THALES HENRIQUE DE FREITAS COSTA

**Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de
cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina**

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. André Luis Ferraz

EDIÇÃO REIMPRESSA E CORRIGIDA

Lorena - SP
Outubro, 2012

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

Costa, Thales Henrique de Freitas

Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina / Thales Henrique de Freitas Costa. –ed. reimpr., corr.– 2012.

88 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. 2012.

Orientador: André Luis Ferraz.

1. Cana-de-açúcar 2. Hidrólise enzimática 3. Lignina 4. Plantas híbridas I. Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

633.61 - CDU

Aos meus pais, Leila e José Alves, que onde quer que eu vá, estão sempre
“segurando as cordas”.

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente a Deus, que me criou e não poupou bênçãos em minha vida enquanto estive no Mestrado. A Ele toda honra e glória!
- Ao meu orientador Prof. Dr. André Ferraz, por sua orientação sempre presente e exímia.
- Aos meus pais, Leila e Zé Alves, pelo apoio incondicional e principalmente, orações. As minhas lindas irmãs, Thayane e Thâmara, por mais uma vez fazerem de mim o melhor irmão de todos. A meus tios, tias, avós e primos que estiveram sempre em contato e torceram por mim.
- Aos meus amigos de Caratinga (Unidos da Bléia) por me ajudarem a sempre recarregar as baterias quando estava de volta. Um salve especial pro meu amigo e cunhado Leonardo!
- Aos amigos da Assembleia de Deus em Lorena, em especial: Marcelo, Ingrid, Cibele, Mateus Martins, Henrique, Mateus Ligabo, Neil, Jacson, Joel, Ícaro e Lucas. Obrigado por serem sempre coluna em minha vida aqui em Lorena!
- Aos amigos do Lab. de Ciências da Madeira: José Moreira, Gina, Fernanda, Dayelle, Omar, Aline, Léo, María Fernanda. Aos demais amigos do Debiq pelo apoio: José Carlos, Juan, Bel, Babi, Débora Laurito, Joseana Rocha, Fernanda Mendes, e todos do Laboratório de Enzimologia. Muito obrigado!
- Não menos importante, um agradecimento especial ao Rafael Cunha e Germano sem os quais não estaria aqui hoje, obrigado!
- À Aliança Bíblica Universitária da EEL, por tornarem tudo isso mais fácil. Em especial ao grande Calebe!
- E à Capes pelo auxílio financeiro e USP pela oportunidade.

"For it has been granted to you on behalf of Christ not only to believe in him,
but also to suffer for him." Philippians 1:29

RESUMO

COSTA, T. H. F. **Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina.** 2012. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2012.

O presente trabalho avaliou a recalcitrância de diferentes regiões do entrenó de plantas de cana-de-açúcar que apresentavam teores contrastantes de lignina total. As amostras com baixo teor de lignina corresponderam aos híbridos experimentais denominados de H58 e H89, com 18,6% e 16,8% de lignina, respectivamente. As amostras com elevado teor de lignina corresponderam ao híbrido H140 e a um cultivar comercial (CR), com 21,5% e 24,5% de lignina, respectivamente. De cada cana foram obtidas quatro regiões distintas dos entrenós: medula, interface medula-córtex, córtex e fração externa (epiderme mais córtex periférico). Cada uma das amostras foi submetida à hidrólise enzimática com celulasas comerciais. Os resultados mostraram uma maior conversão de celulose e hemicelulose na região da medula (celulose: 86%, 78%, 85% e 50%; xilanas: 50%, 36%, 31% e 30% após 72h, para CR, H58, H89 e H140, respectivamente). O córtex e a fração externa foram as regiões mais recalcitrantes, já que as conversões de celulose e xilanas atingiu somente 10% a 38% no córtex e 6% a 10% na fração externa. Embora seja pouco recalcitrante, a medula representou menos do que 10% do volume e da massa do entrenó. Em contraste, o córtex representou 49% do volume do entrenó e 48% a 63% da massa, dependendo do híbrido estudado. A região medular também mostrou a predominância de glucanas (41% - 55%) e menor teor de hemiceluloses (16,8% - 20,5%; exceto H140) e lignina total (12,6% - 18,5%) em relação às demais frações. A determinação de ácidos hidroxicinâmicos nas amostras indicou a predominância de ligações destes ácidos na forma de éster com a hemicelulose e simultaneamente éter com a lignina, independentemente da fração de cana avaliada. Dentre os híbridos, o H89 e o H140 se destacaram por sua baixa e alta recalcitrância, respectivamente. Nas análises microscópicas, o número de feixes vasculares por área foi maior na região do córtex (13 a 22 feixes por 16 mm²) quando comparada com outras regiões, enquanto a fração externa apresentou apenas fibras. A medula se mostrou preenchida, em sua maior parte, por células do parênquima, contendo menos feixes vasculares (5 a 8 feixes por 16 mm²). Dentre os híbridos, o H140 foi o que apresentou menos feixes por área, porém com os maiores diâmetros (entre 390 e 583 µm, dependendo da região). A presença de feixes vasculares mostrou ser muito importante para explicar a recalcitrância das amostras. Dentre os estudos de correlação realizados, foi possível notar que a recalcitrância das canas estudadas pode ser relacionada não apenas com o teor de lignina total, mas também com a densidade do material, a disponibilidade de celulose e a extensão dos feixes vasculares por área.

Palavras chaves: Cana-de-açúcar. Hidrólise enzimática. Plantas híbridas. Lignina.

ABSTRACT

COSTA, T. H. F. **Assessment of the recalcitrance of different regions derived from sugarcane internodes in hybrids with varying amounts of lignin.** 2012. 88p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2012.

This study evaluated the recalcitrance of different regions of the internodes of sugarcane plants which presented contrasting lignin contents. Samples with low lignin content corresponded to the experimental hybrids termed H58 and H89, each one with 18,6% and 16,8% of lignin, respectively. The samples with high lignin content corresponded to the hybrid H140 and a commercial variety of sugarcane (CR), with 21,5% and 24,5%, respectively. Different fractions of the internodes were obtained from each plant: pith, pith-rind interface, rind and outermost rind (epidermis plus peripheral rind). Each sample was submitted to enzymatic hydrolysis with commercial cellulases. Results showed a higher conversion of cellulose and hemicellulose in the pith (cellulose: 86%, 78%, 85% and 50%, xylan: 50%, 36%, 31% and 30% after 72 hours for CR, H58, H89 and H140, respectively). Rind and outermost rind were the most recalcitrant regions, since the cellulose and xylan conversions reached only 10% to 38% in rind and 6% to 10% in the outermost rind. Despite its low recalcitrance, the pith region represented less than 10% of the volume and the dry mass of the internode. In contrast, the rind represented 49% of the internode volume and 48% to 63% of the dry mass, depending on the evaluated hybrid. The pith region also showed the predominance of glucan (41% - 55%) and the lowest contents of hemicellulose (16.8% - 20.5%, except for H140) and total lignin (12.6% - 18.5%). From the hydroxycinnamic acids determination, it was found that these acids were mostly linked to hemicellulose as esters and, simultaneously, to lignin as ether, regardless which fraction was analyzed. Among the hybrids, H89 and H140 stood out for its low and high recalcitrance, respectively. In microscopic analysis, the number of vascular bundles per area was greater in the rind region (13 to 22 bundles per 16 mm²) when compared to other regions, meanwhile the outermost rind showed only fiber cells. The pith showed itself occupied mostly by parenchyma cells, containing less vascular bundles (5 to 8 bundles per 16 mm²). Among the hybrids, H140 showed the smallest number of vascular bundles per area, but with the largest diameters (between 390 and 583 µm, depending on the region type). The presence of the vascular bundles was found to be very important in order to explain the recalcitrance of the samples. Among the correlation analysis performed, it was noticeable that the recalcitrance of the studied sugarcanes could be related, not only to the total lignin content, but also to the biomass density, the cellulose availability and the extent of vascular bundles per area.

Keywords: Sugarcane. Enzymatic hydrolysis. Hybrid plants. Lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático demonstrando a anatomia típica de gramíneas.	22
Figura 2. Feixe vascular típico de cana-de-açúcar.....	23
Figura 3. Cortes transversais de cana-de-açúcar apresentando a anatomia de um A) entrenó e B) um nó.....	23
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da parede de células de madeira (fibras) e modelo esquemático ilustrando a orientação das microfibrilas de celulose nas subcamadas da parede celular.	26
Figura 5. Esquema de ação das celulasas sobre a celulose.....	28
Figura 6. Relação entre a extensão da remoção de lignina em <i>Acer</i> sp. com a digestibilidade enzimática da celulose.	32
Figura 7. A incorporação de um éster dimérico do ácido ferúlico como precursor da biossíntese <i>in vitro</i> de lignina gera um “novo” tipo de lignina com uma ligação facilmente saponificável.	34
Figura 8. Micrografia de cortes de entrenós de caule de milho mostrando a extensão da hidrólise com celulasas provenientes de rúmen.	35
Figura 9. Fórmulas estruturais dos ácidos ferúlico e cumárico.....	35
Figura 10. Conversão da celulose através de hidrólise enzimática de 13 variedades de cana-de-açúcar não pré-tratadas.....	37
Figura 11. Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões da cana.	42
Figura 12. Fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó da cana de referência.	42

Figura 13. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana de referência.....	48
Figura 14. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 58.....	49
Figura 15. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 89.....	50
Figura 16. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 140.....	51
Figura 17. Densidade relativa das frações medula, interface, córtex e externa de cada tipo de cana amostrada.....	54
Figura 18. Correlação entre densidades relativas das frações dos entrenós e digestibilidade da celulose.	55
Figura 19. Correlação entre teor de lignina total e digestibilidade da celulose. ...	58
Figura 20. Correlação entre hemiceluloses totais (xilanas, arabinosil e acetil) e digestibilidade da celulose.	58
Figura 21. Proporção de grupos pendentes na hemicelulose de cada fração das canas amostradas.	60
Figura 22. Correlação entre a “disponibilidade de celulose” e digestão da celulose.....	62
Figura 23. Correlação entre os teores de ácidos hidroxicinâmicos totais (ferúlico e cumárico) e lignina total.	66
Figura 24. Correlação entre os teores de ácidos hidroxicinâmicos totais (ferúlico e cumárico) e digestão da celulose	66
Figura 25. Feixes vasculares de diferentes regiões da cana de referência em aumento de 50X.	68

Figura 26. Corte transversal de um entrenó de cana-de-açúcar mostrando a variação de tamanho das células e feixes vasculares na direção centro-periferia.	68
Figura 27. Diâmetro dos feixes vasculares das regiões da medula, interface e córtex nas amostras de canas-de-açúcar avaliadas.	71
Figura 28. Proporção da extensão de feixes vasculares por área nas regiões da medula, interface e córtex das amostras de canas-de-açúcar avaliadas.....	72
Figura 29. Feixes vasculares da região do córtex em aumento de 50X.....	73
Figura 30. Correlação entre proporção da extensão de feixes vasculares por área das regiões internas do entrenó das canas e conversão da celulose na hidrólise enzimática direta.	73
Figura 31. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração da medula das diferentes amostras de cana.	85
Figura 32. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração da interface das diferentes amostras de cana.	86
Figura 33. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração do córtex das diferentes amostras de cana.	87
Figura 34. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração externa das diferentes amostras de cana.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes da parede celular de bagaço de cana. Estrutura básica e precursores.....	25
Tabela 2. Atividades hidrolíticas de preparações enzimáticas comerciais com atividades celulolíticas.	29
Tabela 3. Composição química de bagaços de cana-de-açúcar provenientes de híbridos, classificados em ordem crescente de teor de lignina.....	37
Tabela 4. Distribuição volumétrica e mássica de um entrenó de cada variedade de cana-de-açúcar.....	54
Tabela 5. Composição química das diferentes regiões de um entrenó das canas-de-açúcar. Valores baseados em massa inicial seca.	57
Tabela 6. Níveis de ácidos hidroxicinâmicos para as diferentes regiões de um entrenó das canas.	64
Tabela 7. Distribuição dos feixes vasculares e características micromorfológicas de cada região do entrenó das diferentes canas.	69

ABREVIATURAS

CR – Cana-de-açúcar de referência

H58 – Cana-de-açúcar híbrida 58

H89 – Cana-de-açúcar híbrida 89

H140 - Cana-de-açúcar híbrida 140

FPU – Unidades de papel de filtro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1. CANA-DE-AÇÚCAR: CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS	21
1.1.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	24
1.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA	26
1.2.1. RECALCITRÂNCIA DA PAREDE CELULAR E SUA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	29
1.3. CARACTERÍSTICAS DOS HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM TEORES VARIADOS DE LIGNINA.....	36
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	40
3.1.1. PREPARO DAS FRAÇÕES DE MEDULA, INTERFACE, CÓRTEX E FRAÇÃO EXTERNA	41
3.1.1.1. PROPORÇÃO EM MASSA E VOLUME DAS FRAÇÕES DE UM ENTRENÓ.....	43
3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	43
3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	44
3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS	45
3.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E DIÂMETRO DOS FEIXES VASCULARES A PARTIR DA ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	45
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE CADA PLANTA.	47
4.2. PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS E MÁSSICAS DAS FRAÇÕES DE UM ENTRENÓ DE CANA-DE-AÇÚCAR	53

4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	55
4.4. TEOR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	61
4.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS	67
5. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS.....	85

INTRODUÇÃO

Os combustíveis de origem fóssil apresentam custos elevados e variáveis devido a inúmeras crises políticas mundiais e ainda são os principais causadores das alterações climáticas que ocorrem no planeta atualmente. Em contrapartida, os biocombustíveis apareceram como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis e, por isso, tem obtido foco científico atualmente na área de novas matrizes energéticas.

O etanol é um biocombustível que começou a ser produzido e utilizado no Brasil na década de 1970. A produção de etanol é feita, até hoje, através da fermentação da sacarose presente no suco da cana-de-açúcar, uma das principais culturas dos países tropicais. Uma alternativa para a expansão da produção de etanol através da cana-de-açúcar seria a utilização de toda a planta, incluindo dessa forma o bagaço gerado nos processos de obtenção da sacarose, hoje utilizado para geração de vapor e energia elétrica nas usinas. O bagaço de cana é constituído basicamente de parede celular, composta em sua maior parte por celulose e hemicelulose (polissacarídeos) e também por lignina. A geração de etanol através do bagaço de cana se daria através da hidrólise dos polissacarídeos e posterior fermentação. No entanto, a recalcitrância desse material lignocelulósico é grande, o que impede bons rendimentos na obtenção de açúcares monoméricos. Esta recalcitrância é principalmente evidenciada diante da hidrólise enzimática, pois as enzimas são macromoléculas proteicas globulares que não conseguem difundir livremente nos poros existentes nas paredes celulares lignificadas.

Com o objetivo de contornar a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, pré-tratamentos se tornaram necessários para a obtenção significativa dos produtos de hidrólise. Os pré-tratamentos podem ser do tipo físico, mecânico, químico, biológico ou ainda combinações deles. Apesar de indispensável, a etapa de pré-tratamento é custosa e severa tanto para o bioprocessamento quanto para o meio-ambiente. Estes pré-tratamentos têm como principal função aumentar a posterior acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos numa conversão enzimática.

A acessibilidade enzimática é um ponto chave de estudo. Entre os principais fatores que limitam a infiltração das enzimas na parede celular está a baixa porosidade deste material que se deve a presença de hemicelulose e lignina que cimentam as microfibrilas de celulose. Também a presença de ácidos hidroxicinâmicos tem se mostrado como fator importante na limitação das enzimas hidrolíticas em materiais lignocelulósicos oriundos de gramíneas.

Sendo a alta quantidade de lignina um dos principais entraves para a produção de etanol celulósico, uma alternativa que poderia permitir o desenvolvimento de pré-tratamentos mais amenos, envolve a obtenção de plantas modificadas que apresentem teores reduzidos de lignina. Essas plantas, em hipótese, exigiriam pré-tratamentos menos severos ou até mesmo nenhum pré-tratamento mediante conversão enzimática direta, utilizando extratos enzimáticos ricos em celulasas e hemicelulasas. A obtenção destas plantas é possível através de hibridação mediante seleção fenotípica ou genotípica, ou ainda através da modificação do código genético das plantas utilizadas atualmente para fins comerciais. De fato, esta abordagem tem sido descrita na literatura recente, porém ainda são necessários estudos adicionais que abordem, em detalhes, as origens da recalcitrância da parede celular nas plantas de uma forma em geral e especialmente em plantas selecionadas por apresentarem baixos teores de lignina. Quando o foco de estudos, nesse contexto, envolve a cana-de-açúcar, os trabalhos disponíveis são bastante escassos. Dessa forma, fica claro que avançar no conhecimento sobre as origens da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos é importante para viabilizar a produção de etanol celulósico.

Este trabalho, portanto, procura desenvolver metodologias e desvendar uma série de características inerentes à recalcitrância de diferentes regiões de entrenós de cana-de-açúcar oriundos de híbridos pré-selecionados por apresentarem teores variados de lignina. Para isto, o presente estudo aborda o uso de uma série de técnicas de caracterização que incluem, além da avaliação da digestibilidade direta frente à ação de enzimas hidrolíticas, também a determinação do teor de componentes e análise micromorfológica.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. CANA-DE-AÇÚCAR: CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea perene, de metabolismo C4, pertencente ao gênero *Saccharum* L. e a família das Gramíneas (Poaceae). O gênero *Saccharum* junto com outros quatro gêneros, com características em comum, formam um grupo que mantém uma relação próxima de cruzamentos entre si, produzindo plantas com altos níveis de poliploidia e frequentemente níveis desbalanceados de cromossomos (aneuploidia). Dessa forma, é complicado determinar a taxonomia e filogenia da cana-de-açúcar; além disso, estes níveis incertos de ploidia se tornam um empecilho às técnicas de engenharia genética na produção de plantas modificadas (DANIELS; ROACH, 1987).

A planta de cana-de-açúcar é composta basicamente por raiz, folhas, flores e caule, o qual é o objeto de estudo e utilização por conter as células de estocagem de sacarose e a maior parte da biomassa. O caule é do tipo colmo, com nós e entrenós bem definidos, sendo recoberto externamente por uma única camada de células, denominada epiderme. Os nós usualmente são menores que os entrenós e formam a ligação entre o entrenó abaixo e o de cima. A anatomia celular do caule é complexa, o qual é composto principalmente por feixes vasculares e células parenquimáticas, uma característica típica de gramíneas (Figura 1). Os feixes vasculares são os componentes responsáveis pelo transporte e suporte mecânico das monocotiledôneas; em geral, são compostos pelos vasos do xilema e floema, circuncidados por suas fibras (Figura 2). Como pode se perceber nas Figuras 1 e 3, o parênquima é o tecido mais abundante no caule da cana-de-açúcar e suas células contêm grandes vacúolos que têm a função de estocar a sacarose. (MOORE, 1987). Devido ao papel de suporte mecânico, as fibras presentes nos feixes vasculares apresentam paredes grossas e lúmen diminuto, enquanto vasos e parênquima apresentam um maior lúmen.

Além disso, o tecido parenquimático contém células de menor comprimento e parede celular menos espessa (SANJUÁN et al., 2001).

Figura 1. Desenho esquemático demonstrando a anatomia típica de gramíneas. A região não ocupada por feixes vasculares corresponde ao tecido parenquimático (não mostrado). <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/labs/monocotstem.htm> (modificado).

Na região do entrenó de cana, os feixes vasculares são mais abundantes na periferia do que no centro, porém menores. No caso de células do parênquima, a variação ocorre principalmente em tamanho do lúmen, sendo menores na parte periférica. A parte mais externa é denominada córtex (*rind* em inglês), região onde os pequenos, mas numerosos feixes se aglomeram formando um anel de fibras resistente. A região mais interna, usualmente chamada de medula (*pith* em inglês), contém principalmente grandes células parenquimáticas de estocagem e poucos feixes vasculares embebidos. Assim, apesar dessa organização, em toda uma sessão transversal de um entrenó de cana encontram-se distribuídos pequenas quantidades de feixes vasculares e parênquima. Os nós também se diferenciam anatomicamente dos entrenós (Figura 3). A região nodal não

apresenta córtex e medula definidos, bem como não contém células de estocagem como o entrenó. Há ainda certas diferenças nos formatos dos feixes vasculares quando comparada as duas regiões. (MOORE, 1987).

Figura 2. Feixe vascular típico de cana-de-açúcar. Os tipos celulares estão indicados: P – parênquima; V – vasos do xilema; F – fibras; L – vasos do floema. (SIQUEIRA, et al. 2011).

Figura 3. Cortes transversais de cana-de-açúcar apresentando a anatomia de um A) entrenó e B) um nó (MOORE, 1987).

1.1.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Atualmente, o principal produto da cana-de-açúcar é o açúcar de mesa, sendo uma importante fonte para a indústria alimentícia. A obtenção da sacarose envolve a compressão dos caules para liberação do "suco" rico no dissacarídeo de interesse, antes estocado em células do parênquima. Ao final desse processo são gerados dois produtos: o caldo de cana e o bagaço de cana. No Brasil, a maior parte das empresas de açúcar e álcool concentra o caldo de cana para cristalizar a sacarose e com o melaço não cristalizado obtém o etanol, após diluição e fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. O bagaço, por sua vez, é utilizado, em grande parte, na geração de vapor e energia através da queima da biomassa. O uso do bagaço de cana para a produção de etanol, após a conversão de seus polissacarídeos em açúcares monoméricos, representa um enorme potencial para gerar mais etanol dentro de uma usina de açúcar e álcool. Com a possibilidade da utilização do bagaço de cana, é estimado um aumento de 40 a 50% na produção de bioetanol (WACLAWOVSKY et al., 2010).

O bagaço de cana é uma biomassa lignocelulósica, composta basicamente pela parede das células que antes constituíam o caule da planta integralmente. A parede celular de um vegetal é composta essencialmente por três macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina. A lignina é o único componente não polissacarídico, sendo formado pela polimerização de precursores fenilpropeno. A Tabela 1 apresenta os tipos, estrutura básica e os precursores da celulose, hemicelulose e lignina tipicamente encontrados em bagaço de cana. Na parede celular a celulose forma "agregados" microfibrilares com orientações definidas ao longo do eixo celular longitudinal, compondo uma série de subcamadas. A lignina e a hemicelulose envolvem as microfibrilas de celulose formando um compósito de baixa porosidade. Conforme ilustrado na Figura 4, a parede de uma célula lignificada é formada por várias subcamadas denominadas de: parede primária (P), parede secundária externa (S1), parede secundária principal (S2) e parede secundária interna (T, ou S3) (FENGEL; WEGENER 1989).

Tabela 1. Principais componentes da parede celular de bagaço de cana. Estrutura básica e precursores.

Componentes da parede	Monômeros após hidrólise ou Precursores
Celulose
Glicose.
Hemicelulose
Xilose, arabinose, ácido O-metil glucurônico e ácido acético.
Lignina
Alcóois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico

A composição química do bagaço pode variar dependendo da espécie e condições de manejo da cana-de-açúcar. Por exemplo, a composição química de uma amostra de bagaço de cana proveniente de usinas de açúcar de Louisiana-EUA contém 42% de celulose, 25% de hemiceluloses, 20% de lignina e 5% de cinzas (KIM; DAY, 2011). Pandey et al. (2000) relataram uma composição generalizada de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose, 25% de lignina e 2% de cinzas. Bagaço de cana oriundo de plantações feitas no Brasil apresenta teores de 43% de celulose, 27,8% de hemiceluloses e 23% de lignina total determinado por Silva (1995) e 44%, 27% e 24%, respectivamente, conforme descrito por Mendes et al. (2011). Um trabalho recente de Masarin et al (2011) mostrou que a composição do bagaço de cana pode variar significativamente dependendo da variedade de cana plantada. Em um conjunto de 13 amostras, os teores mínimos e máximos de extrativos, celulose, hemicelulose e lignina foram de 1,6-7,5%, 38,2-43,2%, 25,2-31,6% e 16,8-24,5%, respectivamente.

Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da parede de células de madeira (fibras) e modelo esquemático ilustrando a orientação das microfibrilas de celulose nas subcamadas da parede celular. (ML) lamela-média; (P) parede primária; (S1) parede secundária externa; (S2) parede secundária principal e (T) parede secundária interna ou parede terciária (FENGEL; WEGENER, 1989).

1.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA

A hidrólise dos polissacarídeos de um material lignocelulósico consiste na despolimerização da celulose e hemicelulose até seus monômeros através da

quebra da ligação glicosídica em presença de água. Este tipo de reação depende de catalisadores para que ocorra efetivamente; os mais eficientes são os ácidos e as enzimas. A abordagem ideal é que se utilize uma conversão enzimática (CHENG; TIMILSINA 2011), porém já foram realizados muitos estudos utilizando meio ácido para hidrólise de lignocelulósicos, com posterior fermentação dos açúcares a etanol, como, por exemplo, o trabalho descrito por Nguyen et al. (1999).

No caso de materiais lignocelulósicos, as enzimas mais importantes envolvidas em sua degradação são as celulasas, hidrolases que atuam sobre a celulose (Figura 5). As celulasas são constituídas pelas enzimas: endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), a qual hidrolisa a cadeia de celulose aleatoriamente, exo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.91), responsável por hidrolisar a celulose a partir de suas extremidades liberando celobiose como produto e 1,4- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21). Esta última enzima não atua diretamente sobre a celulose, mas sim sobre a celobiose e também oligômeros liberando como produto a glicose. Estas três enzimas, comumente denominadas endoglucanase, exoglucanase (celobiohidrolase) e β -glicosidase, agem em sinergismo sobre a celulose promovendo uma eficiente degradação da celulose (JEOH et al., 2006).

Há também enzimas que atuam sobre a hemicelulose, hidrolisando a cadeia principal e as ramificações. Como a variedade de tipos de ligação no substrato é maior, nas polioses uma gama mais extensa de enzimas é exigida. No caso de uma arabino-O-metilglucurono-xilana, principal constituinte da hemicelulose de cana-de-açúcar, as enzimas necessárias para hidrólise do material são: endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37), além de enzimas que atuam nas ramificações. As endoxilanases clivam a molécula formando xilooligossacarídeos e xilose e as β -xilosidases atuam sobre a xilobiose e xilooligossacarídeos liberando xilose a partir da extremidade não redutora. Enzimas acessórias são necessárias na hidrólise das ramificações da xilana, contribuindo para o sinergismo hemicelulolítico (SAHA, 2003). Podemos citar α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilana-esterase (EC 3.1.1.72) e feruloil-esterase/p-cumaril-esterase (EC 3.1.1.73).

Figura 5. Esquema de ação das celulases sobre a celulose (reproduzido de MARTINS, 2005).

Os extratos celulolíticos comerciais, comumente empregados nos processos de hidrólise enzimática, apresentam uma mistura complexa das enzimas descritas cujas atividades estão atualmente bem descritas na literatura. Um exemplo das atividades encontradas nas preparações comerciais denominadas Celluclast 1,5L e Novozym 188 está indicado na Tabela 2 (MENDES et al., 2011).

Tabela 2. Atividades hidrolíticas de preparações enzimáticas comerciais com atividades celulolíticas (reproduzido de Mendes et al., 2011).

Preparação comercial	Proteína (mg/mL)	FPA* (FPU/mg proteína)	Endoglucanase (IU/ mg proteína)	β -glicosidase (IU/mg proteína)	Xilanase (IU/mg proteína)	β -xilosidase (IU/mg proteína)
Celluclast 1,5L	177,2	0,52	29,5	0,27	6,2	0,3
Novozym 188	63,3	-	0,06	17,9	0,55	0,12

(*) FPA – Atividade em Papel de Filtro.

1.2.1. RECALCITRÂNCIA DA PAREDE CELULAR E SUA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Devido à elevada recalcitrância das paredes celulares de plantas lignificadas, somente um grupo restrito de organismos é capaz de degradar estes materiais na natureza. Esses organismos são capazes de produzir complexos enzimáticos celulolíticos, hemicelulolíticos e enzimas oxidativas que degradam a lignina, além de compostos de baixa massa molar que atuam desestruturando a parede celular, principalmente no início do processo degradativo. Esses organismos são essencialmente fungos genericamente denominados como fungos de decomposição branda, parda ou branca (KIRK; CULLEN, 1998; HAMMEL; CULLEN, 2008). Destes 3 grupos, os fungos de decomposição branca e branda são capazes de degradar lignina, enquanto que os fungos de decomposição parda degradam essencialmente polissacarídeos. Existe ainda um grupo de fungos que são classificados como bolores secundários em um processo de degradação completa de um lignocelulósico na natureza. Esses fungos são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas, porém são incapazes de colonizar o material lignificado, atuando, portanto, somente no final do processo degradativo em ambientes naturais (FERRAZ, 2004). Um dos gêneros destes fungos, *Trichoderma spp*, já foi muito bem estudado e, através dos complexos celulolíticos obtidos de seus cultivos, foi possível preparar enzimas purificadas e determinar o modelo degradativo da celulose descrito anteriormente (Figura 5) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Para que haja ação eficaz das hidrolases, estas precisam ter acesso direto ao substrato, ou seja, precisam de alguma forma ter contato com o polímero em questão, os quais estão cimentados entre si e a lignina na parede celular. No entanto, a parede celular lignificada tem baixa permeabilidade às enzimas, sendo esta uma das principais causas da baixa degradabilidade biológica dos materiais lignocelulósicos. Outra causa que limita a ação de microrganismos e enzimas na parede celular lignificada está relacionada à baixa degradabilidade da lignina que não é susceptível a ação enzimática por hidrolases (GRABBER et al., 2009).

Quanto menos recalcitrante for a biomassa, maior a eficiência da hidrólise enzimática, fato evidenciado em diversos estudos. Por exemplo, Siqueira et al. (2011) evidenciaram que a região da medula de cana-de-açúcar não pré-tratada foi prontamente hidrolisada na presença de celulasas comerciais. Este fato se deve a menor recalcitrância da região medular que é composta em sua maior parte por células do parênquima, as quais apresentam parede celular menos espessa e menos lignificada, fato confirmado pelos autores por meio da avaliação microscópica e microespectrofotométrica das paredes celulares.

Algumas características do substrato lignocelulósico são determinantes para limitar a hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose presentes nas paredes de células lignificadas. Como citado anteriormente, a porosidade limitada da parede celular impede a infiltração das enzimas (FLOURNOY et al., 1991; HAMMEL; CULLEN, 2008), restringindo a ação das mesmas somente às superfícies imediatamente expostas, como as encontradas no interior do lúmen ou na superfície externa de fibras obtidas a partir de algum processo mecânico aplicado para romper a ultra-estrutura do complexo celular (HIMMEL et al., 2007). A distribuição topoquímica da lignina e da hemicelulose nas células é extremamente relevante, pois são esses componentes que encapsulam as microfibrilas de celulose. Aqui vale mencionar que as celulasas tipicamente apresentam domínios de ligação ao substrato e que a oclusão da molécula por outros componentes impede a adsorção efetiva da enzima na superfície do substrato (RAMOS et al., 1992; YANG; WYMAN, 2004). Quando as enzimas aderem a um componente, como a lignina, que não seja seu substrato, estas participam de uma adsorção improdutiva diminuindo assim a eficiência da hidrólise enzimática.

Um agravante para a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos está relacionado à diversidade dos tipos de células existentes num determinado material, sendo que as espessuras da parede celular e as dimensões das células variam significativamente dependendo se são células de vasos, fibras ou de parênquima. Isso ganha importância adicional quando se incluem nos estudos, além da madeira, os materiais lignocelulósicos obtidos de gramíneas como a cana-de-açúcar, que apresentam uma quantidade expressiva de células de parênquima de estocagem de sacarose. Essas células, apesar de apresentarem parede celular pouco espessa, também são parcialmente lignificadas e contêm também ácidos hidróxicinâmicos (HE; TERASHIMA, 1990; 1991; SANJUAN et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2011).

Em função das características mencionadas anteriormente, é comum observar a abordagem experimental e tecnológica que envolve o pré-tratamento químico e/ou mecânico dos materiais lignocelulósicos visando criar áreas com microfissuras da parede celular para fomentar a penetração das enzimas (ALVIRA et al., 2010; BLANCHETTE, 1997). Esses pré-tratamentos visam, essencialmente, remover os componentes que impedem a penetração e/ou o acoplamento das celulasas à celulose, que são principalmente a hemicelulose e a lignina (RAMOS, 2003; HIMMEL et al., 2007). A remoção de lignina fomenta mais ainda o acesso às cadeias de celulose. Por exemplo, Ramos et al. (1992) demonstraram que ao remover 80% da lignina em madeira pré-tratada por explosão a vapor (hidrólise ácida), a digestibilidade do substrato frente a celulasas comerciais foi grandemente aumentada. Além disso, os autores demonstraram que devido ao menor teor de lignina, foi possível reduzir a carga de enzima necessária em até 6 vezes, uma vez que o material deslignificado evita a adsorção improdutiva das celulasas sobre as moléculas de lignina. Corroborando essa informação, Lee et al. (2009), avaliando a remoção seletiva de lignina na parede celular pela ação de líquidos iônicos, demonstraram uma clara correlação entre os níveis de remoção de lignina da parede celular com a digestibilidade do material residual por celulasas comerciais (Figura 6).

Os fatores mencionados anteriormente têm levado um grande número de grupos de pesquisa a buscar plantas com menor nível de lignificação da parede celular para facilitar processos de deslignificação química ou de hidrólise enzimática, dentro do conceito moderno das biorrefinarias de biomassa vegetal.

Uma abordagem muito interessante dentro desse tema é apresentada pelos grupos que usam os conceitos de biologia molecular para manipular a expressão gênica que controla enzimas chave do processo de biossíntese da lignina. Por exemplo, um estudo realizado com alfafa transgênica mostrou que ao suprimir genes chave da biossíntese de lignina foi possível reduzir o teor de lignina à metade do valor originalmente encontrado nas plantas selvagens. Isso favoreceu significativamente a hidrólise enzimática das fibras obtidas a partir das plantas transgênicas. A quantidade de açúcares liberados por hidrólise enzimática foi duplicada a partir da digestão direta do material transgênico sem nenhum pré-tratamento (CHEN; DIXON 2007).

Figura 6. Relação entre a extensão da remoção de lignina em *Acer* sp. com a digestibilidade enzimática da celulose (LEE et al., 2009).

O mesmo tipo de evidência foi observado a partir da avaliação de células de alfafa selvagem com diferentes estádios de maturação (GRABBER et al., 2002). Os autores observaram que a maturação das células diminui a digestibilidade enzimática em função do acúmulo de células de xilema. Isso ocorre porque as células adultas de xilema contêm 28% de lignina, contra somente 15% de lignina nas células imaturas. Quando essas duas amostras foram submetidas à hidrólise enzimática por 72h com uma mistura de celulasas e hemicelulasas, os polissacarídeos foram hidrolisados na extensão de 22 e 73%,

respectivamente, demonstrando de forma inequívoca que a lignificação da parede celular diminui drasticamente a digestibilidade enzimática das células de vegetais. O mesmo grupo mencionado anteriormente, Grabber et al. (2009), demonstrou que células de milho lignificadas artificialmente *in vitro* apresentam a digestibilidade frente a biota do rúmen significativamente diminuída em função da extensão da lignificação. Também recentemente, Grabber et al. (2008) demonstraram que ao incorporar precursores específicos durante a lignificação *in vitro* das células de colmo de milho é possível obter uma parede celular lignificada que pode ser facilmente deslignificada pela ação de soluções alcalinas em baixas temperaturas. Isso foi possível a partir do uso de precursores para a síntese de lignina que correspondiam aos dímeros do ácido ferúlico unidos por uma função éster (Figura 7). Essa alteração na estrutura da lignina proporcionou reações posteriores de deslignificação tão fáceis como a saponificação de triglicerídeos.

A recalcitrância varia de acordo com o tipo celular, bem como o tipo de tecido no vegetal. Em gramíneas, essa diferença é marcante entre as regiões do entrenó: medula e córtex, nas quais predominam tipos diferentes de tecidos, como parênquima e esclerênquima (fibras). Por exemplo, Zeng et al., (2011) demonstraram as diferentes recalcitrâncias das biomassas provenientes dessas duas regiões em caule de milho. Os resultados mostraram uma maior extensão de hidrólise da celulose contida na medula (24% após 24 h de hidrólise) quando comparada ao córtex (5 % no mesmo tempo de reação). Nos dois casos, a hidrólise foi conduzida com uma carga de celulasas correspondente a 5 FPU por grama de substrato. Também foi demonstrado que o aumento na carga enzimática para 60 FPU/g não impulsionou significativamente a conversão final de celulose, passando na medula de 24% para 28% e nenhum aumento efetivo no córtex.

Essa diferença de recalcitrância entre as regiões de córtex e medula de entrenós do caule de milho também foi demonstrada visualmente através da microscopia ótica por Jung e Casler (2006). Cortes de 100 µm de entrenó de milho foram colocados em contato com rúmen, o qual contém celulasas e outras enzimas hidrolíticas. A Figura 8 apresenta o resultado dessa hidrólise enzimática com rúmen. De acordo com a micrografia obtida, pôde-se confirmar uma maior recalcitrância das células do córtex e dos feixes vasculares quando comparados com o parênquima medular, já que logo após o contato com o rúmen, quase todo

parênquima da medula desapareceu, permanecendo apenas os feixes de fibras e vasos. Este resultado também nos diz acerca da distribuição topoquímica da lignina, que deve apresentar estruturas e/ou níveis de ácidos hidroxicinâmicos ligados variáveis, dependendo da região no entrenó; fato este corroborado pela quase total hidrólise do parênquima de medula, mas não do parênquima cortical.

Figura 7. A incorporação de um éster dimérico do ácido ferúlico como precursor da biossíntese *in vitro* de lignina gera um “novo” tipo de lignina com uma ligação facilmente saponificável (GRABBER et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, o teor de ácidos hidroxicinâmicos também contribui com a recalcitrância da biomassa de gramíneas à hidrólise enzimática. Os ácidos cumáricos e ferúlicos são estruturas fenólicas, similares aos precursores da lignina e que geralmente fazem ponte entre a lignina e a hemicelulose (Figura 9) (GRABBER et al., 2009). Estes compostos representam uma parte significativa dos componentes aromáticos de gramíneas, estando presentes até mesmo na lignina total determinada pelo procedimento Klason, devido a reações de condensação (GRABBER et al., 2000; LAM et al., 1994). Lam et al. (2003) em um estudo com gramíneas (150 linhagens de *Phalaris aquatica* e 100 linhagens de *Lolium perenne*) confirmou que a quantidade de ácido hidroxicinâmico também é importante para explicar a recalcitrância dos lignocelulósicos à digestão direta por celulasas. Barros-Rios et al. (2012) também

confirmaram uma estreita correlação entre a alta digestibilidade de medulas de milho, quando em contato com rúmen, e a baixa concentração de ácidos ferúlicos e diferúlicos. Assim, se torna importante o estudo e análise desses componentes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 8. Micrografia de cortes de entrenós de caule de milho mostrando a extensão da hidrólise com celulases provenientes de rúmen. Os dados para 24h e 96h de reação são apresentados (JUNG; CASLER 2006).

Figura 9. Fórmulas estruturais dos ácidos ferúlico e cumárico.
http://www.springerimages.com/Images/Chemistry/1-10.1007_s00253-008-1417-2-2 (modificado).

1.3. CARACTERÍSTICAS DOS HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM TEORES VARIADOS DE LIGNINA

Em um estudo recente foram avaliados diversas plantas híbridas de cana-de-açúcar com teores variados de lignina, a partir das quais o presente trabalho foi desenvolvido. A partir desse grupo de híbridos e canas-de-açúcar usadas como referência, Masarin et al. (2011) analisaram a composição química e eficiência da conversão de polissacarídeos mediante uma hidrólise enzimática direta.

A composição química encontrada para todo o grupo de amostras é apresentada na Tabela 3. Os teores de lignina total foram de 17 % - 24 %, enquanto os de glucanas foram de 38 % - 43 %. A baixa quantidade de lignina em alguns híbridos foi compensada por um aumento variável do teor dos outros componentes, inclusive os extrativos. Os autores também observaram em outra análise, que os ácidos hidroxicinâmicos representam boa parte dos aromáticos presentes nas amostras, com valores entre 5,0 % e 9,2 % para hidroxicinâmicos totais e predominância do ácido p-cumárico em relação ao ferúlico.

Na abordagem com hidrólise enzimática direta da biomassa, o estudo mostrou que a hidrólise da celulose ocorreu em maior extensão nos híbridos com menor teor de lignina (Figura 10). A maior eficiência em conversão de celulose foi de 31% em 72h, que, no entanto, ainda é um valor baixo para a eficiência da hidrólise. Assim, pré-tratamentos foram realizados e observou-se que taxas menores de deslignificação foram necessárias nas biomassas com baixo teor de lignina, atingindo-se, por exemplo, 80% em conversão de celulose na eficiência da hidrólise enzimática.

Tabela 3. Composição química de bagaços de cana-de-açúcar provenientes de híbridos, classificados em ordem crescente de teor de lignina. (Reproduzido de MASARIN et al. 2011).

Híbridos	Lignina total	Hemicelulose	Glucanas	Extrativos	Soma
89	16.8 ± 0.1	27.3 ± 0.3	40.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1	92.0
146	18.6 ± 0.1	31.6 ± 0.8	40.9 ± 0.3	2.4 ± 0.1	93.5
58	18.6 ± 0.1	26.3 ± 0.1	40.9 ± 0.3	2.6 ± 0.2	88.4
53	19.4 ± 0.5	27.1 ± 0.4	42.2 ± 0.5	2.7 ± 0.1	91.3
166	19.6 ± 0.5	31.5 ± 0.1	43.2 ± 0.4	1.9 ± 0.1	96.2
87	19.7 ± 0.1	27.3 ± 0.8	42.2 ± 0.3	3.9 ± 0.4	93.1
321	20.2 ± 0.4	31.0 ± 1.0	40.4 ± 0.5	1.6 ± 0.3	92.9
50	20.5 ± 0.1	30.0 ± 2.0	42.0 ± 1.0	2.5 ± 0.1	94.6
8	20.5 ± 0.4	26.6 ± 0.7	40.0 ± 1.0	3.2 ± 0.4	90.0
121	20.6 ± 0.1	28.2 ± 0.5	39.0 ± 1.0	4.9 ± 0.2	92.9
140	21.5 ± 0.2	27.0 ± 0.3	38.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	91.8
Bagaço de cana moído	24.0 ± 0.1	26.0 ± 1.0	42.0 ± 2.0	2.2 ± 0.4	93.8
Cultivar de referência	24.5 ± 0.5	25.2 ± 0.4	38.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1	90.5

Figura 10. Conversão da celulose através de hidrólise enzimática de 13 variedades de cana-de-açúcar não pré-tratadas (MASARIN et al., 2011).

2. OBJETIVOS

Estudar a origem da recalcitrância das paredes celulares em cana-de-açúcar a partir da avaliação da digestibilidade enzimática e das características químicas e micromorfológicas de diferentes regiões de um entrenó que incluem a epiderme, o córtex e a medula provenientes de híbridos que apresentam teores variados de lignina.

Para atingir o objetivo foram executadas as etapas descritas a seguir:

- A partir de entrenós de amostras de cana-de-açúcar, foram separadas e determinadas a proporção volumétrica e mássica das regiões correspondentes à fração externa, ao córtex, à interface córtex-medula e à medula;
- Foram avaliados, de forma quantitativa, os principais tipos celulares em cada região a partir de análise micromorfológica;
- Foi determinada a composição química de cada fração;
- As frações estudadas foram submetidas à digestão enzimática direta com celulasas e hemicelulasas comerciais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Um grupo de híbridos de cana-de-açúcar desenvolvido experimentalmente por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (projeto CNPq 552741/2007-8, coordenador Dr. Márcio Barbosa) junto à RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) foi avaliado no presente trabalho. As plantas em questão foram selecionadas por apresentarem teores diferenciados de lignina conforme mostrado na Tabela 3, levando-se em conta também outros fatores como resposta a hidrólise enzimática direta de todo o caule das plantas e produtividade das mesmas conforme apresentado por Masarin et al. 2011. Assim, do conjunto de 11 híbridos e um cultivar de referência, 4 amostras foram selecionadas para o presente estudo. As amostras selecionadas corresponderam ao cultivar de referência e ao híbrido 140, que apresentam elevado teor de lignina, além dos híbridos 58 e 89 que apresentam baixo teor de lignina. Os híbridos avaliados no presente trabalho foram plantados em 10 de março de 2010 por propagação vegetativa num campo experimental aberto, com espaçamento entre covas de 3 x 3 m. As plantas foram irrigadas em períodos de seca prolongada. O solo de cada cova foi suplementado com 100 g de calcário dolomítico e 100 g de adubo NPK 4:14:8 em 11/08/2010 (5 meses após o plantio) e novamente suplementado com 100 g de adubo NPK 4:14:8 em 01/10/2010 (7 meses após o plantio). A colheita dos caules foi feita em 10 de junho de 2011 (plantas com 16 meses de cultivo, correspondendo, portanto, a plantas maduras de cana-de-açúcar). Cada caule colhido foi devidamente numerado, os 2 primeiros entrenós desde a base e os 2 últimos desde o topo foram descartados, as pontas seladas com filme de PVC e então armazenados a -18 °C até o momento de uso.

Além das plantas híbridas, utilizou-se um cultivar de cana-de-açúcar considerado como referência para os estudos. Este cultivar corresponde a uma variedade usualmente plantada em fazendas de pequeno porte e muito utilizada para a alimentação animal e para a produção de garapa. A amostra usada no

presente trabalho correspondeu a caules maduros colhidos com aproximadamente 16 meses de cultivo e produzidos em uma fazenda localizada no município de Lorena, SP. O procedimento de amostragem e estocagem deste cultivar foi o mesmo descrito anteriormente para os híbridos.

3.1.1. PREPARO DAS FRAÇÕES DE MEDULA, INTERFACE, CÓRTEX E FRAÇÃO EXTERNA

Os caules das quatro amostras de cana-de-açúcar foram separados em função das regiões típicas existentes nos entrenós de gramíneas e corresponderam às frações de medula, interface medula-córtex, córtex e fração externa, conforme ilustrado nas Figuras 11 e 12. A fração externa corresponde à epiderme somada a uma parte da região mais periférica do córtex.

Os nós dos caules foram descartados e os entrenós cortados inicialmente em fragmentos com cerca de 2,5 - 3 cm no sentido longitudinal. Primeiramente, cada um destes fragmentos teve a fração externa (entre 1 e 2mm de espessura) retirada com o auxílio de um estilete. O fragmento restante, sem sua fração exterior, foi marcado com circunferências que acompanham a divisão do raio em três partes iguais (Figura 11). As três regiões delimitadas foram então separadas com auxílio de um estilete no sentido longitudinal, gerando pequenos cavacos com cerca de 0,8 x 0,8 x 2,5 cm. A Figura 12 ilustra estes cavacos obtidos a partir do cultivar de referência.

Para eliminação da sacarose, todos os cavacos foram submetidos à extração em Soxhlet com água destilada. A extração prosseguiu até que não houvesse açúcar significativo presente na água de extração (cerca de 5 ciclos de 8 h cada um). O teor de açúcares totais na água concentrada no balão de extração foi determinado através do método do fenol-ácido sulfúrico. O critério utilizado para definir o término da extração foi a ausência de cor no teste supra-citado. O teste em questão foi feito com a mistura de 1 mL de amostra, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 25 µL de fenol 80%. Os tubos foram agitados e resfriados a temperatura ambiente e a cor desenvolvida foi avaliada visualmente.

Figura 11. Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões da cana. Para definição das circunferências dividiu-se o raio em 3 partes iguais.

As amostras extraídas foram secas ao ar até aproximadamente 10% de umidade. Uma parte destas amostras foi moída em moinho com malha de 20 Mesh. Cada material moído teve sua umidade quantificada em balança OHAUS-IV e foi estocado em sacos plásticos à temperatura ambiente até o momento das análises.

Figura 12. Fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó da cana de referência. O mesmo foi feito para os híbridos. As quatro frações estão indicadas: A – Fração externa; B – Córtex; C – Interface medula-córtex; D – Medula.

3.1.1.1. PROPORÇÃO EM MASSA E VOLUME DAS FRAÇÕES DE UM ENTRENÓ

Um grupo de frações geradas de cada planta foi inicialmente seco ao ar e posteriormente seco em estufa a 100 °C até se observar massa constante. As massas foram registradas e a soma das massas correspondeu ao total representativo do entrenó, enquanto que as massas de cada fração correspondeu à proporção mássica de cada região avaliada. O cálculo da proporção mássica média foi obtido por meio de triplicatas.

A proporção volumétrica de cada fração foi calculada a partir da fórmula usada para o cálculo do volume de um cilindro ($\pi \times R^2 \times \text{altura}$). O volume ocupado pela medula corresponde ao volume do cilindro interno (Figura 11), enquanto que o volume das frações sequencialmente mais periféricas corresponde ao volume calculado a partir do centro do entrenó menos a soma do volume das frações anteriores.

3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Cerca de 3 g em (massa seca) das amostras de bagaço moída a 20 Mesh foram extraídos em extrator de Soxhlet com etanol 95% durante 6 h. O teor de extrativos foi determinado para o material extraído. As amostras sem extrativos foram secas ao ar, tiveram nova umidade quantificada e então foram hidrolisadas com ácido para caracterização química (FERRAZ et al., 2000). Em tubo de ensaio, aproximadamente 0,3 g de material extraído foi mantido a 30 °C durante 1 hora na presença de 3 mL de ácido sulfúrico 72% (p / p). Em seguida a mistura foi transferida quantitativamente a erlenmeyers de 250 mL com adição de 79 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C / 1 atm por 1 h. Depois de resfriado o material foi filtrado a vácuo em filtro sinterizado nº 3 SCHOTT. O material retido foi seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. Para determinação de lignina solúvel, o filtrado foi analisado em espectrofotômetro UV-

visível a 205 nm considerando a absorvidade molar da lignina solúvel igual a $105 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A fração solúvel foi ainda filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para isso foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45°C , ácido sulfúrico $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ como fase móvel e fluxo de $0,6 \text{ mL/min}$. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35°C .

3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

A fim de se romper ésteres de ácidos ferúlico e cumárico foram adicionados 5 ml de NaOH 1M em erlenmeyers de 125 ml contendo aproximadamente 50 mg de material (massa seca). Estes foram lacrados e mantidos sob agitação a 120 rpm, 30°C durante 24 horas. Em seguida os erlenmeyers foram retirados e a mistura acidificada com HCl:H₂O (1:1 v / v) a aproximadamente pH 2. A suspensão então foi avolumada em balão de 10 ml e mantida em repouso a 4°C por 12 horas e tratada para análise por HPLC como descrito mais abaixo.

A fim de se romper as ligações do tipo éter e ésteres, um segundo experimento a 170°C foi realizado (GRABBER et al., 2000). Utilizou-se aproximadamente 200 mg de bagaço (massa seca) e aproximadamente 2 mg de antraquinona em reatores de aço inoxidável. Ao reator foi adicionado 16 ml de NaOH 4M. Os reatores fechados foram colocados em banho de silicone a uma temperatura constante de 170°C durante 2 h. Após este tempo foram resfriados e a mistura acidificada a aproximadamente pH 2. A suspensão acidificada foi avolumada em balão de 100 mL e mantida em repouso a 4°C por 12 horas.

Ao final do tempo de repouso, cerca de 2 mL do conteúdo de cada balão volumétrico foi coletada e filtrada em membrana de $0,45\mu\text{m}$. Para quantificação de ácidos cumárico e ferúlico, as amostras filtradas foram analisadas em um cromatógrafo AKTA 10 (GE), utilizando uma coluna ODS Hypersyl da Thermo Scientific. Utilizou-se um fluxo de $0,8 \text{ mL/min}$ de uma fase móvel contendo acetonitrila:água (1:4 v / v) com 1% de ácido acético e um detector UV ajustado em 315 nm.

3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS

Para a hidrólise enzimática das diversas biomassas de cana, foram utilizadas enzimas comerciais: Cellubrix e Novozym 188 (ambas produzidas e comercializadas sob supervisão da empresa Novozymes, Dinamarca). Papel de filtro foi utilizado para determinar a atividade enzimática de celulase em unidades FPU de acordo com Mandels et al. (1976). As atividades de β -glicosidase foram determinadas utilizando p-nitrofenil- β -D-glicopiranisídeo como substrato, de acordo com Wood & Bhat (1988).

As amostras moídas de cada fração foram hidrolisadas com 10 FPU de celulasas/g de substrato e 20 U de β -glicosidase/g de substrato. As reações foram realizadas em tubos Falcon com consistências de 2% de substrato. Estabeleceu-se um volume final de reação de 10 mL com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 contendo 0,01 % de azida sódica. Os experimentos foram realizados sob agitação de 120 rpm e a 45 °C por 72 h. Durante o processo de sacarificação, as reações foram amostradas em intervalos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. As amostras coletadas foram colocadas em banho em ebulição por 5 min e centrifugadas, sendo que o sobrenadante foi analisado por HPLC da mesma forma como descrito no item 3.2 para detecção de açúcares monoméricos.

3.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E DIÂMETRO DOS FEIXES VASCULARES A PARTIR DA ANÁLISE MICROSCÓPICA

A partir das diferentes amostras obtidas, referentes a cada região de um entrenó de cada cana estudada, foram preparados cortes transversais de aproximadamente 1 mm de espessura, exceto para a fração externa dos entrenós. Para uma primeira análise, os cortes foram corados com 1% de toluidina azul e analisados no microscópio ótico (Coleman). Realizou-se uma contagem do número de feixes vasculares que poderiam ser distinguidos no campo de visão completo do microscópio com um aumento de 40x (área aproximada de 16 mm²). Feixes vasculares e parênquima foram distinguidos com

base nos diferentes diâmetros celulares e espessuras de parede (SANJUÁN et al., 2001), conforme ilustrado na Figura 2. Em uma segunda análise, os cortes foram utilizados a fresco e sem coloração. A partir de outro microscópio ótico (Zeiss Axio Imager) e com um aumento de 50x, micrografias dos feixes vasculares provenientes de cada tipo de região e amostra foram obtidas. A partir da escala fornecida pelo software de obtenção das imagens, o diâmetro de cada feixe foi determinado. Para os dois tipos de análises foram utilizadas triplicatas para o cálculo de um valor médio.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir de replicatas foram submetidos à análise de variância e teste de hipótese. As médias foram avaliadas segundo o teste de Tukey a um nível de 95% de confiança.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entrenós de três amostras de cana-de-açúcar com teores variados de lignina, híbridos 58, 89 e 140 (H58, H89 e H140), e de mais uma planta referência (CR) foram dissecados a fim de representar as 4 principais regiões do entrenó para cada planta, da parte externa até a medula. As diferentes frações obtidas corresponderam à medula, ao córtex, à interface medula-córtex e à parte externa (epiderme mais parte do córtex periférico). Os híbridos, bem como a cana de referência, foram avaliados a partir de suas frações quanto a distribuição mássica e volumétrica, composição química, susceptibilidade à hidrólise enzimática direta por celulasas comerciais e análises microscópicas.

4.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE CADA PLANTA.

As diferentes frações do entrenó dos híbridos 58, 89 e 140 e de mais uma cana de referência foram submetidas à hidrólise enzimática direta a fim de gerar dados quantitativos de conversão de celulose e hemicelulose (Figuras 13 a 16).

Após 72h de hidrólise das amostras CR, H58 e H89, a celulose presente na medula foi facilmente convertida à glicose, atingindo 86%, 78% e 85% de conversão respectivamente (Figuras 13 a 16, ou melhor visualizado na Figura 31 do anexo). As xilanas também foram hidrolisadas até certo nível, atingindo 50% de conversão da biomassa da medula na cana de referência, e 36%, 31% e 30% para as amostras H89, H58 e H140. A hidrólise da xilana pode ser atribuída a certa atividade hemicelulolítica presente nas preparações comerciais de celulasas (VARNÁI et al., 2010; MENDES et al., 2011).

Figura 13. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana de referência.

Figura 14. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 58.

Figura 15. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 89.

Figura 16. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) em diferentes frações do entrenó da cana híbrida 140.

A interface medula-córtex e o córtex foram as frações onde se pôde observar melhor a diferença de recalcitrância entre as amostras (Figuras 13 a 16 ou melhor visualizado nas Figuras 32 e 33 do anexo). O híbrido 89 foi o que se destacou por ser o que mais facilmente teve sua celulose e hemicelulose hidrolisadas, atingindo aproximadamente o dobro da conversão de celulose e xilana em relação às outras amostras analisadas - 73% e 38% para celulose e 37% e 35% para hemicelulose, nas frações da interface e córtex respectivamente. Por outro lado, o híbrido 140 se destacou por apresentar baixa digestibilidade na fração da medula, a fração usualmente menos recalcitrante (JUNG; CASLER 2006; SIQUEIRA et al., 2011), a qual proporcionou apenas 50% de conversão de celulose, deixando o H140 como uma amostra isolada e abaixo das outras amostras avaliadas quanto a hidrólise enzimática da medula. Dentre os híbridos, a planta 140 é aquela com o teor mais alto de lignina total (21%) e tal fato poderia explicar a sua elevada recalcitrância, mas essa não deve ser a razão principal, levando-se em conta que o teor de lignina total do híbrido 140 é ainda menor do que o da cana de referência (24%), que por sua vez obteve 86% de conversão na medula. Este resultado intrigante demonstra e comprova que outros aspectos além da lignina devem ser considerados ao se estudar a recalcitrância de biomassas lignocelulósicas. No caso da amostra H140, fatores morfológicos, como tamanho dos feixes vasculares e espessura das paredes celulares, avaliados nesse estudo, podem ser cruciais ao se tentar explicar a baixa digestibilidade da medula.

Dentre as quatro regiões do entrenó analisadas, a fração mais periférica foi a parte mais recalcitrante da cana-de-açúcar diante de uma digestibilidade enzimática sem pré-tratamentos. Em todas as amostras avaliadas, a conversão de celulose e hemicelulose não passaram de 10% e 12%, respectivamente. Apesar dos baixos valores de conversão nessa fração mais externa, o híbrido 89 se destacou, atingindo aproximadamente o dobro de conversão de celulose e hemicelulose quando comparado às outras amostras, deixando evidente o seu potencial como biomassa lignocelulósica em processos que demandam hidrólise dos polissacarídeos.

As diferentes respostas de cada região de um entrenó de cana-de-açúcar à hidrólise enzimática se devem a diversos fatores. Grande parte desses fatores foi explorada neste estudo. A inerente correlação entre os resultados obtidos para

conversão enzimática dos polissacarídeos e outras características avaliadas para cada tipo de biomassa pode ser discutida procurando-se estabelecer um paralelo entre cada característica analisada e a recalcitrância da amostra.

4.2. PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS E MÁSSICAS DAS FRAÇÕES DE UM ENTRENÓ DE CANA-DE-AÇÚCAR

Em todos os híbridos e na cana de referência, a região do córtex correspondeu à fração mais importante, tanto em termos mássicos como volumétricos, representando cerca de 50% de um entrenó em ambos os aspectos (Tabela 4). O córtex da amostra H58 foi o que apresentou a maior proporção mássica, atingindo um valor de 62%.

A partir dos dados de proporção em massa seca e volumétrica de cada fração, foi possível calcular as respectivas densidades relativas. Entre todas as frações, as regiões mais periféricas, o córtex e a fração externa, corresponderam ao material mais denso (Figura 17). Exceto na amostra H58, a fração externa mostrou ser a mais densa de todas as frações, principalmente nas plantas com maior teor de lignina total, CR e H140. Tal fração representa somente 12% do volume total, mas correspondeu a uma boa parte da massa seca total dos entrenós avaliados, correspondendo assim a um material de alta densidade. A região central do entrenó, incluindo a interface e a medula, representou cerca de 15% da massa seca na cana de referência e 25% nos híbridos, enquanto que em questões de volume as duas regiões juntas somaram 39% do volume total de um entrenó. De acordo com os valores observados, pode-se dizer que o material oriundo dessas duas regiões mais centrais se caracteriza como uma biomassa de baixa densidade.

Diante dos valores encontrados, pode-se estabelecer uma correlação da densidade relativa com a digestibilidade enzimática da celulose em 72h, para as respectivas frações e amostras. Um gráfico de correlação é apresentado na Figura 18. Em geral, podemos observar que à medida que a densidade do material aumenta diminuem as eficiências de conversão de celulose. Dessa forma podemos dizer, para as amostras analisadas, que quanto maior a densidade de

uma região do entrenó, maior sua recalcitrância à hidrólise enzimática direta. Essa correlação densidade-digestibilidade é mais pronunciada para as canas mais lignificadas - CR e H140.

Tabela 4. Distribuição volumétrica e mássica de um entrenó de cada variedade de cana-de-açúcar

Região da cana	Proporção volumétrica (%)	Proporção em massa seca (%)			
		CR*	H58*	H89*	H140*
Medula	10	4,5 ± 0,6 ^a	6,2 ± 0,6 ^a	6,5 ± 0,5 ^a	7,1 ± 0,4 ^a
Interface	29	10,6 ± 0,8 ^b	18,6 ± 1,8 ^b	19,9 ± 1,9 ^b	17,8 ± 0,6 ^b
Córtex	49	47,6 ± 0,1 ^c	62,6 ± 2,6 ^c	57,6 ± 0,7 ^c	50,1 ± 3,8 ^c
F. externa	12	37,3 ± 0,2 ^d	12,6 ± 1,1 ^d	16,0 ± 1,3 ^d	25,0 ± 4,0 ^b

(*) Médias seguidas de letras iguais em cada amostra numa mesma coluna não diferem entre si a 95% de confiança, segundo o teste de Tukey.

Figura 17. Densidade relativa das frações medula, interface, córtex e externa de cada tipo de cana amostrada.

Figura 18. Correlação entre densidades relativas das frações dos entrenós e digestibilidade da celulose. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losangos) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química das quatro amostras estudadas mostrou uma diferença significativa entre as regiões do entrenó e entre as amostras em si. Quando comparadas, a fração da medula se mostrou como a mais distinta das regiões analisadas (Tabela 5). Em todas as amostras, a região medular mostrou a predominância de glucanas em relação a outros componentes de parede celular (CR – 49%; H58 – 53%; H89 – 55%; H140 – 41%). Outro destaque para a medula é o menor teor de lignina total entre todas as frações, com valores na faixa de 12%-18%. Esses valores estão de acordo com Siqueira et al. (2011) que também encontrou um maior teor de glucanas (53%) e baixo teor de lignina total (12%) para a região da medula. Sanjuán et al. (2001), também encontrou quantidade similar de lignina Klason (16%) em frações da medula. Tais resultados são muito

relevantes quando levamos em conta que a medula é a fração do entrenó que mais facilmente tem seus polissacarídeos convertidos a monômeros em uma hidrólise enzimática direta. Logo, a baixa concentração de lignina na região medular parece ser a principal razão da baixa recalcitrância dessa fração. A medula também se diferenciou das demais frações devido ao menor teor de hemiceluloses (xilana mais arabinosil e acetil), com valores na faixa de 17%-20%, exceto para a medula da amostra H140, a qual mostrou um valor maior e mais similar ao das outras frações (27%). O baixo teor de xilanas também é um fator que pode explicar a menor recalcitrância das medulas diante da digestibilidade enzimática, já que na conformação da parede celular, as polioses, junto com os componentes aromáticos, encapsulam as fibrilas de celulose, se tornando assim um dos empecilhos à acessibilidade das celulasas (YANG; WYMAN 2004; HIMMEL et al., 2007). Diante dessas observações buscamos estabelecer correlações entre teor de lignina total e hemiceluloses com a eficiência da hidrólise enzimática da celulose em 72h; os gráficos de correlação são apresentados nas Figuras 19 e 20. Em geral, podemos observar que quanto menor a concentração de lignina menor a recalcitrância da biomassa à digestão enzimática direta. Em relação às hemiceluloses totais, a correlação não é tão evidente quanto para lignina, havendo maior variação entre as amostras e suas frações, principalmente a amostra H140 e a fração externa.

Tabela 5. Composição química das diferentes regiões de um entrenó das canas-de-açúcar. Valores baseados em massa inicial seca.

Amostras	Região do entrenó	Composição química (% m / m)							
		Extrativos*	Glucanas*	Xilanas*	Arabinosil*	Acetil*	Lignina total*	Lignina insolúvel*	Lignina solúvel*
Cana de referência	Medula	2,9 ± 0,2 ^a	49,3 ± 0,1 ^a	15,4 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,01 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	17,2 ± 0,2 ^a	14,8 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,1 ^a
	Interface	3,0 ± 0,1 ^a	43,8 ± 0,1 ^b	18,8 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^b	22,1 ± 0,3 ^b	20,4 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,3 ^a
	Córtex	1,3 ± 0,1 ^b	42,0 ± 0,5 ^c	20,4 ± 0,2 ^c	1,1 ± 0,1 ^c	3,0 ± 0,2 ^{b,c}	21,9 ± 0,3 ^b	19,8 ± 0,1 ^c	2,0 ± 0,3 ^a
	F. externa	3,1 ± 0,1 ^a	42,4 ± 0,5 ^{b,c}	19,6 ± 0,2 ^d	1,2 ± 0,1 ^c	2,6 ± 0,2 ^{a,c}	22,3 ± 0,2 ^b	20,4 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,2 ^a
Híbrido 58	Medula	2,30	53,2 ± 1,9 ^a	16,2 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	12,6 ± 0,3 ^a	10,3 ± 0,2 ^a	2,6 ± 0,2 ^a
	Interface	3,70	46,9 ± 0,7 ^b	19,9 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,05 ^{a,b}	3,9 ± 0,1 ^b	15,5 ± 0,3 ^b	13,4 ± 0,3 ^b	2,8 ± 0,1 ^a
	Córtex	3,30	43,1 ± 1,2 ^c	21,9 ± 0,8 ^c	1,3 ± 0,1 ^b	3,6 ± 0,1 ^{b,c}	19,0 ± 0,7 ^c	16,1 ± 0,1 ^c	3,1 ± 0,1 ^b
	F. externa	3,30	43,0 ± 0,7 ^c	21,3 ± 0,5 ^c	1,1 ± 0,04 ^c	3,4 ± 0,1 ^c	20,2 ± 0,4 ^d	18,3 ± 0,3 ^d	2,5 ± 0,1 ^a
Híbrido 89	Medula	3,05	54,7 ± 0,2 ^a	13,9 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,00 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	13,5 ± 0,02 ^a	12,0 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^{a,b}
	Interface	3,21	49,9 ± 0,3 ^b	16,9 ± 0,2 ^b	1,3 ± 0,02 ^b	2,4 ± 0,3 ^a	14,5 ± 0,2 ^b	12,8 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,2 ^b
	Córtex	2,90	48,7 ± 0,3 ^c	19,5 ± 0,2 ^c	0,7 ± 0,04 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	18,7 ± 0,1 ^c	17,4 ± 0,1 ^c	1,9 ± 0,2 ^{a,b}
	F. externa	2,13	46,9 ± 0,4 ^d	20,7 ± 0,4 ^d	0,7 ± 0,01 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	20,4 ± 0,3 ^d	19,6 ± 0,3 ^d	1,7 ± 0,03 ^a
Híbrido 140	Medula	2,8 ± 0,1 ^a	41,1 ± 0,6 ^a	20,8 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,02 ^a	3,5 ± 0,1 ^{a,b}	18,5 ± 0,05 ^a	15,6 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a
	Interface	2,7 ± 0,1 ^a	38,2 ± 0,3 ^b	21,7 ± 0,2 ^b	2,1 ± 0,04 ^b	3,9 ± 0,3 ^b	19,8 ± 0,1 ^b	17,4 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,1 ^b
	Córtex	3,2 ± 0,2 ^a	39,5 ± 0,3 ^c	22,0 ± 0,04 ^b	1,4 ± 0,02 ^c	3,7 ± 0,04 ^{a,b}	20,6 ± 0,3 ^c	18,7 ± 0,2 ^c	1,9 ± 0,04 ^c
	F. externa	3,0 ± 0,3 ^a	36,1 ± 0,3 ^d	20,2 ± 0,3 ^c	1,9 ± 0,1 ^c	3,4 ± 0,1 ^a	25,2 ± 0,4 ^d	23,7 ± 0,2 ^d	1,4 ± 0,1 ^d

(*) Médias de cada dado em um mesmo híbrido seguidas de letras iguais não diferem entre si a 95% de confiança.

Figura 19. Correlação entre teor de lignina total e digestibilidade da celulose. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losangos) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

Figura 20. Correlação entre hemiceluloses totais (xilanas, arabinosil e acetil) e digestibilidade da celulose. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losangos) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

Dentre as outras regiões do entrenó, interface, córtex e fração externa, nenhuma se diferenciou tão significativamente quanto a medula. A cana de referência apresentou teores similares de lignina entre a interface, córtex e a fração externa, apesar de haver diferença entre as eficiências de conversão de polissacarídeos das mesmas na digestão enzimática. Isso remete mais uma vez que a lignina sozinha não pode explicar a recalcitrância de diferentes biomassas lignocelulósicas (HIMMEL et al., 2007). Entre os híbridos de cana-de-açúcar houve uma diferença no padrão de distribuição da lignina. Nas amostras H58 e H89, híbridos com baixo teor de lignina total, o córtex e a região externa foram as regiões com maior concentração desse componente (cerca de 19%), se diferenciando de forma significativa da interface (15%). Já na amostra H140, a fração externa foi a que despontou com alto teor de lignina total (25%), enquanto a interface e córtex obtiveram valores similares (20%).

Através dos dados de composição química é possível fazer diversos tipos de análises matemáticas e correlações com a eficiência de hidrólise enzimática direta das amostras. Essas análises são muito úteis e importantes quando o objetivo é buscar as causas da baixa ou alta recalcitrância das diferentes regiões e amostras de cana estudadas. Um exemplo é o cálculo estimado da quantidade relativa de grupos pendentes presentes na xilose, principal poliose das hemiceluloses de gramíneas. Através da razão entre o somatório de acetil mais arabinosil e o teor de xilanas foi possível estabelecer esse tipo de análise (Figura 21). Através dos dados obtidos podemos inferir que as regiões da medula e interface de todas as amostras são as que apresentam hemicelulose com maior número de grupos pendentes, os quais podem servir de ponte para ácidos hidroxicinâmicos e eventualmente lignina, como os grupos arabinosil (FENGEL; WEGENER, 1989). A presença desses grupos pendentes também pode dificultar a hidrólise da xilana por xilanases (ZHANG et al., 2011). A amostra H140 foi a que apresentou maior valor para a razão entre o somatório de acetil e arabinosil e o teor de xilanas, inclusive na região da medula. Esse pode ser um dos motivos da baixa digestibilidade da celulose nessa região para a cana 140, pois a baixa hidrólise da xilana (no máximo 30% após 72h) também pode ter limitado o acesso à celulose.

Outros tipos de análises de correlação foram realizados neste estudo, e são uma ferramenta muito adequada a esse tipo de trabalho que busca relacionar

a recalcitrância da biomassa de cana-de-açúcar com características químicas e micromorfológicas.

Figura 21. Proporção de grupos pendentes na hemicelulose de cada fração das canas amostradas.

Dentre os híbridos, as amostras H58 e H89 se destacaram na hidrólise enzimática, principalmente por apresentarem altas taxas de conversão na interface medula-córtex. Já o híbrido 140, citado anteriormente, chamou muita atenção com sua baixa conversão da celulose na medula (50%) comparada aos demais níveis de hidrólise da medula que atingiram mais do que 80 % nas demais amostras, inclusive na cana de referência (85%). Este resultado era inesperado já que a amostra de referência e o híbrido 140 são similares em seu teor de lignina total. O teor de lignina na medula do H140 foi levemente superior ao observado na medula da cana de referência (16,5% e 14,8%, respectivamente), o que não levaria a supor uma diferença tão grande na eficiência da hidrólise enzimática da celulose. Uma das formas que buscamos para explicar estes resultados foi definir uma variável que chamamos de “disponibilidade de celulose”, calculada através da razão entre teor de celulose e somatório dos outros componentes da parede

celular (lignina total, xilanas, arabinosil e acetil). Essa proposta foi embasada nos conhecimentos de que na parede celular vegetal as fibrilas de celulose estão encapsuladas por outros polissacarídeos e seus grupos pendentes e componentes aromáticos (HON; SHIRAISHI, 2000). Desta forma, os valores calculados para “disponibilidade de celulose”, foram correlacionados com os níveis de conversão enzimática da celulose obtidos após 72h de reação (Figura 22). O que se observa é uma relação bem particular, mas que, em geral, segue o seguinte padrão: quanto menor a disponibilidade de celulose, maior a recalcitrância das amostras do bagaço de cana. No gráfico, os dados correlacionados podem ser separados em 3 grupos isolados de pontos correspondentes às quatro regiões do entrenó. O grupo 1 representa as frações que apresentaram conversões de celulose acima de 70%. No grupo 2, as conversões de celulose estiveram entre 30 e 70% e, no grupo 3, as conversões foram inferiores a 30%, representando as regiões mais recalcitrantes. No grupo 1, a princípio, era de se esperar as medulas de todas as amostras, porém, o que se vê é a falta da medula do híbrido 140 e a presença da interface do H89. A medula da amostra H140, de fato, se encontra no grupo 2, juntamente com os pontos das demais interfaces e o córtex da amostra H89. Este tipo de correlação mostra que a “disponibilidade de celulose” pode ser um bom parâmetro para se estimar a recalcitrância de um determinado material, sendo que quanto maior o valor da “disponibilidade de celulose”, menor foi a recalcitrância observada.

4.4. TEOR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

A Tabela 6 apresenta os dados acerca dos ácidos hidroxicinâmicos detectados nas diferentes frações dos quatro tipos de entrenós avaliados. Parte destes ácidos presentes em cana-de-açúcar pode ser removida por um tratamento alcalino mais brando. Estes ácidos hidroxicinâmicos são aqueles ligados a metilglucurono-arabino-xilanas por ligações do tipo éster, mas que não estão ligados à lignina por ligações éter. Outros ácidos hidroxicinâmicos que não estes, estão ligados via éter à lignina (LAM et al., 1994). Os resultados mostrados na Tabela 6 indicam que há uma predominância de ácido cumárico em relação ao

ferúlico em todas as amostras analisadas. Estes dados estão de acordo com Xu et al. (2005) para bagaço de cana, porém difere daqueles encontrados por Lam et al. (2003) para outras gramíneas (150 linhagens de *Phalaris aquatica* e 100 linhagens de *Lolium perenne*), onde o ácido predominante é o ferúlico.

Figura 22. Correlação entre a “disponibilidade de celulose” e digestão da celulose. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losangos) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

De acordo com os resultados obtidos, os níveis de ácido ferúlico foram semelhantes para todas as regiões do entrenó em cada tipo de cana analisada, tanto na forma de éster livre e éster mais éter. Para o ácido cumárico, os valores apresentaram maior variação, sendo que a medula e a fração externa foram as frações mais distintas dentro do grupo analisado. Em questão da forma de ligação, em todos os casos, os dados mostram que ambos ácidos, cumárico e ferúlico, estão predominantemente ligados tanto à lignina como a hemicelulose via ligações éster mais éter e não apenas éster. Ácidos hidroxicinâmicos totais ligados via éster à hemicelulose foram aproximadamente de 2,0 % para todas as

frações das amostras CR e H140, já para os híbridos 58 e 89 os valores ficaram em torno de 1%. Para ácidos hidroxicinâmicos totais (ligados por éster mais éter) as amostras controle e H140 também se sobressaíram com valores na faixa de 6-10 % para as suas frações; as amostras H58 e H89, por sua vez, apresentaram valores na faixa de 3-8%. Esses valores indicam uma maior quantidade de ácidos ferúlico e cumárico ligados na forma de éter à molécula de lignina, em relação àqueles só esterificados com hemiceluloses e, além disso, mostram uma maior concentração destes ácidos na cana de referência e híbrido 140 em relação às demais canas.

Tabela 6. Níveis de ácidos hidroxicinâmicos para as diferentes regiões de um entrenó das canas. O primeiro experimento cliva apenas ligações éster e o segundo éster e éter. Valores baseados em massa inicial seca.

Amostras	Região do entrenó	Experimento a 30 °C (% m / m) [Ésteres]		Experimento a 170 °C (%m / m)		Exp. 170 °C - 30 °C [contém éteres]	
		Ferúlico*	Cumárico*	Ferúlico*	Cumárico*	Ferúlico	Cumárico
Canas de referência	Medula	0,5 ± 0,05 ^a	1,4 ± 0,18 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,7 ^a	0,9 ± 0,13	3,7 ± 0,7
	Interface	0,5 ± 0,08 ^a	1,9 ± 0,45 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	7,8 ± 0,7 ^b	1,1 ± 0,14	5,9 ± 0,8
	Córtex	0,5 ± 0,06 ^a	2,0 ± 0,19 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,3 ^{a,b}	0,9 ± 0,10	4,4 ± 0,4
	F. externa	0,3 ± 0,08 ^a	1,3 ± 0,44 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	7,8 ± 0,8 ^b	1,2 ± 0,14	6,6 ± 0,9
Híbrido 58	Medula	0,3 ± 0,05 ^a	0,8 ± 0,09 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,09	2,4 ± 0,2
	Interface	0,3 ± 0,05 ^a	1,0 ± 0,22 ^{a,b}	0,9 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,4 ^a	0,5 ± 0,17	2,6 ± 0,5
	Córtex	0,4 ± 0,03 ^a	1,3 ± 0,22 ^b	1,3 ± 0,4 ^a	6,6 ± 1,9 ^b	0,9 ± 0,39	5,3 ± 2,0
	F. externa	0,3 ± 0,03 ^a	1,1 ± 0,18 ^{a,b}	1,1 ± 0,05 ^a	4,2 ± 0,3 ^{a,b}	0,8 ± 0,05	3,1 ± 0,4
Híbrido 89	Medula	0,2 ± 0,01 ^{a,b}	0,8 ± 0,04 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,12	1,4 ± 0,5
	Interface	0,3 ± 0,06 ^b	1,0 ± 0,26 ^a	1,2 ± 0,1 ^b	4,3 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,08	3,3 ± 0,3
	Córtex	0,2 ± 0,02 ^{a,b}	1,7 ± 0,20 ^b	1,1 ± 0,2 ^{a,b}	5,5 ± 1,3 ^b	0,8 ± 0,19	3,8 ± 1,3
	F. externa	0,2 ± 0,02 ^a	1,2 ± 0,12 ^a	1,1 ± 0,1 ^{a,b}	4,4 ± 0,7 ^b	0,9 ± 0,13	3,2 ± 0,7
Híbrido 140	Medula	0,4 ± 0,03 ^a	1,8 ± 0,11 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,5 ^a	1,1 ± 0,13	5,4 ± 0,5
	Interface	0,4 ± 0,01 ^a	2,2 ± 0,06 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	8,2 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,07	6,0 ± 0,3
	Córtex	0,4 ± 0,05 ^a	1,9 ± 0,27 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,8 ^a	1,2 ± 0,15	5,4 ± 0,8
	F. externa	0,3 ± 0,02 ^b	1,2 ± 0,12 ^b	1,4 ± 0,02 ^a	5,0 ± 0,1 ^b	1,1 ± 0,02	3,8 ± 0,2

(*) Médias de cada dado em um mesmo híbrido seguidas de letras iguais não diferem entre si a 95% de confiança.

Os teores de ácidos hidroxicinâmicos são relevantes, pois estes podem ajudar a entender a recalcitrância de certos tipos de materiais, principalmente lignocelulósicos provindos de gramíneas (LAM et al., 2003; CASLER; JUNG 2006). Por exemplo, a diferença de recalcitrância de células do parênquima de diferentes regiões pode estar relacionada às variações nos teores de ácidos hidroxicinâmicos em sua parede celular. Vejamos o caso da medula do híbrido 140, a qual apresentou a maior proporção relativa de ácidos hidroxicinâmicos ligados por um éter (6,5 %) e também o valor mais alto para hidroxicinâmicos totais (8,8 %), quando comparada com as demais medulas. Tal fração medular foi a mesma que apresentou uma conversão de celulose pouco significativa na hidrólise enzimática direta – apenas 50%. Isso nos remete que os altos níveis de ferúlico e cumárico, principalmente contendo ligações éter, podem ter sido contribuintes importantes e pontos-chave na distinta recalcitrância dessa biomassa, que é constituída em sua maior parte por parede celular de parênquimas.

Correlações entre os níveis de hidroxicinâmicos totais e lignina total e também com conversão da celulose em 72h são apresentadas nas Figuras 23 e 24. Podemos observar que apesar de os teores de ácidos ferúlico e cumárico somados seguirem a tendência da quantidade de lignina total, a correlação deles com a conversão de celulose não segue uma relação tão estreita quanto aquela vista entre lignina total e digestibilidade. O que vemos é que os hidroxicinâmicos não surtem tantos efeitos significativos a ponto de podermos explicar, a partir deles, a diferença de recalcitrância entre as quatro regiões do entrenó de uma mesma cana. Porém, quando comparamos uma mesma região proveniente de diferentes tipos de cana, os teores de ácidos ferúlico e cumárico podem ter participação na diferença de recalcitrância, em especial quando comparamos diferentes medulas. Este é o caso da região medular da amostra H140, já mencionada anteriormente.

Figura 23. Correlação entre os teores de ácidos hidroxicinâmicos totais (ferúlico e cumárico) e lignina total. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losango) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

Figura 24. Correlação entre os teores de ácidos hidroxicinâmicos totais (ferúlico e cumárico) e digestão da celulose. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losango) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

4.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

As análises microscópicas comprovaram diversas características morfológicas inerentes à anatomia de cana-de-açúcar, já listadas anteriormente na literatura (MOORE, 1987). Comparando-se as regiões de uma mesma cana, estas apresentaram uma micromorfologia relativa bem específica, que se reproduziu em todos os entrenós das quatro plantas avaliadas. Entretanto, quando fazemos uma comparação entre os diferentes tipos de cana, pequenas diferenças nos aspectos morfológicos ficam evidentes, como diâmetro celular e número de feixes vasculares por área. Todas essas características presentes em cada região e cada tipo de amostra de cana-de-açúcar podem estar relacionadas à resposta destas biomassas lignocelulósicas diante de uma digestão enzimática direta.

A avaliação microscópica de cortes transversais das várias frações em estudo, provenientes de diferentes tipos de cana, mostrou que a fração externa é uma região muito rica em fibras que se aglomeram entre si formando um aglomerado fibroso localizado na parte mais periférica do entrenó; este pode ser um dos motivos pelos quais a parte externa do colmo das canas de açúcar seja extremamente rígida e recalcitrante. A região do córtex apresentou a predominância de feixes vasculares, que correspondem a vasos circundados por fibras de parede celular espessa, (Figura 25); além disso, nessa região pode-se ver claramente uma transição gradativa dos feixes vasculares no que diz respeito ao número de células fibrosas – à medida que se aproximam da parte mais externa, os feixes vão ficando mais carregados de fibras e com vasos menores, podendo em alguns casos, como na amostra H140, ficarem maiores em diâmetro devido ao elevado número de fibras circundando os vasos (Figuras 25B e 26). Por outro lado, as frações correspondentes à medula apresentaram a predominância de células de parênquima e um menor número de aglomerados vasculares (Tabela 7).

Figura 25. Feixes vasculares de diferentes regiões da cana de referência em aumento de 50X. A – medula, e B – córtex.

Figura 26. Corte transversal de um entrenó de cana-de-açúcar mostrando a variação de tamanho das células e feixes vasculares na direção centro-periferia. Legendas: r – córtex; e – epiderme; p – parênquima; vb – feixe vascular. Reproduzido de Moore, 1987.

Tabela 7. Distribuição dos feixes vasculares e características micromorfológicas de cada região do entrenó das diferentes canas.

Região da cana	Número de feixes vasculares / 16 mm ²				Observações gerais
	CR*	H58*	H89*	H140*	
Medula	6 ± 1 ^a	5 ± 1 ^a	8 ± 1 ^a	5 ± 1 ^a	Células do parênquima com maior lúmen; fibras dos feixes com parede menos espessa.
Interface	8 ± 1 ^a	9 ± 1 ^b	10 ± 1 ^b	10 ± 1 ^b	Diâmetro das células diminui ao longo do sentido medula-córtex
Córtex	13 ± 2 ^b	19 ± 1 ^c	22 ± 2 ^c	17 ± 3 ^c	Células do parênquima menores; fibras dos feixes vasculares com paredes mais espessas e mais abundantes.

(*) Médias seguidas de letras iguais em cada amostra e numa mesma coluna, não diferem entre si a 95% de confiança, segundo o teste de Tukey.

Comparando-se as regiões do entrenó em uma mesma planta, os feixes vasculares presentes na medula apresentaram maior diâmetro em relação aos da região cortical e, além disso, continham vasos circundados por um menor número de fibras, as quais possuíam parede celular menos espessa que aquelas observadas no córtex – a exceção do híbrido 140 que apresentou feixes vasculares corticais maiores que os medulares. Outra característica importante observada é a diminuição em diâmetro no sentido medula- córtex das células parenquimáticas.

O aumento do número de feixes vasculares por área no sentido medula-córtex (Tabela 7) pode estar relacionado com a diminuição da conversão dos polissacarídeos na hidrólise enzimática direta, cuja eficiência diminuiu progressivamente quando se observa da medula até o córtex de uma mesma amostra de cana (Figuras 13 a 16). Um estudo recente, avaliando espectros UV das paredes celulares em diferentes regiões de um entrenó de cana-de-açúcar mostrou que os vasos e as fibras dos aglomerados vasculares contêm substancialmente mais lignina e ácidos hidroxicinâmicos do que as células de parênquima (SIQUEIRA et al., 2011). Estes dados estão de acordo com a restrita

capacidade das celulasas agirem sobre células com teores consideráveis de lignina e outros aromáticos (AKIN et al. 2008). Em geral, células lignificadas apresentam baixa permeabilidade a enzimas, sendo assim muito limitada a eficiência de hidrólises enzimáticas. No entanto, ao compararmos os híbridos e a cana de referência entre si, apenas o número de feixes vasculares por área não é o suficiente para estabelecer uma relação com os diferentes níveis de recalcitrância encontrados. Por exemplo, o híbrido 89 foi o que apresentou maior eficiência na conversão de polissacarídeos para todas as regiões no ensaio enzimático, porém é aquele com maior número de feixes por área, maior até mesmo que a amostra H140, a qual contém o mais alto teor de lignina entre as amostras de medula estudadas. Isso deixa claro que o tamanho dos aglomerados vasculares também deve ser de suma importância. A Figura 27 apresenta os tamanhos dos feixes vasculares em questão de diâmetro nas frações da medula, interface e córtex de cada amostra. Pode-se observar que há um contrabalanço com os dados de feixes vasculares por área mencionados anteriormente. Analisando as amostras H89 e H140, o primeiro contém mais feixes por área, porém com um tamanho menor, já o H140 apresenta relativamente menos feixes por área, porém estes são significativamente maiores que o das outras amostras.

Ao juntarmos os dois grupos de valores – feixes vasculares por área e tamanho – podemos calcular a proporção de extensão dos feixes vasculares em termos de área (Figura 28). Através desta avaliação, podemos confirmar a análise visual prévia das canas de que há um aumento na abundância de feixes no sentido medula-córtex. O destaque mais uma vez é o híbrido 140, o qual apresentou maior porcentagem de feixes vasculares nas três regiões e principalmente na região cortical. Isso, com certeza, é um fator ligado aos elevados níveis de aromáticos da planta, principalmente lignina, a qual está presente especialmente nas paredes espessas das fibras e de vasos nos aglomerados vasculares. Inclusive, essa característica é a diferença mais marcante entre a cana 140 e a cana de referência, ambas contendo teores similares de lignina para a planta inteira, porém resultados diferentes para hidrólise enzimática do material lignocelulósico. Um exemplo dessa diferença morfológica marcante são os feixes vasculares do córtex de ambas amostras (Figura 29). Os feixes dessa região na amostra H140 contêm pequenos vasos, porém estão recobertos por um vasto número de fibras, algo que não se vê no

caso dos feixes da amostra controle. Com tais observações, o que se infere é que o anel fibroso presente na fração chamada externa é mais difundido para dentro no híbrido 140, de forma que os feixes começam a apresentar mais fibras – e assim tamanho – antes do ponto observado para as outras canas. De certa forma, pode-se dizer que a cana-de-açúcar híbrida 140 teria medulas e interface reais bem menores e regiões do córtex e da fração externa mais extensas.

Figura 27. Diâmetro dos feixes vasculares das regiões da medula, interface e córtex nas amostras de canas-de-açúcar avaliadas.

Para uma visualização mais clara da relação entre feixes vasculares e recalcitrância, podemos estabelecer uma correlação entre a proporção de feixes por área e conversão da celulose na digestão enzimática (Figura 30). Observa-se que realmente há uma certa relação, confirmando o que foi inferido – que uma extensão maior dos feixes vasculares corresponde a uma maior recalcitrância das biomassas lignocelulósicas aqui avaliadas. Um ponto importante mostrado nessa relação é que um pequeno aumento na extensão dos feixes por área leva a uma grande baixa na eficiência de hidrólise dos polissacarídeos, comprovando a

importância que estes aglomerados vasculares possuem quando tratamos da recalcitrância de canas-de-açúcar.

Figura 28. Proporção de feixes vasculares por área nas regiões da medula, interface e córtex das amostras de canas-de-açúcar avaliadas.

Seguindo com as observações microscópicas, em todos os casos pôde-se observar que os feixes vasculares analisados se aglomeram na região mais periférica do caule de cana formando o anel fibroso, mencionado anteriormente e que é típico de monocotiledôneas. A fração denominada externa foi a amostra que apresentou menor valor de conversão dos polissacarídeos diante da ação de celulasas, corroborando a distribuição de recalcitrância salientada neste trabalho. Os resultados obtidos indicam que a região da medula, a qual contém em sua maior parte tecido parenquimático, é significativamente menos recalcitrante do que as regiões mais periféricas de um entrenó (interface e córtex). Isto é relevante, pois alguns dos esforços atuais na pesquisa de plantas adequadas para a hidrólise enzimática da celulose têm se focado em obter plantas com menores teores de lignina (MASARIN et al., 2011).

Figura 29. Feixes vasculares da região do córtex em aumento de 50X. A- cana de referência e B – cana híbrida 140.

Figura 30. Correlação entre proporção da extensão de feixes vasculares por área das regiões internas do entrenó das canas e conversão da celulose na hidrólise enzimática direta. (Círculos) = medula; (quadrados) = interface; (triângulos) = córtex; (losangos) = fração externa. As cores de cada símbolo indicam a origem da amostra de cana estudada, conforme legenda interna da figura.

5. CONCLUSÕES

Na busca por biocombustíveis, o grande foco da pesquisa científica no Brasil hoje é a cana-de-açúcar, ou mais especificamente, o bagaço de cana. Na busca por plantas que necessitam de pré-tratamentos mais amenos, técnicas de hibridação foram conduzidas gerando cana-de-açúcar com baixos e altos teores de lignina. Essas plantas são de grande interesse acadêmico e eventualmente industrial, caso atinjam a condição de cultivar comercial. Foi baseado neste contexto que os experimentos deste trabalho foram realizados a fim de caracterizar essa biomassa em potencial. No trabalho desenvolvido, uma cana de referência e três outras canas híbridas com teores variados de lignina foram caracterizadas. Podemos concluir que as diferentes frações de um entrenó: medula, interface, córtex e externa, diferem entre si em vários aspectos e que o mesmo ocorre quando comparamos tais aspectos entre as diferentes amostras de cana, inclusive a recalcitrância das mesmas.

Levando em conta apenas as diferentes frações, temos que a região medular é a que apresenta maior teor de glucanas e menor teor de xilanas, bem como menor quantidade de lignina. Ficou claro também, para todas as canas amostradas, que a medula é a região menos recalcitrante, com altos rendimentos na conversão enzimática da celulose, porém é a porção menos representativa em questão de massa e volume. Assim, essa baixa recalcitrância é contrabalanceada pela alta recalcitrância de regiões mais densas como córtex e a fração externa numa hidrólise completa do material. Para a interface concluímos que esta é um região do entrenó das canas em que se observa uma transição em termos de composição química (por exemplo, para glucanas: medula>interface>córtex e para lignina o inverso), densidade e morfologia, além de ser uma região do entrenó em que se distingue mais claramente a recalcitrância de diversas amostras de cana-de-açúcar. Conclui-se também que as regiões do córtex e da fração externa são as mais densas e mais recalcitrantes. Em termos morfológicos, a conclusão é que há uma diferença progressiva no sentido centro-periferia em um entrenó de cana, diferença esta que deve estar correlacionada com as diferentes respostas das regiões a acessibilidade enzimática.

Ao compararmos as diferentes amostras de cana entre si, concluímos que o híbrido 89 é a cana-de-açúcar com melhor eficiência na conversão dos polissacarídeos em uma hidrólise enzimática direta, seguida pelo híbrido 58. O híbrido 140 e cana de referência são similares nesse aspecto, exceto na fração da medula, em que a amostra H140 revelou sua alta resistência à hidrólise enzimática. A partir de observações como esta última, conclui-se que o teor de lignina não pode explicar por si só toda a recalcitrância das biomassas lignocelulósicas em questão. Apesar da clara conclusão que há uma relação estreita entre recalcitrância e teor de lignina, a eficiência de hidrólise da celulose também sofre interferência de outros aspectos e, assim, pode estar correlacionada com outros fatores. No presente trabalho foi possível estabelecer algumas dessas correlações. Densidade, disponibilidade de celulose, presença de feixes vasculares apresentam uma correlação relativamente definida com recalcitrância das biomassas aqui analisadas: por exemplo, quanto maior a densidade ou menor a disponibilidade de celulose ou maior a presença de feixes vasculares em uma dada biomassa lignocelulósica de cana, mais recalcitrante essa biomassa será diante de uma digestão enzimática direta. Isto nos leva a concluir que a recalcitrância de materiais lignocelulósicos provindos de canas-de-açúcar tem muito mais contribuintes do que apenas a lignina. Em relação ao teor de ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e p-cumárico) concluímos que este aspecto contribui para a recalcitrância das biomassas avaliadas, porém não é um bom indicador ou o principal determinante das diferenças dessa resistência a hidrólise quando comparamos diferentes amostras e regiões do entrenó.

Em geral concluímos que há regiões da cana-de-açúcar passíveis de hidrólise enzimática direta com rendimentos significativos sem a necessidade de pré-tratamentos, aumentando a extensão dessas regiões quando são canas híbridas com menos lignina. O que nos leva a considerar que uma nova abordagem num processo hipotético de obtenção de biocombustíveis seja possível. Esta abordagem seria selecionar as partes menos recalcitrantes para hidrólise direta e destinar somente as partes mais recalcitrantes para o processo de pré-tratamento. Para os híbridos, os teores variados de lignina total estão refletidos numa distribuição variada de tipos celulares, como, por exemplo, menor extensão dos feixes vasculares em híbridos com menor teor de lignina. Os híbridos também proporcionam níveis de digestibilidade enzimática variados que

tornam possível uma correlação entre os diferentes parâmetros avaliados com a recalcitrância do material. Assim, a partir do desenvolvimento dos experimentos previstos foi possível concluir que a seleção de plantas com menos lignina e seleção de regiões dentro de um entrenó leva de fato à obtenção de materiais lignocelulósicos menos recalcitrantes, no entanto o baixo teor de lignina das plantas híbridas pode estar refletido através de outros aspectos dentro da cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AKIN, D. E. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. **Biofuel Bioprod Bior**, v.2, p.288-303, 2008.

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

BARROS-RIOS, J.; SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A.; JUNG, H. G. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. **Anim Feed Sci Tech**, v.172, p.226-236, 2012.

BLANCHETTE, R. A.; KRUEGER, E. W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **J Biotechnol**, v.53, p.203-13, 1997.

CASLER, M. D.; JUNG, H. G. Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. **Anim Feed Sci Tech**, v.125, p.151-161, 2006.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnol**, v.25, p.759-761, 2007.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renew Energ**, v.36, p.3541-3549, 2011.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution, In: HEINZ, F. J. (ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. The Netherlands, Elsevier, p.7-84, 1987.

FENGEL, D.; WEGENER, G. (ed.) **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 613p, 1989.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos, cap.6. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (ed.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, EducS, p.215-242, 2004.

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 Technol**, v.74, p.201-212, 2000.

FLOURNOY, D. S.; KIRK, T. K.; HIGHLEY, T. L. Wood decay by brown-rot fungi - changes in pore structure and cell-wall volume. **Holzforschung**, v.45, p.383-388, 1991.

GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D.; LU, F. C.; RALPH, J. Coniferyl ferulate incorporation into lignin enhances the alkaline delignification and enzymatic degradation of cell walls. **Biomacromolecules**, v.9, p.2510-2516, 2008.

GRABBER, J. H.; MERTENS, D. R.; KIM, H.; FUNK, C.; LU, F. C.; RALPH, J. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. **J Sci Food Agric**, v.89, p.122-129, 2009.

GRABBER, J. H.; PANCIERA, M. T.; HATFIELD, R. D. Chemical composition and enzymatic degradability of xylem and nonxylem walls isolated from alfalfa internodes. **J Agric Food Chem**, v.50, p.2595-2600, 2002.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. **J Agric Food Chem**, v.48, p.6106-6113, 2000.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr Opinion Plant Biol**, v.11, p.349-55, 2008.

HE L.; TERASHIMA N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. **J Wood Chem Technol**, v.10, p.435-459, 1990.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in Monocotyledons IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugar cane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectrometry. **Holzforschung**, v.45, p.191-198, 1991.

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

HON, D. N.; SHIRAISHI, N. (ed.) **Wood and cellulosic chemistry**. 2^a ed, New York, EUA, Marcel Dekker, 2000, 914p.

JEOH, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnol Progr**, v.22, p.270-277, 2006.

JUNG, H. G.; CASLER, M. D. Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. **Crop Sci**, v.46, p.1801-1809, 2006.

KIM, M.; DAY, F. D. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.38, p.803-807, 2010.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R; AKHTAR, M. (ed.) **Enviromentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p.273-308.

LAM, T. B. T.; LIYAMA, K.; STONE, B. A. Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell walls of grasses. **Phytochemistry**, v.36, p.773 775, 1994.

LAM, T. B. T.; LIYAMA, K.; STONE, B. A. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. **Phytochemistry**, v.64, p.603-607, 2003.

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

LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P.; LOPES, F. J. P.; SILVÉRIO, F. O. Sugarcane breeding and selection for more efficient biomass conversion in cellulosic ethanol. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. eds. **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011, p.199-239.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, 1976, United States, v.6, p.21-33.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba – PR, 2005.

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

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane Bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnol Progr**, v.27, p.395-401, 2011.

MOORE, P. H. Physiological basis for varietal improvement in sugarcane. In. **Proc. of Int. Symp. on Sugarcane Varietal Improvement held at Sugarcane Breeding Institute**, 1987, Coimbatore, India, p.57-77.

NGUYEN, Q. A.; TUCKER, M. P.; KELLER, F. A.; BEATY, D. A.; CONNORS, K. M.; EDDY, F. P. Dilute Acid Hydrolysis of Softwoods. **Appl Biochem Biotech**, v.77-79, p.133-142, 1999.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technol**, v.74, p.69-80, 2000.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quim Nova**, v.26, p.863-871, 2003.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl Biochem Biotech**, v.34, n.35, p.37-47, 1992.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biot**, v.30, p.279-291, 2003.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugar cane bagasse. **Holz Roh Werkst**, v.59, p.447-450, 2001.

SILVA, F. T. **Obtenção de Insumos Químicos a partir do Aproveitamento Integral do Bagaço de Cana**. Tese (Doutorado). Unicamp. Instituto de Química, Campinas. 1995.

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. **Biotechnol Biofuels**, v.4, n.7, 2011.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicelluloses. **Enzyme Microb Tech**, v.46, n.3-4, 2010.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATP, P. M.; LEMBKE, C. G.; MORRE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnol J**, v.8, p.263-276, 2010.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGG, S. T. (ed.) **Methods in enzymology**. London: Academy Press, 1988.

XU, F.; SUN, R. C.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; HE, B. H.; FAN, G. S. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Anal Chim Acta**, v.552, p.207–217, 2005.

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

ZENG, M.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R.; MOSIER, N. S.; VERMERRIS, W.; HUANG, C.; SHERMAN, D. M. Tissue-Specific Biomass Recalcitrance in Corn Stover Pretreated With Liquid Hot-Water: Enzymatic Hydrolysis (Part 1). **Biotechnol. Bioeng**, v.109, n.2, p.390-397, 2011.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L.; The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. **Biotechnol Biofuels**, v.4, n.60, 2011.

ANEXOS

Figura 31. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração da medula das diferentes amostras de cana.

Figura 32. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração da interface das diferentes amostras de cana.

Figura 33. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração do córtex das diferentes amostras de cana.

Figura 34. Conversão enzimática da celulose e hemicelulose (xilana) na fração externa das diferentes amostras de cana.