, v. 67, p. 483-485, 1998.