UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ALINE APARECIDA ANTUNES CORNETTI

Caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado
como insumos potenciais para indústria de papel e celulose

Lorena
2018

ALINE APARECIDA ANTUNES CORNETTI

Caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado
como insumos potenciais para indústria de papel e celulose

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de concentração de
Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriane M. Ferreira
Milagres

Versão Corrigida

Lorena

2018

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

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

Cornetti, Aline Aparecida Antunes

Caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como insumos potenciais para indústria de papel e celulose / Aline Aparecida Antunes Cornetti; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres - Versão Corrigida. - Lorena, 2018. 93 p.

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

1. Xilana. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Sulfito alcalino. 4. Xilanases. 5. Adsorção. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira , orient.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus familiares, pelo amor, apoio e companheirismo.

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

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

Aos amigos de laboratório e demais amigos da EEL-USP e Unifei.

Aos demais companheiros do Departamento, pelos momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos e colaboração no meu desenvolvimento intelectual e científico.

À CAPES e CNPq, pela bolsa de mestrado.

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

RESUMO

CORNETTI, A. A. A. **Caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como insumos potenciais para indústria de papel e celulose.** 2018. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

Em uma fábrica de celulose, a maioria da hemicelulose é dissolvida no licor negro e se queima no processo de recuperação de álcalis. Devido a isto, a reposição das hemiceluloses dissolvidas de volta à fibra é uma das alternativas para a retenção de hemicelulose nas polpas, o que aumenta o rendimento do processo e produz polpas de alta qualidade. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, o bagaço gerado em grande quantidade constitui uma potencial fonte barata e abundante de hemicelulose para uso em processos biotecnológicos. O aproveitamento desta fração do material lignocelulósico pode aumentar o valor comercial do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse estudo, extraiu-se enzimaticamente a hemicelulose do bagaço visando utilizá-la como aditivos na indústria de papel e celulose. Inicialmente, o bagaço foi pré-tratado pelo processo quimiotermomecânico, em solução sulfito alcalino (10% Na_2SO_3 e 5% NaOH), 120 °C, 2 h. O pré-tratamento removeu 49,1% de lignina e 16,1% de xilana do bagaço, houve uma pequena solubilização de glucana (9,0%) e alto rendimento de sólidos (73,6%). A extração enzimática das xilanas a partir do bagaço pré-tratado foi feita com 5 UI de xilanase comercial (Luminase) por grama de material, em tampão fosfato 50 mM, 50 °C, pH 8 por 6 e 24 horas, obtendo-se 15% e 28% de rendimento de xilana, respectivamente, determinada quimicamente pelos conteúdos de xilose e arabinose. As xilanas solubilizadas do bagaço pré-tratado com a xilanase comercial por 6 horas foram precipitadas em 15% e 30% de etanol. Recuperou-se 2 frações, denominadas Xilanas 1 e 2, que apresentaram massas molares médias de 34.180 g/mol e 28.130 g/mol, respectivamente, e grau de substituição mais elevado (0,16-0,19). O restante do material foi concentrado e denominado Xilana 3. As xilanas extraídas enzimaticamente por 24 horas foram liofilizadas e denominada Xilana 4. As Xilanas 3 e 4 possuem características semelhantes, como baixas massas molares (2.890-3.660 g/mol) e graus de substituição (0,13-0,14), porém com grandes quantidades de impurezas. As xilanas obtidas foram submetidas ao processo de adsorção em polpas celulósicas “kraft” de eucalipto, marrom e deslignificada, em pH 10, consistência de 5% (m/v) e 10% de relação xilana/celulose (m/m). A adsorção em celulose ocorreu para as xilanas com menor grau de substituição e o aumento da concentração de xilanas com menores massas molares aumentou as taxas de adsorção. Em função desses resultados, conclui-se que a extração enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino produziu majoritariamente xilanas de baixa massa molar e pouco substituídas, que foram eficientes durante processo de adsorção à polpa celulósica e podem ser exploradas para redeposição em polpa celulósica visando melhorar as características da fibra e aumentar o rendimento do processo.

Palavras-chave: Xilana. Xilanase. Adsorção. Sulfito alcalino. Bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

CORNETTI, A.A.A. **Characterization of xylans extracted from pre-treated sugarcane bagasse as inputs for the pulp and paper industry.** 2018. 93 p. Dissertation (Master of Science). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

In a cellulose pulp factory, most of the hemicellulose are dissolved in the black liquor and burn in the alkali recovery process. For this reason, the replacement of the dissolved hemicelluloses back to the fiber is one of the alternatives for the retention of hemicellulose in the pulps, which increases the yield of the process and produces high quality pulps. Brazil has the largest sugarcane crop in the world, the bagasse generated in large quantities constitutes a potential cheap and abundant source of hemicellulose for use in biotechnological processes. The utilization of this fraction of the lignocellulosic material can increase the commercial value of sugarcane bagasse. In this study, hemicellulose was extracted enzymatically from the bagasse to be used as additives in the pulp and paper industry. Initially, the bagasse was pretreated by the chemothermomechanical process, in alkaline sulfite solution (10% Na₂SO₃ and 5% NaOH), 120 °C, 2h. The pretreatment removed 49.1% of lignin and 16.1% of xylan from the bagasse, there was a small solubilization of glucan (9.0%) and high solids yield (73.6%). Enzymatic extraction of xylan from pretreated bagasse was made with 5 IU of commercial xylanase (Luminase) per gram of material, in 50 mM phosphate buffer, 50 °C, pH 8 by 6 and 24 hours, obtaining 15% and 28% xylan yield, respectively, determined chemically by the contents of xylose and arabinose. The solubilized xylans of pre-treated bagasse with the commercial xylanase for 6 hours were precipitated in 15% and 30% ethanol. Two fractions, named Xylans 1 and 2, were recovered, having average molar masses of 34.180 g/mol and 28.130 g/mol, respectively, and a higher degree of substitution (0,16-0,19). The remainder material was concentrated and named Xylan 3. Xylans extracted enzymatically for 24 hours were lyophilized and named Xylan 4. Xylans 3 and 4 had the same similar characteristics as low molar masses (2.890-3.660 g / mol) and degrees of substitution (0,12-0,14), but with large amounts of impurities. The xylans were submitted to the adsorption process in cellulosic pulps of eucalyptus, brown and delignified, in pH 10, consistency of 5% (m/v) and 10% ratio xylan mass/cellulose mass (m/m). The adsorption in cellulose occurred for the xylan with lower degree of substitution and the increase of the xylan concentration with smaller molar masses increased the adsorption rates. Based on the results, it was concluded that the enzymatic extraction of sugarcane bagasse pretreated chemothermically with alkali sulphite produced mainly xylans of low molar mass and degree of substitution, which were efficient during the adsorption process to the cellulosic pulp and can be used for redeposition in cellulosic pulp in order to improve the characteristics of the fiber and increase the process yield.

Keywords: Xylan. Xylanase. Adsorption. Alkaline sulfite. Sugarcane bagasse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular da cana-de-açúcar.	17
Figura 2 - Representação da cadeia linear de celulose.	18
Figura 3 - Estrutura molecular de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana.	20
Figura 4 - Estrutura parcial de um arabino 4-O-metilglucuronoxilana.	21
Figura 5 - Estruturas químicas de precursores de lignina: (1) álcool p-cumarílico, (2) álcool coniferílico e (3) álcool sinapílico.	22
Figura 6 - Esquema estrutural de lignina de Abeto de acordo com Adler, 1977.	23
Figura 7 - Esquema representando a desestruturação do material lignocelulósico pelo pré-tratamento.	24
Figura 8 - Estabilização do terminal redutor para reação de parada do peeling de uma arabinoxilana.	26
Figura 9 - Mecanismo de sulfonação da lignina em meio neutro ou alcalino.	28
Figura 10 - Esquema funcional das enzimas xilanolíticas na hidrólise para degradação da xilana.	33
Figura 11 - Isotermas de adsorção de xiloglucano oligomérico (●) e polimérico (○) para Avicel (A) e celulose bacteriana (BC) (B).	42
Figura 12 - Fluxograma do processo de adsorção de xilanas isoladas bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, à polpa celulósica “kraft”.	45
Figura 13 - Fluxograma da extração de xilana.	49
Figura 14 - Aspecto visual das xilanas isoladas por xilanases.	64
Figura 15 - Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço pelo método enzimático, obtida a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P-30.	66
Figura 16 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.	68
Figura 17 - Comparação entre os valores de adsorção real e adsorção teórica (sem etapa de lavagem) de hemicelulose na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.	70

Figura 18 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de eucalipto deslignificado, após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.	72
Figura 19 - Comparação entre os valores de adsorção real e adsorção teórica (sem etapa de lavagem) de hemicelulose na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto deslignificado após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.	73
Figura 20 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das polpas celulósicas “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas.	77
Figura 21 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das polpas celulósicas “kraft” de eucalipto deslignificado após tratamento com as xilanas.	78
Figura 22 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com variação da quantidade utilizada da Xilana 4.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e após pré-tratamento quimiotermomecânico.....	58
Tabela 2 - Composição química do hidrolisado da extração enzimática por 6 e 24 horas..	59
Tabela 3 - Composição química das xilanas extraídas por via enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.	61
Tabela 4 - Massa molar ponderal média (Mw), massa molar numérica média (Mn), dispersividade (Đ) e grau de substituição (DS) das xilanas extraídas com xilanases a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.....	65
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para os tratamentos com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom.....	69
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para os tratamentos com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto deslignificada.	72
Tabela 7 - Principais atribuições para as absorções no infravermelho de xilanas.....	76
Tabela 8 - Percentual de xilose adsorvida nas polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marrom após tratamento com diferentes cargas de Xilana 4.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AbfB	α -L-Arabinofuranosidase
AquA	α -D-glucuronidase
AX	Arabinoxilanas
BC	Celulose bacteriana
BXL	Polpa de eucalipto não branqueada
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CTMP	Pré-tratamento quimiotermomecânico
D	Dispersividade
DP	Grau de polimerização
DS	Graus de substituição
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho
G	Guaiacil
GAX	Arabinoglucuronoxilanas
GH	Glicosil-hidrolases
H	p-Hidroxifenil
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MeGlcA	4-O-metilglucurônico
ML	Lamela média
MN	Mananos
Mn	Massa molar numérica média
Mw	Massa molar ponderal média
P&W	Papel de impressão e escrita
PCW	Parede primária
RX	Rendimento de arabinoxilana

S	Siringil
SCW	Parede secundária
SKPB	Polpa “kraft” de madeira de coníferas branqueadas
SKPUB	Polpa “kraft” de madeira de coníferas não branqueadas
SPB	Polpa sulfito branqueada
SPORL	Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose
WXL	Polpa de eucalipto branqueada
XyG	Xiloglucanos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 COMPONENTES DA PAREDE CELULAR	17
2.1.1 CELULOSE	18
2.1.2 HEMICELULOSES	19
2.1.2.1 XILANAS	20
2.1.3 LIGNINA	21
2.2 PRÉ- TRATAMENTOS	24
2.2.1 PRÉ- TRATAMENTO QUIMIOTERMOMECÂNICO	27
2.3 EXTRAÇÃO DE XILANAS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	29
2.4 ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DAS HEMICELULOSES	32
2.5 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILANAS	34
2.5.1 PRECIPITAÇÃO COM ETANOL	34
2.5.2 CROMATOGRAFIA	36
2.5.3 LIOFILIZAÇÃO	37
2.6 ADSORÇÃO DE HEMICELULOSES A FIBRAS DE CELULOSE E EFEITO NA QUALIDADE DA POLPA E PAPÉIS	37
2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 MATÉRIAS PRIMAS	47
4.2 PRÉ-TRATAMENTO QUIMIOTERMOMECÂNICO	47
4.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA	48
4.4 PRECIPITAÇÃO DA XILANA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA	48
4.5 CÁLCULO DE RENDIMENTO	50
4.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR APARENTE DAS XILANAS	50
4.7 ADSORÇÃO DE XILANA EM FIBRAS CELULÓSICAS	51
4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BAGAÇOS E DAS POLPAS CELULÓSICAS “KRAFT” DE EUCALIPTO	52
4.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS XILANAS ISOLADAS	53
4.10 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	54
4.11 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR)	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 PRÉ-TRATAMENTO QUIMIOTERMOMECÂNICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	56
5.2 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA, PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS XILANAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO QUIMIOTERMOMECÂNICAMENTE COM SULFITO ALCALINO	59

5.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DAS XILANAS EXTRAÍDAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	64
5.4 ADSORÇÃO DAS FRAÇÕES DE XILANAS À POLPA CELULÓSICA “KRAFT” DE EUCALIPTO ...	67
5.4.1 DEPOSIÇÃO DE XILANAS NA POLPA CELULÓSICA “KRAFT” DE EUCALIPTO MARROM.....	68
5.4.2 DEPOSIÇÃO DE XILANAS NA POLPA CELULÓSICA “KRAFT” DE EUCALIPTO DESLIGNIFICADO	71
5.4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) ...	75
5.4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE XILANA NA ADSORÇÃO AS FIBRAS	79
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, alcançando 690,98 milhões de toneladas na safra 2016/2017, sendo esta cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro (CONAB, 2018). A cana-de-açúcar é uma das principais alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol. A partir de 1 tonelada de cana se produz 280 kg de bagaço (CERQUEIRA; RODRIGUES; MEIRELES, 2007), assim o reaproveitamento do bagaço de cana gerado poderá transformar o resíduo em mais um subproduto da cana-de-açúcar, agregando valores adicionais à sua produção. Com esta finalidade, vários bioprocessos têm sido propostos, ilustrando a versatilidade dos usos de resíduos de cana-de-açúcar, como matéria-prima para produzir etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, entre outros produtos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico, tem cerca de 40-45% de celulose, 25-30% de hemicelulose, 20-25% de lignina (SUN et al., 2004a; ROCHA et al., 2015) e aproximadamente 5% de substâncias extraíveis e cinzas (MENDES et al., 2011).

Na parede celular a celulose está intimamente associada às hemiceluloses e à lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). Moléculas de celulose se alinham paralelamente para formar uma microfibrila e sobre a superfície se aderem as hemiceluloses pouco ramificadas, através de ligações de hidrogênio. Hemiceluloses mais ramificadas não interagem com a celulose, mas preenchem o espaço entre as fibrilas e contribuem para a estrutura da parede celular (BUSSE-WICHER et al., 2014).

As hemiceluloses são macromoléculas que são classificadas de acordo com a composição em monossacarídeos. Algumas das principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os arabinoglucuronoxilanas (GAX), acetiladas ou não acetiladas e os mananos (MN). Nestes exemplos, constata-se uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, com diferentes substituintes (HAYASHI; KAIDA, 2011).

A arabinoglucuronoxilana (GAX) é a hemicelulose presente em maior proporção no bagaço de cana-de-açúcar e, dentre suas possíveis aplicações, destaca-se sua utilização como aditivo de polpas celulósicas (MUGUET et al., 2011). A presença das hemiceluloses traz importantes melhorias na qualidade e na produção de polpas de celulose, Ban e Van Heiningen (2011) destacam entre as principais o aumento do rendimento e resistência mecânica da polpa.

Em uma fábrica de celulose, a maioria da hemicelulose é dissolvida no licor negro e se queima no processo de recuperação de álcalis. Devido a isto, a reposição das hemiceluloses dissolvidas de volta à fibra é uma das alternativas para a retenção de hemicelulose nas polpas (BAN; VAN HEININGEN, 2011).

Apesar do seu potencial, os métodos de isolamento e recuperação de xilanas são caros para serem utilizadas industrialmente na modificação de fibras de celulose em grande escala. No entanto, os resíduos da agricultura representam uma fonte potencial de baixo custo de material com alto teor de xilana para extração e utilização (KÖHNKE et al., 2009).

Nas últimas décadas, os estudos relacionados à adsorção de hemicelulose foram realizados utilizando xilanas comerciais (KABEL et al., 2007), xilanas recuperadas do licor negro (DANIELSSON; LINDSTRÖM, 2009; LINO, 2011) ou extraídas com álcali de diferentes fontes (KÖHNKE et al., 2008; KÖHNKE et al., 2009; CHIMPHANGO; GÖRGENS; VAN ZYL, 2016). Vários são os fatores que afetam a adsorção de xilanas às polpas celulósicas, como a massa molar, o tipo e o grau de ramificações. Como as fontes de xilanas são muito variadas, estudos específicos para xilanas de bagaço de cana-de-açúcar, extraídas por método enzimático, ainda não foram conduzidos.

Recentemente, a recuperação de frações de xilanas foi obtida utilizando xilanases para extrair xilanas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino (SPORCK et al., 2017). Entretanto, o material extraído apresentou uma grande dispersão na massa molar.

Dentro deste contexto, neste trabalho foi realizada a extração enzimática de xilana em dois tempos, curto e longo, os produtos obtidos foram recuperados por precipitação fracionada em etanol, analisados e comparados. Os produtos obtidos continham xilanas com diferentes massas molares, grau de ramificação e pureza para os estudos de adsorção em fibras celulósicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Componentes da parede celular

A parede celular vegetal (Figura 1a) consiste em três componentes principais: lamela média (ML), parede primária (PCW) e parede secundária (SCW) (ROWELL, 2005). Estas diferem entre si pela sua estrutura e composição química (FENGEL; WEGENER, 1989; SJOSTROM, 1993).

A lamela média possui substâncias incrustantes que unem duas ou mais células e, na madeira, esta é altamente lignificada com baixo conteúdo de celulose. A parede primária é fina e possui microfibrilas de celulose altamente desordenadas. A parede secundária é composta por três camadas: S1, S2 e S3 (Figura 1b). Em todos os tipos de células, a camada S2 conta como a maior porção da parede celular e determina as suas propriedades (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

Apesar da lamela média possuir maior concentração de lignina, devido a espessura, a camada S2 possui a maior quantidade de lignina da parede celular. As cadeias de celulose são agrupadas em microfibrilas, as camadas contêm feixes nano-fibrilares e lamelas, na S2 os feixes são localizadas paralelamente entre si e orientadas sob um ângulo agudo em relação ao eixo da fibra (IOELOVICH; IVULONOK, 1987; ROWELL, 2005; IOELOVICH; LEYKIN, 2008).

Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular da cana-de-açúcar.

Fonte: Sant'Anna et al. (2003)

Nota: a) imagem mostrando as camadas lamela média (ML), parede primária (PCW) e parede secundária (SCW).

b) Seção fina longitudinal mostrando as subcamadas do SCW (S1, S2 e S3) e suas medidas correspondentes.

2.1.1 Celulose

A celulose é a base para muitos produtos (papel, filmes, fibras, aditivos, etc.), sendo predominantemente isolada da madeira por processos de polpação em grande escala e, em muitos processos, exigindo-se alto grau de pureza (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é um polímero linear de unidades D-glucopirranose com ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Duas extremidades adjacentes de glicose são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. A posição β do grupo OH do carbono C1 faz com que ocorra uma inversão dessa molécula no plano da ligação ao redor do anel piranosídico, fazendo com que a unidade repetitiva desse polímero seja a celobiose (Figura 2) (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005). O número de unidades de D-glucose em uma molécula de celulose, ou seja, o seu grau de polimerização (DP) pode variar de 9.000 a 15.000 (ROWELL, 2005). Apesar de existirem grupos OH em ambas as extremidades da cadeia de celulose, esses grupos apresentam um comportamento diferente. O C1-OH é um grupo aldeído hidratado derivado da formação do anel pela ligação hemiacetal intramolecular. Por esse motivo, essa hidroxila apresenta propriedades redutoras, enquanto que o grupo C4-OH no fim da cadeia de celulose é uma hidroxila alcoólica e não redutora (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é uma cadeia longa e as unidades de glicose são orientadas em um plano pelas seguintes razões: ligação β glicosídica, nesta posição o grupo OH do carbono C1 permite um alongamento da cadeia molecular; a conformação de cadeira do anel piranosídico na cadeia de celulose, sendo esta a que apresenta menor energia e, portanto, a mais estável; a posição dos grupos OH na posição equatorial também é a de menor energia, sendo a forma predominante da celulose, fazendo com que as unidades de glicose estejam praticamente em um único plano (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2 - Representação da cadeia linear de celulose.

Os grupos funcionais hidroxilas estabilizam as longas cadeias moleculares de celulose pela interação uns com os outros e são responsáveis pela estrutura supramolecular, comportamento físico e químico da celulose. Os grupos OH da celulose são capazes de formar dois tipos da ligação de hidrogênio: entre duas moléculas de glicose adjacentes na mesma molécula de celulose (ligações intramoleculares), que proporcionam certa rigidez para cada cadeia, e ligações de hidrogênio entre grupos OH de cadeias de celulose adjacentes (ligações intermoleculares). Moléculas de celulose se organizam em feixes chamados de microfibrilas, que formam as fibrilas e dão origem às fibras celulósicas, responsáveis pela resistência à tração e insolubilidade na maioria dos solventes (FENGEL; WEGENER, 1989).

Com o empacotamento das cadeias de celulose e o aumento da densidade, regiões altamente organizadas são formadas, chamadas de regiões cristalinas. Regiões menos densas e menos organizadas são chamadas de amorfas ou não cristalinas. As superfícies de celulose cristalina são acessíveis, mas o resto da celulose cristalina não é acessível. A maioria da celulose amorfa é acessível, mas parte desta celulose é coberta com hemiceluloses e lignina o que a torna inacessível. Os conceitos de celulose acessível e não acessível são muito importantes na absorção de umidade, polpação, modificação química, extrações e interações com microrganismos (ROWELL, 2005).

2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses representam 20-35% da biomassa lignocelulósica e estão intimamente associadas à celulose e contribuem para os componentes estruturais dos vegetais (ROWELL, 2005).

A hemicelulose consiste de polissacarídeos com DP menor que a celulose (DP médio de 100-200), geralmente contendo uma cadeia principal de uma unidade de açúcar repetitiva com ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e pontos de ramificação $(1 \rightarrow 2)$, $(1 \rightarrow 3)$ e / ou $(1 \rightarrow 6)$, podendo ser compostas por mais de um tipo de açúcar com grupos acetil e metil substituídos. Os açúcares mais comuns encontrados nas hemiceluloses são D-xilopirranose, D-glucopirranose, D-galactopirranose, L-arabinofuranose, D-manopirranose, ácido D-glucopiranosilurônico e ácido D-galactopiranosilurônico com pequenas quantidades de outros açúcares. As hemiceluloses são solúveis em álcalis e são facilmente hidrolisadas por ácidos (ROWELL, 2005).

Hemiceluloses contém carbonos assimétricos e, portanto apresenta rotação ótica em solução, uma importante propriedade de todos os carboidratos e na maioria usada para sua

caracterização. Xilanas e a maioria das mananas possuem rotação específica negativa enquanto poligalactouronas possuem rotação positiva (FENGEL; WEGENER, 1989).

As madeiras de coníferas e folhosas diferem na porcentagem total e individual de hemiceluloses, assim como nas composições destas hemiceluloses. Em geral, coníferas possuem uma alta proporção de unidades de manose e galactose enquanto as folhosas possuem maiores porções de xilose e grupos acetilados (FENGEL; WEGENER, 1989). Nas gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, as paredes secundárias são compostas, majoritariamente, por 4-O-metil-glucuronoarabinoxilanas (MASARIN et al., 2011).

2.1.2.1 Xilanas

Xilanas são as hemiceluloses mais abundantes encontradas na natureza, as quais podem constituir mais de 30% da massa seco das plantas terrestres (LINDER et al., 2003).

As xilanas de folhosas possuem uma cadeia de xilose com ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, grupos laterais 4-O-metilglucurônico com ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow2)$ em intervalos irregulares, proporção de 10 xyl:1 Me-GluU, grupos O-acetil em C2 e C3 das xiloses e DP de 100 – 200, dependendo da espécie e do método de isolamento (FENGEL; WEGENER, 1989). A estrutura parcial de uma xilana de folhosas é representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura molecular de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana.

Fonte: Rowell (2005).

Em coníferas, as xilanas ocorrem como arabino-4-O-metilglucuronoxilanas. A ligação glicosídica da arabinofuranose na cadeia principal de xilose é do tipo $\alpha(1\rightarrow3)$, proporção de 3 a 6 Xyl:1 Me-GluU e 6 a 10 Xyl:1 Ara, DP de 70 – 130 e cadeias menos

ramificadas com 1 ou 2 grupos laterais por molécula (FENGEL; WEGENER, 1989). A estrutura parcial de uma xilana de conífera é representada na Figura 4.

Em gramíneas, a arabinoxilana e a glucuronoarabinoxilana são as hemiceluloses predominantes (EBRINGEROVÁ, 2006). As cadeias deste tipo de xilana são compostas por unidades de D-xilose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e apresentam grupos pendentes de acetila, arabinose e ácido metilglucurônico. Especificamente, no bagaço de cana-de-açúcar a proporção de arabinose: ácido glucurônico: xilose é de 1: 2: 8 (ALÉN, 2000).

Figura 4 - Estrutura parcial de um arabino 4-O-metilglucuronoxilana.

Fonte: Rowell (2005).

Há uma grande variedade de xilanas com diferentes: graus de polimerização (DP) da cadeia principal de poli-D-xilopirranose, graus de substituição (DS), resíduos laterais e comprimento da cadeia lateral. Esta complexa e ampla variedade de estruturas tem um efeito direto sobre as propriedades das hemiceluloses (SARBU; GONCALVES; PINHO, 2003; SUN et al., 2004a).

2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula orgânica aromática cuja função é o aumento das propriedades de força mecânica, impermeabilidade e resistência aos ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais lignificados (FENGEL; WEGENER, 1989).

Ligninas são macromoléculas amorfas altamente complexas. A lignina não possui uma única unidade de repetição, como a celulose, mas uma disposição complexa de unidades fenólicas substituídas. A natureza aromática da lignina proporciona um caráter hidrofóbico a esta, que juntamente com a sua estrutura oferece rigidez à parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

A quantidade de lignina presente nas plantas é bastante variável, além da distribuição na parede celular e a concentração de lignina nas partes diferentes das árvores não serem uniformes, o que dificulta a determinação da sua estrutura. O teor de lignina em coníferas varia entre 25 e 35%, enquanto em madeiras de folhosas e gramíneas é geralmente na faixa de 18-25% (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

Os precursores da biossíntese de lignina são o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 5) (ROWELL, 2005), que por meio da polimerização radicalar originam a macromolécula. Todas as ligninas consistem principalmente de três blocos de construção básicos de porções de guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H). As ligninas de coníferas são principalmente um produto de polimerização de álcool coniferílico e são chamados de lignina guaiacil, como o utilizado como exemplo na Figura 6. As ligninas de madeira folhosas são principalmente lignina de siringil-guaiacil, um copolímero de álcoois coniferílico e sinapílico (ROWELL, 2005).

Figura 5 - Estruturas químicas de precursores de lignina: (1) álcool p-cumarílico, (2) álcool coniferílico e (3) álcool sinapílico.

Fonte: Rowell (2005).

Figura 6 - Esquema estrutural de lignina de Abeto de acordo com Adler, 1977.

Fonte: Fengel e Wegener (1989).

Em gramíneas, a lignina incorpora níveis similares de G e S e possuem mais resíduos H que dicotiledôneas (BAUCHER et al., 2003). Os monolignóis polimerizam-se para constituir a lignina por meio de ligações do tipo C-C ou éter. No processo de polpação “kraft”, são as ligações éter não condensadas (β -O-4-) os alvos do processo de deslignificação, enquanto que as ligações C-C (β - β , β -1, β -5 e 5-5) são mais resistentes à degradação química.

Em cana-de-açúcar, as células mais lignificadas são os vasos seguidos das fibras e do parênquima. O parênquima predomina na região central de um entrenó da cana e, de fato, apresenta recalcitrância muito baixa. As regiões mais externas, ricas em fibras, são mais recalcitrantes e requerem algum tipo de pré-tratamento para que a recalcitrância seja diminuída (SIQUEIRA et al., 2011).

2.2 Pré- tratamentos

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa realizada para alterar a sua estrutura e composição e possibilitar seu uso para diversos fins (Figura 7). Várias características da biomassa como a cristalinidade e o DP da celulose, a área de superfície acessível, tamanho da partícula, porosidade, a proteção pela lignina e o revestimento de celulose por hemicelulose contribuem para a resistência da biomassa à hidrólise enzimática. Neste caso, o principal objetivo do pré-tratamento é remover a lignina e perturbar a estrutura cristalina da celulose, e assim permitir que os polissacarídeos possam ser hidrolisados mais rapidamente e com maiores rendimentos (MOSIER et al., 2005, ALVIRA et al., 2010; MOOD et al., 2013).

Figura 7 - Esquema representando a desestruturação do material lignocelulósico pelo pré-tratamento.

Fonte: Adaptado de MOSIER et al. (2005).

Os diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes características físico-químicas e é necessário adotar tecnologias de pré-tratamento adequadas com base nas propriedades da biomassa lignocelulósica de cada matéria-prima (ALVIRA et al., 2010).

Os pré-tratamentos podem ser classificados em biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (HIMMEL et al., 2007; ALVIRA et al., 2010).

Os pré-tratamentos biológicos empregam microrganismos, principalmente fungos de decomposição branca e parda que degradam a lignina, a hemicelulose e muito pouco de celulose, principalmente pela ação de enzimas extracelulares (SÁNCHEZ, 2009).

Em geral, esses processos oferecem vantagens como baixo custo de capital, baixa energia, nenhum requisito de produtos químicos e condições ambientais suaves. No entanto,

a principal desvantagem para desenvolver métodos biológicos é a baixa taxa de hidrólise obtida na maioria dos materiais biológicos em comparação com outras tecnologias (SUN; CHENG, 2002; YANG; WYMAN, 2008).

Os pré-tratamentos físicos são muitas vezes empregados associados a outros processos e tem por objetivo reduzir o tamanho da partícula, aumentar a área superficial e, dependendo da intensidade, podem afetar a cristalinidade do material lignocelulósico. Isso pode ser produzido por uma combinação de moagem, trituração ou refinamento, dependendo do tamanho de partícula final do material (SUN; CHENG, 2002; HIDENO et al., 2009; ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2014). Os pré-tratamentos físicos podem tornar o tratamento caro, pois o requisito de energia deste pré-tratamento é relativamente alto, dependendo do tamanho final da partícula e das características da biomassa (YANG; WYMAN, 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

O tratamento físico-químico de explosão à vapor se mostra como uma das alternativas para separação dos principais constituintes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) e aumento da susceptibilidade à bioconversão. Consiste na exposição do material lignocelulósico em um vapor de água saturado à alta pressão por um determinado tempo em um reator, seguido de uma descompressão brusca em condições atmosféricas (PITARELO et al., 2012). Em geral, o pré-tratamento é feito a temperaturas variando entre 160 a 260 °C, o que corresponde a pressões de 0,62 a 4,7 MPa (WYLEN; SONNTAG, 1985) e tempo de reação variando de alguns segundos a poucos minutos antes da descompressão (BRIENZO, 2010). O vapor d'água, à pressão e temperatura elevadas, penetram na estrutura da biomassa e, no momento da explosão, estas se expandem, fazendo com que as ligações químicas, que mantêm os componentes macromoleculares da biomassa fortemente unidos, se desfaçam (PITARELO et al., 2012).

Os pré-tratamentos químicos são os mais utilizados para a remoção de um ou mais componentes dos materiais lignocelulósicos. O objetivo principal dos pré-tratamentos químicos utilizando ácidos é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas. O pré-tratamento ácido, em particular, usando ácido sulfúrico é o pré-tratamento químico mais comumente empregado para a biomassa lignocelulósica. A utilização de ácidos concentrados pode ser desestimulada devido à formação de componentes inibidores de microrganismos e enzimas, além de ocasionar problemas de corrosão nos equipamentos e dificuldade de recuperação do ácido. O pré-tratamento com ácido diluído aparece como um método muito favorável para aplicações

industriais e tem sido estudado para o pré-tratamento de ampla gama de biomassas lignocelulósicas (WYMAN, 1996; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; MOOD et al., 2013).

O pré-tratamento utilizando bases tem importantes vantagens como a remoção de lignina e grupos acetil, que diminuem a acessibilidade da celulose para a sacarificação enzimática. Consequentemente, os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose, além de promover uma menor solubilização de polissacarídeos que os processos ácidos ou hidrotérmicos. Comparativamente, o pré-tratamento alcalino é operado a temperaturas mais baixas e não requer reatores com revestimentos anticorrosão (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; MOOD et al., 2013). Em temperaturas acima de 100°C este método favorece a reação de *peeling*, diminuindo o rendimento do processo. Os polissacarídeos em meio alcalino sofrem essa reação, com isso o terminal redutor (C1) pode sofrer oxidação, clivando as duas últimas unidades, formando uma nova extremidade redutora e assim por diante. Isso faz com que o polímero seja fragmentado pela extremidade redutora (FENGEL; WEGENER, 1989). Para evitar esta reação é recomendada a adição de agentes que reduzam ou oxidem o grupo carbonil a grupos relativamente estáveis (Figura 8) (WANG et al., 2015).

Entre os diferentes pré-tratamentos, os químicos e os termoquímicos são atualmente os mais eficazes e incluem as tecnologias mais promissoras para aplicações industriais (YANG; WYMAN, 2008).

Figura 8 - Estabilização do terminal redutor para reação de parada do peeling de uma arabinoxilana.

Fonte: WANG et al. (2015).

2.2.1 Pré- tratamento quimiotermomecânico

O pré-tratamento quimiotermomecânico (CTMP) utiliza vapor, materiais impregnados com reagentes químicos e refino do material durante o processo (MENDES et al., 2013). As propriedades das polpas pré-tratadas quimiotermomecanicamente variam de acordo com os principais parâmetros de processo: tempo de pré-aquecimento e temperatura, quantidade de reagentes e a intensidade do refinamento (FENGEL; WEGENER, 1989).

O pré-tratamento CTMP na presença de sulfito foi por muito tempo utilizado para a fabricação de polpas celulósicas (SJOSTROM, 1993), para a obtenção de lignosulfonatos (EKEBERG et al., 2006) e posteriormente o processo foi adaptado para diversos materiais lignocelulósicos visando utilizá-los como substratos para celulases (ZHU et al., 2009).

Zhu et al. (2009) realizaram um estudo do pré-tratamento com sulfito em meio ácido para superar a recalcitrância da lignocelulose, o qual foi denominado SPORL, para uma conversão robusta e eficiente da biomassa através da sacarificação enzimática. O desenvolvimento do processo SPORL é baseado nos seguintes entendimentos fundamentais do processo sulfito ácido: (1) há uma degradação e remoção considerável da hemicelulose (2) redução do DP das hemiceluloses e celulose; (3) a sulfonação de lignina aumenta a sua hidrofilicidade; (4) os níveis de dissolução da hemicelulose, a degradação da celulose e a sulfonação e a condensação da lignina aumentam à medida que se aumenta o tempo de reação e temperatura e se diminui o pH (ZHU et al., 2009).

ZHU et al. (2009) obtiveram como resultado uma quase completa hidrólise das hemiceluloses, deslignificação parcial e sulfonação da lignina residual, favorecendo as etapas seguintes de diminuição do tamanho de partícula e obtendo uma alta hidrólise enzimática da celulose (90% após 10 horas com 20 FPU/g de celulases).

No pré-tratamento utilizando sulfito a lignina sofre sulfonação, formando estruturas anfipáticas constituídas por uma cadeia aromática contendo grupos de ácidos sulfônicos realocados próximos a superfície da molécula, há uma facilitação da sua interação com o meio aquoso, aumentando a retenção de água na fibra e enfraquecendo a matriz lignocelulósica. Além disso, ocorre a clivagem do carbono β gerando uma intensa fragmentação e tornando a lignina ainda mais hidrofílica (FENGEL; WEGENER, 1989; SJOSTROM, 1993; ALÉN, 2000; HENRIKSSON, 2009; WANG et al., 2013a; WANG et al., 2013b).

O processo envolvido na polpação sulfito utiliza um licor feito a partir da queima de enxofre com a quantidade correta de oxigênio para produzir dióxido de enxofre, que ao reagir

com a água produz ácido sulfuroso. Dependendo do pH do licor de cozimento há formação de dióxido de enxofre (SO_2), íons hidrogenossulfito ou bissulfito (HSO_3^-) e íons sulfito (SO_3^{2-}) em diferentes proporções (ALÉN, 2000). Pelo equilíbrio químico, em meio ácido ($\text{pH} \leq 4$) observa-se maior concentração de HSO_3^- , enquanto que para meio neutro e alcalino ($\text{pH} > 4$), há maior predominância de íons SO_3^{2-} (SJOSTROM, 1993; GELLERSTEDT, 2009). Quando não há adição de agente alcalinizante (OH^- ou CO_3^{2-}), o consumo de OH^- proveniente da hidrólise do sulfito pode levar a uma leve redução no pH final.

Em meio básico as principais reações com a lignina ocorrem inicialmente devido à desprotonação do grupo OH fenólico, cuja estrutura está disponível em pequenas quantidades na macromolécula de lignina. A desprotonação do OH fenólico resulta a formação de metileno quinona, pela clivagem do carbono alfa da lignina (Figura 9) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 9 - Mecanismo de sulfonação da lignina em meio neutro ou alcalino.

Fonte: Henriksson (2009).

O pré-tratamento quimiotermodinâmico empregando sulfito alcalino tem como vantagem a menor degradação dos açúcares, que sofrem pouca ou nenhuma remoção dependendo da carga de reagentes e da temperatura empregada. Comparado com o pré-tratamento alcalino, no qual parte da perda do rendimento está relacionado a perda da hemicelulose, o sulfito alcalino gera uma polpa com maiores rendimentos, melhores propriedades mecânicas e rica em hemicelulose, devido à dissolução principalmente da

lignina. O processo sulfito alcalino é capaz de remover lignina de uma grande variedade de plantas (FENGEL; WEGENER, 1989; HEDJAZI et al., 2009; HENRIKSSON, 2009).

Mendes et al. (2011) relataram que os pré-tratamentos termomecânicos alcalinos ou sulfito alcalinos em bagaço de cana-de-açúcar forneceram fibras alteradas em suas estruturas físicas e composição química, removendo parcialmente alguns componentes da parede celular, como lignina e hemicelulose, confirmando que o menor teor de lignina e a hidrofilicidade aumentada neste material pré-tratado sejam as principais causas de uma melhora na hidrólise enzimática. Mendes et al. (2013) e Laurito-Friend et al. (2015) corroboram que após o pré-tratamento sulfito alcalino obtém-se altos valores de eficiência para hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

2.3 Extração de xilanas de materiais lignocelulósicos

A composição das xilanas isoladas depende da origem do material e do processo de extração (KABEL et al., 2002), portanto este deve ser selecionado de acordo com as características da xilana que se deseja obter (SUN et al., 2004a; PENG et al., 2012; ZHANG; SMITH; LI, 2014).

Os métodos de extração se baseiam na diferença de solubilidade das xilanas em ácido, água, álcool e solventes alcalinos e variam quanto ao rendimento, pureza, DP, DS e o padrão de substituição das xilanas extraídas. A solubilidade depende das interações cadeia-cadeia e cadeia-solvente (FENGEL; WEGENER, 1983). A solubilidade em álcali das arabinoxilanas, assim como sua solubilidade em solventes como água e álcool, é em grande parte determinada pelas suas ramificações. Nestes solventes, polissacarídeos mais ramificados resultam maiores solubilidades, o que decorre das menores interações moleculares das hemiceluloses entre si e com a celulose.

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

A extração hidrotérmica ocasiona o rompimento das ligações entre o grupo acetil e a cadeia de xilana, dessa forma o ácido acético formado catalisa a reação de despolimerização da xilana e provoca o aumento da solubilidade da hemicelulose em água (LONGUE; COLODETTE, 2011). Nesse processo, o rendimento de extração depende do conteúdo de grupos acetil na hemicelulose (NABARLATZ; ENBRIGEROVÁ; MONTANÉ, 2007).

As xilanas são facilmente solubilizadas e hidrolisadas em água e em temperaturas acima de 180 °C, visando aumentar os rendimentos da extração aquosa. Entretanto, essas condições resultam a degradação e diminuição do DP das xilanas extraídas, o que limita a utilização desta metodologia (CARA et al., 2009; PENG et al., 2012; ZHANG, SMITH, LI, 2014).

A extração de xilanas pode ser realizada em meio ácido, resultando maior clivagem da cadeia e formação de xilose e xilo-oligômeros, mas a formação de furfural e monossacarídeos são fatores negativos desse método. A característica de formação de maior quantidade de xilose do que xilo-oligômeros na hidrólise ácida ocorre independente da origem da xilana hidrolisada (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009).

As hemiceluloses são solúveis em álcali, entretanto o tratamento alcalino também solubiliza parte da lignina, o que diminui a pureza da xilana isolada (GATENHOLM; TEKANEN, 2003; SJOSTROM, 1993). A extração alcalina a frio, realizada em temperaturas abaixo de 40 °C e a uma concentração de hidróxido de sódio abaixo de 18%, é utilizada para obter xilanas mais puras, na qual as hemiceluloses são extraídas pela sua dissolução na solução fortemente alcalina (SIXTA, 2006).

Na extração alcalina a quente as reações químicas ocorrem geralmente em temperaturas entre 70 e 120 °C, na consistência de 10 a 15% (m/v) e uma concentração de álcali que varia de 3 a 18 g/L, promovendo reações nas hemiceluloses e na lignina (SIXTA, 2006).

Os produtos obtidos possuem diferentes características que dependem do método de extração e da fonte hemicelulósica utilizada. Zhou et al. (2010) ao extrair arabinoxilanas (AX) de farelo de trigo por métodos alcalinos e enzimáticos obteve, por análises químicas, que a AX extraída com álcali continha uma menor quantidade de proteína (4,10%) do que a AX extraída por enzima (9,85%). O ácido ferúlico foi totalmente removido da xilana alcalina e 43,5 mg / 100 mg deste ácido estavam presentes na xilana extraída por método enzimático. AX extraída com álcali foi altamente substituída com uma proporção de arabinose para xilose de 0,83, em comparação com 0,56 da xilana enzimática. A massa molar média ($3,517 \times 10^5$ g/mol) foi cerca de 10 vezes maior que a AX extraída com enzimas ($3,252 \times 10^4$ g/mol).

Sporck et al. (2017) obteve xilanas extraídas enzimaticamente do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino (CTMP) com menores massas molares e mais substituídas que xilanas extraídas em meio alcalino no mesmo bagaço CTMP. Utilizando uma xilanase comercial, foram solubilizadas xilanas com massa molar

numérica média (M_n) de 2900 g/mol e DS de 0,15. As xilanas extraídas pelos métodos alcalinos de De Lopez e de Hoije obtiveram xilanas com M_n de 15.200 g/mol e 13.300 g/mol, respectivamente, ambas com DS de 0,1.

A combinação de métodos é uma alternativa utilizada para se obter determinadas características desejadas dos produtos. Hakala, Liitiä e Suurnäkki (2013) extraíram hemiceluloses por tratamentos alcalinos e enzimáticos de polpa de celulose “kraft” de madeira folhosa branqueada. O tratamento enzimático foi realizado com uma xilanase de *Trichoderma reesei*, antes de uma extração alcalina ou entre duas extrações alcalinas. Sem pré-tratamento enzimático, 61% e 7% de xilana foram extraídas com alta pureza na primeira e segunda extração alcalina, respectivamente. A xilana de massa molar mais alta foi obtida na segunda extração alcalina. O tratamento com xilanase antes da extração alcalina hidrolisou até 12% de xilana a xilo-olissacarídeos. De acordo com estes resultados, é possível a obtenção de xilana polimérica e / ou oligossacarídeos, assim como de polpa com alto teor de celulose (93-94 %), por meio de processo de extração alcalina auxiliado por enzimas.

A principal vantagem de usar enzimas em processos industriais é sua alta especificidade, o que não é comum quando se empregam produtos químicos industriais. Além disso, as reações enzimáticas são realizadas em condições suaves, enquanto que em métodos químicos de extração podem exigir alta temperatura e ser realizadas em condições extremas de pH, que podem afetar a estrutura da polpa celulósica (HENRIKSSON; TEERI, 2009).

Xilanas com diferentes graus de polimerização e substituição podem ser obtidas pela extração enzimática de diferentes fontes de hemicelulose. O preparo de coquetéis de enzimas poderia permitir um controle completo sobre cada componente individual do substrato a hidrolisar e sua proporção relativa (BANERJEE et al., 2010).

Akpinar, Erdogan e Bostanci (2009) avaliaram a conversão enzimática de quatro resíduos agrícolas (tabaco, algodão, girassol e trigo) em xilo-oligômeros. Todas as xilanas desses resíduos, de forma independente de sua estrutura, geraram xilo-oligômeros com diferentes DP e DS. A avaliação comparativa do resultado mostrou que a composição da xilana, carga enzimática e tempo de reação determinaram o rendimento e a porcentagem de cada oligossacarídeo no hidrolisado.

Os avanços nas tecnologias enzimáticas visam o aumento da eficiência e diminuição de custo das enzimas (BANERJEE; SCOTTCRAIG; WALTON, 2010). Uma opção promissora para hidrólise enzimática é o emprego de enzima imobilizada, técnica que

permite a reutilização da enzima, podendo inclusive melhorar a sua estabilidade térmica. Outra possibilidade para a hidrólise enzimática é melhorando suas atividades específicas, incrementando a liberação de açúcares fermentescíveis, o que é possível utilizando misturas de enzimas (BANERJEE et al., 2010).

2.4 Enzimas de degradação das hemiceluloses

A hidrólise completa da hemicelulose requer enzimas com diferentes modos de ação. A Figura 10 apresenta a sequência de ação das enzimas xilanolíticas em uma xilana. As xilanases agem nas ligações entre xiloses, enquanto as acetil-xilana esterases e as feruloil esterases removem ácido acético e ácido ferúlico, respectivamente (Figura 10a) Arabinofuranosidases e glucuronidasas liberam arabinose e ácido glucurônico, respectivamente, a partir destes xilo-oligossacarídeos substituídos (Figura 10b). As xilosidasas convertem pequenos oligossacarídeos a xilose (Figura 10c).

As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que clivam as ligações glicosídicas no interior da cadeia de xilana, produzem oligossacarídeos e, conseqüentemente, reduzem o grau de polimerização do substrato. O local de clivagem depende da natureza do substrato, especialmente do grau de ramificação e do tipo de substituintes (LI et al., 2007; POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010).

As endo-xilanases de maior ocorrência em microrganismos pertencem às famílias 10 e 11 das glicosil-hidrolases (GH). As xilanases GH11 têm um grande sítio ativo e clivam cadeias principais em regiões não substituídas, enquanto as xilanases da família GH10 têm um sítio ativo menor e são capazes de hidrolisar as cadeias principais mais próximas a substituintes (VARDAKOU et al., 2004). Muitos estudos reportam uma sinergia entre as xilanases da família 10 e 11 e, portanto a presença simultânea das duas famílias melhora a porcentagem de conversão da xilana (BANERJEE et al., 2010; GAO et al., 2011).

As ligações que unem os grupos pendentes à cadeia da xilana são clivadas por enzimas acessórias como a α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), removendo L-arabinose substituídos nas posições 2 e 3 do β -D-xilopiranosil. A α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) hidrolisa as ligações α -1,2 entre os resíduos de ácido 4-O-metilglucurônico (SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010).

Figura 10 - Esquema funcional das enzimas xilanólicas na hidrólise para degradação da xilana.

Fonte: Adaptado de DODD e CANN (2009).

A β-xilosidase (1,4-β-D-xilana xilo-hidrolase; EC 3.2.1.37) hidrolisa xilobiose a xilose, liberando resíduos de β-D-xilopiranosil do terminal não redutor (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010). A acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) remove os grupos O-acetil a partir das posições 2 e/ou 3 nos resíduos de β-D-xilopiranosil de acetilxilana (CHAVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006; POLIZELI et al., 2005). As feruloil esterases (EC 3.1.1.73) hidrolisam as ligações éster, liberando os respectivos ácidos fenólicos ligados aos resíduos

de arabinofuranosídeos (CHAVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006; CHRISTOV; PRIOR, 1993; TOPAKAS et al., 2007; WILLIAMSON et al., 1998; GÍRIO et al., 2010).

Devido à complexidade da hemicelulose e ao grande número de enzimas necessárias para a hidrólise total, os estudos de sinergia identificaram apenas algumas das interações que ocorrem entre diferentes hemicelulases em diferentes substratos (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Argumenta-se que uma enzima de clivagem da cadeia principal terá maior atividade se primeiro forem removidos os substituintes por enzimas acessórias, que poderia representar um impedimento estérico para as xilanases (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; VARDAKOU et al., 2004). Porém, isto depende da especificidade das enzimas na reação, uma vez que algumas enzimas de clivagem da cadeia principal requerem a presença do substituinte para a sua atividade, como é o caso de algumas xilanases da família GH30, dependentes de ácido metil-glucurônico para clivagem da cadeia de xilose (VARDAKOU et al., 2004; BIELY et al., 2014; BIELY et al., 2016).

2.5 Recuperação e purificação de xilanas

Após o processo de extração das xilanas o passo seguinte é a recuperação e purificação por métodos que devem ser escolhidos dependendo das características que se deseja para o produto final. A purificação de xilanas extraídas de materiais lignocelulósicos é uma questão complexa, e pode requerer multiestágios de processos de fracionamento. Tais xilanas contêm uma grande variedade de contaminantes, como compostos derivados da lignina e extrativos, o que faz necessário a purificação do produto de interesse (VÁZQUEZ et al., 2005).

O método tradicional de recuperação de polissacarídeos é a precipitação com etanol, mas processos como evaporação, extração com solvente, métodos cromatográficos ou processos com membranas também podem ser utilizados (PENG et al., 2012).

2.5.1 Precipitação com etanol

A precipitação consiste na alteração da solubilidade de um ou mais componentes da solução. A precipitação com gradientes de etanol permite a separação dos oligossacarídeos em frações com diferentes propriedades estruturais. Isso permite caracterizar o material e, ao mesmo tempo, fornece um meio para produzir oligossacarídeos com estruturas diferentes para futuras determinações adicionais de estrutura-funcionalidade (SWENNEN et al., 2006).

O método de precipitação com etanol e leve acidificação (pH 5) tem sido muito empregado, porém xilanas altamente substituídas não são facilmente fracionadas por precipitação com etanol (WILKIE, 1979; SUN et al., 2004b). O grau de polimerização dos resíduos fracionados depende da concentração de etanol (SCHOONEVELD-BERGMANS; BELDMAN; VORAGEN, 1999). Peng et al. (2011) realizaram o fracionamento de hemicelulose de bambu usando concentrações crescentes de etanol entre 15 e 60%, obtiveram hemiceluloses com maior relação de arabinose/xilose e estabilidade térmica nas mais altas concentrações de etanol. As hemiceluloses menos ramificadas e com maior grau de polimerização foram precipitadas com menor concentração de etanol.

O estudo de Swennen et al. (2006) forneceu detalhes do padrão de precipitação de hemiceluloses em gradiente de etanol, utilizando como modelos oligossacarídeos de arabinoxilanas extraídas enzimaticamente de farelo de trigo. Foram avaliadas concentrações crescentes de etanol, com variação de 10% (v/v). O aumento da concentração de etanol (20%, 30% e 40% v/v) promoveu a recuperação gradativa de oligossacarídeos, tendo como resultado o aumento do grau de substituição (DS) e diminuição das massas molares nas hemicelulose precipitadas em maiores concentrações de etanol. Os autores sugeriram que as arabinoxilanas com baixo DS podem associar-se e formar agregados que precipitam primeiro. Quando as concentrações de etanol foram aumentadas para 50% (v/v), observou-se que as frações recuperadas apresentaram um aumento no grau de substituição (DS) e grau de polimerização (DP) em relação àquelas que foram precipitadas com menor concentração de etanol. Concluiu-se que nessa fração o DS afetou o comportamento da precipitação mais do que o DP. Os autores citam que o padrão de substituição também influencia o comportamento da precipitação, sugerindo que uma longa sequência de resíduos de xilose não substituídos permite que as moléculas se associem e se precipitem. Ao aumentar as concentrações de etanol até 90% (v/v), observou-se a precipitação de oligossacarídeos com os menores valores de DS e DP obtidos no estudo.

Bian et al. (2010) mostraram que a distribuição de ramificações ao longo da cadeia principal de xilana é bastante diferente nas subfrações hemicelulósicas obtidas nas várias concentrações de etanol. As xilanas macromoleculares e mais lineares com maiores rendimentos foram predominantemente precipitadas em concentrações de etanol relativamente menores, enquanto que mais xilanas ramificadas com massas molares mais baixas foram obtidas em concentrações de etanol relativamente maiores.

2.5.2 Cromatografia

A cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade para separação, identificação e quantificação das espécies químicas, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando migrações diferenciadas destes componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia por exclusão molecular baseia-se em um processo puramente mecânico. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. As moléculas da amostra são separadas por tamanho, sendo que as menores moléculas são capazes de penetrar facilmente nos poros da fase estacionária, enquanto as maiores são excluídas, passando entre os grânulos acompanhando a fase móvel fora dos poros. As moléculas migram com velocidades variáveis, saindo da coluna em ordem decrescente, relacionada com seu tamanho efetivo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Este método pode ser aplicado de duas formas: separação de grupos e fracionamento de alta resolução (IRVINE, 1997). O fracionamento de alta resolução consiste em separar uma amostra por diferença de massa molecular para sua purificação. No entanto, para que essa técnica tenha sucesso, é preciso calibrar a coluna utilizada para determinar os tempos de retenção dos diferentes polissacarídeos de tamanho conhecido. Desta forma, se correlacionam através de uma curva padrão os tempos de retenção na coluna que determina o tamanho dos oligômeros (STRIEGEL et al., 2009).

O foco do estudo de Palm e Zacchi (2004) foi a utilização da filtração em gel para separar oligômeros de baixa massa molar de uma solução obtida do tratamento com vapor de madeira de abeto, impregnada com água a 200 °C por 2 min. As duas frações de oligômeros coletadas para processamento adicional tiveram massas molares variando de 600-12.000 g/mol, com massas molares médias de 5.800 e 2.900 g/mol, respectivamente. O conteúdo de carboidratos nessas duas frações foi de 87 a 100%. A filtração em gel foi utilizada com sucesso para obter um material de oligômeros livres de açúcares monoméricos e compostos de baixa massa molar. Os resultados deste estudo indicam que a filtração em

gel pode ser usada para separar uma parte do teor de lignina das frações de oligômeros, mas não para removê-las completamente.

A cromatografia de troca iônica também é uma técnica útil para separar xilanas, baseia-se na ionização dos grupos ácidos presentes em sua estrutura que se adsorvem na resina. Hemiceluloses extraídas de folhas de bambu foram fracionadas em coluna DEAE-celulose (5 x 30 cm) eluídas com água, 0,2 M de acetato de sódio e um gradiente linear entre 0,2-1M de acetato de sódio. Os eluatos foram combinados, concentrados, dialisados contra água e precipitado com quatro volumes de etanol (SUZUKI et al., 1968). Peng, Ren e Sun (2010) estudaram o fracionamento de hemiceluloses de bagaço de cana-de-açúcar em DEAE-celulose e obtiveram seis subfrações. Com o aumento da concentração de NaCl, as frações continham hemiceluloses com maior taxa de arabinose/xilose, massa molar, estabilidade térmica e conteúdo associado de lignina.

2.5.3 Liofilização

A liofilização baseia-se na desidratação por sublimação de um produto congelado. Devido à ausência de água líquida e às baixas temperaturas necessárias para o processo de liofilização, a maioria das reações de deterioração e microbiológicas é interrompida, o que dá um produto final de excelente qualidade. O estado sólido da água durante a liofilização protege a estrutura primária e a forma dos produtos com redução mínima de volume (RATTI, 2001). A principal vantagem da liofilização é a secagem do produto sem que haja alterações bioquímicas do mesmo.

2.6 Adsorção de hemiceluloses a fibras de celulose e efeito na qualidade da polpa e papéis

O principal processo utilizado para a obtenção de fibras celulósicas no mundo é a polpação “kraft”. Durante o processo ocorrem principalmente reações de degradação/dissolução dos grupos da lignina pela presença de sulfetos no álcali (SIXTA, 2006), porém o licor de cozimento atinge e degrada parcialmente os polissacarídeos, principalmente as hemiceluloses, influenciando negativamente o rendimento da polpação (SANTOS; SANSÍGOLO, 2007).

A presença de hemicelulose na polpa auxilia na retenção de água na parede celular. Esse fenômeno melhora o inchamento das fibras, enfraquece as ligações entre as

microfibrilas na parede celular e colabora para um mais fácil refino da polpa (MUGUET et al., 2011). Quanto maior é o teor de hemiceluloses, maior é a flexibilidade da fibra úmida, e consequentemente, melhor é a ligação entre fibras (BAN; VAN HEININGEN, 2011; BHADURI; GHOSH; DEB SARKAR, 1995).

A influência das xilanas durante o refino das polpas e nas propriedades do papel foi estudada e mostraram-se muito importantes para a coesão das fibras e formação de papel de impressão e escrita (P&W) melhor consolidadas, lisas e densas (BHADURI; GHOSH; DEB SARKAR, 1995). Isso corrobora o fato de que as xilanas diminuem o consumo de energia durante o refino da polpa, exigindo assim menos energia para atingir um mesmo valor de resistência à drenagem (grau Shopper-Riegler: °SR). Isso leva a economias financeiras significativas, levando em conta que a etapa de refino é uma das operações mais onerosas do processo de fabricação de papel (BARBOSA et al., 2016).

Barbosa et al. (2016) obtiveram com o aumento do conteúdo de xilana de 5,9 para 14,5% a diminuição significativa do consumo de energia (150 kWh para 30 kWh) para atingir uma determinada resistência a drenagem (50 °SR), um efeito provavelmente causado pela hidratação e flexibilidade da fibra melhorada. As xilanas depositadas melhoraram as propriedades físicas e mecânicas da polpa, porém há um limite para esta economia, pois após um determinado ponto (15,6%) o aumento do conteúdo de xilanas causa efeito contrário, dificultando o batimento e aumentando o consumo de energia.

As propriedades de resistência, tais como índice de tração, resistência a dobra e índice de ruptura de folhas de papel, foram significativamente melhoradas quando os xilanas foram adicionados à polpa (BHADURI; GHOSH; DEB SARKAR, 1995). A formação de papel P&W de alta qualidade exige polpas de alta resistência porque estes são fabricados em máquinas de alta velocidade.

Wang (2006) concluiu que a adsorção de xilana leva a um aumento da carga iônica negativa da polpa, que está diretamente relacionada à resistência à tração do papel produzido, devido ao fato de que as cargas negativas promovem o aumento de retenção de água e, conforme já descrito, aumentam a flexibilidade da fibra. As fibras que contêm níveis mais altos de hemiceluloses são capazes de produzir papéis com maiores resistências, melhores ligações entre as fibras, melhor suavidade da superfície, menos porosidade e polpas mais densas.

Devido à dissolução inevitável de hemiceluloses durante a polpação química, a reposição das hemiceluloses dissolvidas de volta à fibra é uma das alternativas para a retenção de hemicelulose no processo de polpação (BAN; VAN HEININGEN, 2011). Para

isto, pode-se recuperar a xilana do licor negro (DANIELSSON; LINDSTRÖM, 2009; LINO, 2011) ou realizar o isolamento de xilanas de biomassas por métodos de extração (KABEL et al., 2007; KÖHNKE et al., 2008; KÖHNKE et al., 2009).

Ban e Van Heiningen (2011) investigaram as condições ótimas do processo para o aumento das taxas de adsorção das hemiceluloses à polpa celulósica. O tempo de processamento não apresentou impactos significativos nas taxas de adsorção, apenas uma alteração de cerca de dois pontos percentuais foi observada de um período de adsorção de 20 minutos a 2 horas. Tanto a consistência da fibra quanto a concentração da suspensão de hemiceluloses mostraram um impacto significativo na adsorção. Uma explicação pode ser a fraca interação entre as fibras celulósicas e a suspensão de hemiceluloses, sendo assim, a alta consistência aumenta o contato interativo e melhora a adsorção. Embora a consistência da fibra e a proporção de hemicelulose para fibra tenham sido os fatores mais importantes na adsorção, a interação entre essas variáveis mostrou pouco efeito sobre a adsorção. O resultado indica pouco efeito sinérgico entre os dois fatores. A interação fraca indica uma relação menos complementar entre os dois fatores - em outras palavras, para alcançar o maior rendimento de adsorção, ambas as condições ótimas de consistência de fibras e uso de uma solução concentrada de hemiceluloses devem ser atendidas simultaneamente. Resumidamente, a investigação dos principais efeitos sugeriu que a adsorção deveria ser realizada aplicando-se uma consistência de fibra média (~ 5%) e com uma carga de hemicelulose quatro vezes a quantidade de fibra, sendo que a adsorção é diretamente proporcional ao aumento da temperatura no intervalo em que foi estudado (40 a 95 °C).

Muguet et al. (2011) extraíram xilanas de polpa de eucalipto não branqueada (BXL) e polpa de eucalipto branqueada (WXL) e compararam a adsorção das xilanas em polpa de celulose marrom, obtendo as maiores taxas de adsorção para as xilanas WXL. As xilanas WXL adsorvidas à polpa foram mais estáveis durante o branqueamento do que as xilanas BXL. Este resultado é explicado pelo fato de que a estrutura da xilana do WXL foi menos substituída com grupos laterais, o que favoreceu uma melhor fixação à polpa, levando a uma maior estabilidade. As xilanas mais lineares e menos substituídas são mais estáveis quando depositadas sobre as fibras, resistindo assim mais à etapa de branqueamento das polpas e às forças mecânicas durante o refino.

O resultado do processo de adsorção de xilana, extraído de casca de cevada por métodos alcalinos, realizado por Köhnke et al. (2008), também dependeu da estrutura molecular da xilana. A análise de carboidratos nas fibras modificadas mostrou uma adsorção preferencial de xilanas de baixa substituição (proporção de arabinose para xilose de 0,10).

Em estudo posterior, Köhnke et al. (2009) utilizaram arabinoglucuronoxilana (GAX) altamente substituída, extraída de casca de cevada por métodos alcalinos e obtiveram rendimento de adsorção bastante baixo nas condições aplicadas (adsorção de 20% da fração total de GAX). A fim de aumentar a força motriz para adsorção do GAX altamente substituída, a xilana foi cationizada através de uma reação em meio alcalino aquoso. A cationização da GAX, que introduziu densidades de carga negativas que variam de 110 a 740 leq/g, aumentou a taxa e a amplitude da adsorção extensivamente (adsorção de 35% a 80% da fração total das variações de GAX cationizadas), devido à interação eletrostática induzida entre as fibras aniônicas e a xilana catiônica. Além disso, a adsorção de xilanas cationizadas parece ter o potencial de melhorar propriedades de resistência da polpa branqueada, conforme indicado por Antal et al. (1991, 1997) e Ren et al. (2009).

Danielsson e Lindström (2009) utilizaram licores negros obtidos de cozimentos “kraft” realizados com tempos e temperaturas de cozimento diferentes, do que resultou xilana dissolvida com diferentes graus de substituição de ácidos urônicos, massas molares distintas e quantidades variadas de lignina. As adições dos licores negros produzidos a partir de madeira de *Eucalyptus urograndis*, contendo xilana de baixa massa molar (9000 a 10500 g / mol) e baixo grau de substituição (0,10 a 0,15), produziram polpas superiores em resistência à tração. Por sua vez, adições de licor negro contendo xilana com alto grau de substituição (0,25) e maior massa molar (12000 a 12500 g / mol) produziram polpas de resistência inferior, avaliada pela densidade da folha (DANIELSSON; LINDSTRÖM, 2009). A principal desvantagem do reaproveitamento do licor utilizando variações drásticas nos processos de polpação e branqueamento para obtenção de xilana para adsorção é a dificuldade de recuperar hemiceluloses de forma economicamente viável (MANFREDI; OLIVEIRA, 2010).

Miletzky et al. (2015) adsorveram xilana em pastas de “kraft” de madeira de coníferas branqueadas e não branqueadas (SKPB e SKPUB), e em uma polpa sulfito branqueada (SPB) para investigar a influência nas propriedades físicas das folhas de papel, bem como obter informações mais detalhadas sobre a distribuição de xilana adsorvidas em superfícies celulósicas. A xilana adsorveu mais nas amostras de polpa “kraft” de madeira branqueada (SKPB), seguido da polpa de “kraft” de madeira não branqueada (SKPUB) e, por fim a polpa de sulfito branqueada (SPB). A diferença entre os resultados de SKPB e SKPUB pode ser atribuída devido às forças repulsivas mais fortes que podem ocorrer entre xilana e lignina residual. A diferença entre SKPB e SPB é provavelmente devido as diferenças entre morfologia e química da superfície (BACHNER; FISCHER; BÄUCKER, 1993).

Miletzky et al. (2015) obteve na análise superficial das fibras SKPB após o tratamento com xilana uma distribuição heterogênea na superfície. Em relação às propriedades físicas das folhas de papel, ocorreu um aumento no grau de refinação das amostras de polpa tratadas com xilana. Com relação à intensidade de refinação (revoluções no moinho PFI), as folhas de papel das polpas modificadas possuem maior resistência à tração.

Kabel et al. (2007) compararam as taxas de adsorção entre celulose Avicel e Celulose bacteriana (BC) em concentrações altas e baixas de xiloglucano oligomérico e polimérico. A celulose Avicel adsorveu quantidades muito menores de xiloglucano do que BC. Esta diferença é provavelmente devido a uma área de superfície externa relativamente pequena de celulose Avicel ($20 \text{ m}^2/\text{g}$) em relação à BC ($200 \text{ m}^2/\text{g}$) (ZHANG; LYND, 2004). Tanto para Avicel quanto para BC foi observado que quanto maior a quantidade de xiloglucano ainda em solução após a adsorção, denominada "concentração de equilíbrio", maior quantidade de xiloglucano adsorvido na superfície de celulose. A uma baixa concentração de equilíbrio de xiloglucano, o xiloglucano pode interagir extensivamente com a celulose, resultando uma cadeia de polímero semi-linearmente adsorvido, como mostrado na Figura 11. Na maior concentração de xiloglucano, um novo equilíbrio de adsorção resulta mais xiloglucano polimérico adsorvendo na celulose pela formação de *loops* e caudas, que estão associados em pontos na cadeia de celulose (VINCKEN et al., 1995).

Além disso, a isoterma de adsorção de xiloglucano oligomérico em BC atingiu um valor de platô em concentrações baixas, indicando que um máximo na adsorção foi alcançado, enquanto que para Avicel nenhum valor de platô foi atingido (Figura 11). De acordo com a teoria de Vincken et al. (1995), as frações de xiloglucano oligoméricas só podem se adsorver à celulose linearmente, porque são muito pequenos para formar *loops* e caudas. Portanto, espera-se que um máximo na adsorção já tenha sido alcançado em baixas concentrações de equilíbrio, como foi o caso da adsorção de BC. O aumento da adsorção para Avicel em concentrações mais elevadas poderia estar relacionado à presença de poros pequenos onde podem estar adsorvidas essas frações menores de xiloglucano (VINCKEN et al., 1995).

Figura 11 - Isotermas de adsorção de xiloglucano oligomérico (●) e polimérico (○) para Avicel (A) e celulose bacteriana (BC) (B).

Fonte: Kabel et al. (2007)

Kabel et al. (2007) utilizaram frações variadas de xilanas extraídas de aveia, trigo e eucalipto, para comparação das taxas de adsorção nas fibras celulósicas de BC. Desses estudos concluíram que são necessárias pelo menos 15 unidades de xilose não substituídas para adsorção, porém não ficou demonstrado nesse trabalho se estas unidades não substituídas devem estar em sequência para que possa ocorrer a adsorção. A análise de carboidratos nas fibras modificadas mostrou uma adsorção de xilanas de baixa substituição (proporção de arabinose para xilose de 0,10).

Complementarmente a estes estudos, os autores Chimphango, Görgens e Van Zyl (2016) compararam a influência dos grupos laterais arabinosil e 4-O-metilglucurônico (MeGlcA) na adsorção de xilana às fibras celulósicas de fios de algodão. Para isto, utilizou de xilanas extraídas por métodos alcalinos brandos de bagaço de cana, bambu, eucalipto e pinos tratadas com as enzimas α -L-Arabinofuranosidase (AbfB) e α -D-glucuronidase (AquA), utilizadas separadas e em mistura, para remoção das cadeias laterais. No ensaio controle, sem a utilização de enzimas auxiliares, o bagaço de cana-de-açúcar apresentou as maiores taxas de adsorção. Nos testes de adsorção utilizando as enzimas AbfB e AquA, as xilanas desramificadas enzimaticamente obtiveram aumento das taxas de adsorção, exceto para a xilana de bagaço de cana-de-açúcar tratada com AbfB, o maior aumento da taxa de adsorção ocorreu para a xilana de eucalipto tratada com AquA.

Observou-se que a remoção dos grupos laterais das xilanas de bagaço de cana-de-açúcar não interferiram na adsorção na mesma proporção do que ocorreu com as xilanas de outras fontes. Sendo assim, quando não utilizando de enzimas para remoção dos grupos

laterais o uso da xilana extraída de bagaço de cana-de-açúcar é o mais vantajoso, porém ao se utilizar do processo enzimático para obtenção de xilanas desramificadas outras fontes tornam-se mais eficientes no processo de adsorção, principalmente a xilana de eucalipto. A xilana de eucalipto possui a maior massa molar entre as utilizadas, quando removido seus grupos laterais, têm tendência de se auto-agregar e inchar dentro das fibras de celulose em solução, aumentando extensivamente suas taxas de adsorção.

Foi reportado que a remoção de MeGlcA foi mais importante para aumento de adsorção do que a remoção de arabinose, concluindo que a aplicação da enzima AquA foi mais efetiva. A presença de MeGlcA nas cadeias laterais das xilanas são prejudiciais à adsorção das xilanas às fibras de celulose por ser um substituinte aniônico, a presença de carga negativa aumenta a repulsão das cadeias prejudicando sua adsorção (SILVA et al., 2011; DANIELSSON, 2007). Além disso, a maioria dos grupos laterais compostos por MeGlcA, quando retirados, deixam um grande comprimento da cadeia de xilanas não substituídas. Em arabinoglucuronoxilana, a adsorção foi mais influenciada pelo grau de substituição do que pela massa molar.

Vários trabalhos demonstraram que o nível de interação xilano-celulose depende da estrutura da xilana (KABEL et al., 2007; KÖHNKE et al., 2008; MUGUET et al., 2011). Além disto, também infere-se que as xilanas readsorvidas na polpa estão mais fortemente aderidas às fibras do que aquelas deixadas na polpa por ocasião da polpação “kraft” (PEDRAZZI et al., 2011).

2.7 Considerações sobre a Revisão Bibliográfica

Nos últimos anos, houve um maior interesse no uso de hemiceluloses para a modificação de fibras de celulose visando a melhoria das propriedades da polpa, como resistência ao rasgo e tração, a fim de gerar papéis de melhor qualidade. Além disso, a incorporação de hemiceluloses às fibras melhora a margem econômica da fábrica, pois aumentam o rendimento do processo e diminuem a energia necessária para o refino. A indústria considera reaproveitar as xilanas que se lixiviam nos licores negros resultantes da polpação “kraft”, através de sua recuperação e redeposição durante o processo de polpação para o aumento do teor de hemiceluloses da polpa, mas essa não é a única possibilidade para implementação desta tecnologia.

A indústria já possui um processo bem estabelecido de recuperação do álcali do licor negro. Sendo assim, a utilização de xilanas pré-isoladas de resíduos agrícolas é uma

alternativa de aproveitamento de uma fonte barata e abundante de hemiceluloses, o que ainda agrega valores ao produto agrícola e oferece um destino sustentável ao resíduo. As xilanas podem ser extraídas por diversos procedimentos químicos e físicos, gerando xilanas com diferentes estruturas e graus de pureza, dependendo do processo empregado.

A xilana se distribui na parede celular vegetal e recobre as fibras celulósicas, além de se ligar quimicamente à lignina. Sendo assim, a extração de xilanas desde os materiais lignocelulósicos naturais é limitada pelos demais componentes da parede celular.

Diversos pré-tratamentos podem ser utilizados para desestruturar a parede celular vegetal e diminuir a sua recalcitrância. O pré-tratamento sulfito alcalino tem essa capacidade pois, dependendo do material lignocelulósico e da severidade do processo, remove grande parte da lignina e ainda sulfona a lignina residual, deixando-a mais hidrofílica. A celulose é preservada, assim como a maior parte da hemicelulose. Além disso, na condição alcalina a estrutura do material depois de pré-tratado fica mais afrouxada, o que também facilita a ação enzimática.

No contexto da biorrefinaria que emprega o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima dos processos, cada um dos componentes deve ser convertido em produtos com maior valor comercial. O bagaço pré-tratado com sulfito alcalino libera lignina e lignosulfonatos no licor e os polissacarídeos residuais podem ser convertidos enzimaticamente a uma mistura de açúcares (C5 e C6). A utilização da celulose e xilanas, separadamente, pode resultar em produtos mais rentáveis. Além disto, Chimphango, Görgens e Van Zyl (2016) obtiveram maiores taxas de adsorção utilizando xilanas extraídas por métodos alcalinos de bagaço de cana-de-açúcar sem a remoção de grupos laterais, quando comparadas com outras fontes nas mesmas condições, como a de eucalipto.

Neste contexto, a proposta deste trabalho é realizar a extração de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino, utilizando uma metodologia descrita por Sporck et al. (2017), empregando uma xilanase comercial que atua em condições levemente alcalinas. As xilanas serão recuperadas por precipitação fracionada com etanol, a composição química e massa molar das frações de xilanas recuperadas serão determinadas para avaliar o desempenho de cada fração durante o processo de adsorção à polpa celulósica “kraft”, visando sua qualificação como insumo para indústria de papel e celulose.

A hipótese é de que a adsorção de xilo-oligômeros à celulose pode ser mais efetiva em termos de rendimento e estabilidade a etapas subsequentes do branqueamento da polpa celulósica “kraft” que frações de xilana de alta massa molar.

O fluxograma da Figura 12 ilustra este processo e enumera suas vantagens.

Figura 12 - Fluxograma do processo de adsorção de xilanas isoladas bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, à polpa celulósica “kraft”.

Fonte: Arquivo pessoal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é extrair xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino, com auxílio de xilanase comercial, visando sua qualificação como insumo para a indústria de papel e celulose.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tempo de extração enzimática no rendimento e nas características das xilanas solubilizadas do bagaço de cana pré-tratado.

Caracterizar as frações de xilanas recuperadas após precipitação em diferentes concentrações de etanol.

Avaliar a adsorção das frações de xilanas recuperadas em polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom e deslignificada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias primas

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), ensacado e armazenado em temperatura ambiente até sua utilização.

As polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marrom e deslignificada foram fornecidas pela Fibria Celulose e Papel, ensacadas e armazenadas úmidas em freezer a -10 °C até sua utilização.

4.2 Pré-tratamento quimiotermodinâmico

O pré-tratamento foi realizado com 600 g de bagaço (base seca) em reator de aço inox de 16 L hermeticamente fechado. Com auxílio de uma bomba de vácuo, foi retirado o ar do recipiente por 30 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 6 L de uma solução preparada com 10% (m/m) de Na_2SO_3 e 5% (m/m) de NaOH. Sem desligar a bomba de vácuo e utilizando uma mangueira situada na tampa, a solução foi transferida para o reator contendo o bagaço. A bomba de vácuo foi mantida ligada por mais 15 minutos para entrada do líquido nos poros do bagaço.

O reator foi transferido para autoclave e a digestão da biomassa foi feita a 121 °C por 2 h. Após essa etapa, o reator foi imediatamente resfriado em água e o bagaço pré-tratado foi filtrado em filtro de nylon com o funil de Buchner, sob vácuo. O licor resultante foi descartado e o sólido foi lavado com água. A água utilizada durante a lavagem (aproximadamente 20 L) foi coletada ao final do processo para ser reutilizada durante a filtração e refino.

O material lavado foi suspenso em água até um volume final de 25 litros (~2 % consistência) e desfibrado em um refinador de discos REGMED MD-300 com um espaço de disco de 0,1 mm (REGMED Brasil) e um consumo de energia de 250 Wh. Após o refino, a polpa obtida foi filtrada a vácuo em filtro de nylon com funil de Buchner sob vácuo. O licor foi recirculado três vezes para retenção dos finos até não ser observada turbidez. A polpa foi armazenada úmida em freezer a -10 °C, enquanto o licor foi descartado.

4.3 Extração enzimática

Foi utilizado o preparado comercial de xilanase de *Bacillus licheniphormes*, nome comercial Luminase PB-100, produzido pela empresa Verenium, com atuação de 40 a 70 °C e pH de 5 a 8,5 (GOVENDER, 2014).

O teor de umidade do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino foi determinado no analisador de umidade por infravermelho, modelo MB-23, marca OHAUS, a 105 °C, até massa constante.

O experimento foi realizado com 50 g de bagaço em massa seca. Para isto foram pesados 218 g de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino úmido com 77% de umidade, na consistência de 5% (m/v) dentro de frascos Elenmeyer de 2 litros. A xilanase foi diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 8,0 até se obter o volume final de 1 litro de mistura, descontada a água presente no bagaço úmido do volume final. Foi adicionado 5 UI xilanase/g de bagaço seco e a reação foi realizada em banho-maria a 50 °C com agitação de 120 rpm. Foram feitas extrações com tempo de reação de 6 h e 24 h. Após estes tempos, as amostras foram fervidas por 5 min com a finalidade de interromper a reação.

Após resfriamento as misturas foram submetidas a um processo de filtração em filtro de nylon com funil de Buchner sob vácuo, para separação do sobrenadante e do sólido residual. A composição química do sobrenadante foi determinada conforme a metodologia descrita em 4.9, antes de se passar para a etapa de recuperação da xilana por precipitação com etanol.

4.4 Precipitação da xilana resultante da extração enzimática

As xilanas extraídas com 6 horas de reação enzimática foram separadas por precipitação fracionada, com concentrações crescentes de etanol. O pH do sobrenadante foi ajustado para 5,5 com HCl 1M e realizada a precipitação fracionada nas concentrações de 15, 30 e 60% de etanol (v/v). Inicialmente adicionou-se 15% de etanol e, após repouso de 24 h para decantação, foi feita a separação do precipitado por centrifugação a 4.000g, por 15 minutos. O procedimento foi repetido adicionando-se mais etanol ao sobrenadante até atingir as demais concentrações. As xilanas precipitadas foram liofilizadas para a secagem e determinação da composição química e do rendimento de sólidos (adaptado de PENG et al., 2009). Após a adição de 60% de etanol, o sobrenadante foi submetido à rotoevaporação para eliminação do etanol e o resíduo foi liofilizado para recuperação das xilanas.

Para as xilanas extraídas com 24 horas de reação, o sobrenadante foi liofilizado. As amostras de xilanas foram secas em aparelho Liofilizador Supermodulyo RK Freezer Dryer, marca Edwards, em temperatura inferior a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão inferior a 10^{-1} Torr, pelo tempo necessário até sua secagem.

A Figura 13 apresenta um fluxograma para entendimento da metodologia da extração das xilanas.

Figura 13 - Fluxograma da extração de xilana.

4.5 Cálculo de rendimento

O rendimento de xilana foi calculado relacionando a quantidade de arabinoxilana obtida (em gramas), pela quantidade de arabinoxilana no bagaço pré-tratado (também em gramas), segundo a Equação 1.

$$RX = \frac{m_{xil} * 100}{F * m_{bag}} \quad (1)$$

RX= Rendimento de arabinoxilana (%)

m_{xil} = Massa de arabinoxilana (g) (arabinose + xilose)

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

F= porcentagem de arabinoxilana (arabinose + xilose) presente no bagaço pré-tratado.

4.6 Determinação da massa molar aparente das xilanas

A massa molar das xilanas foi determinada por permeação em gel usando-se colunas de vidro (1 cm de diâmetro por 50 cm de comprimento), empacotadas com resina de poliacrilamida Bio Gel P-30 (Bio-Rad), com faixa de separação de 2.500-40.000 g/mol, com eluente NaOH, pH 10, a um fluxo de 0,3 ml/min.

A coluna foi calibrada com xilose (180 g/mol), dextranas de 3.500 g/mol, 6.000 g/mol, 10.000 g/mol, 20.000 g/mol e azul de dextrana (2.000.000 g/mol). A detecção dos xilo-oligossacarídeos e xilanas eluídos da coluna foi realizada pelo método do fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Para a coluna os dados da calibração foram linearizados em uma equação do tipo $\log M = a + bVe$, onde M é a massa molar e Ve o volume de eluição, a e b representam os coeficientes da equação. A área dos cromatogramas correspondente aos picos foi dividida em n áreas parciais. Cada área parcial foi aproximada à área de um trapézio, sendo que cada incremento de volume de eluição a massa molar (M_i) foi calculada pela curva de calibração. A massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) foram calculadas utilizando as equações 2 e 3.

$$M_w = \frac{\sum \text{Área}_i M_i}{\sum \text{Área}_i} \quad (2)$$

$$M_n = \frac{\sum \text{Área}_i}{\sum \frac{\text{Área}_i}{M_i}} \quad (3)$$

A dispersividade (Đ) foi calculada pela relação M_w/M_n .

4.7 Adsorção de xilana em fibras celulósicas

Para determinar as melhores condições de adsorção de xilana na celulose, foram avaliados dois tipos de polpas: 1) polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom e 2) polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificada.

Dentro de tubos de ensaio foram pesados 0,20 g de polpa de celulose (base seca) e adicionada solução de 4 ml de NaOH (0,1 mM) e 0,02 g de xilana (10% massa xilana/massa celulose), resultando uma consistência de massa de 5% (m/v) (BAN; VAN HEININGEN, 2011). A reação foi realizada em pH 10 para simular as condições ótimas para redeposição de xilanas durante a etapa de deslignificação com oxigênio na produção de polpas celulósicas (BARBOSA et al., 2016). A suspensão foi agitada com bastão de vidro e os tubos foram incubados em banho-maria por 2 horas a 70 °C, sem agitação (BAN; VAN HEININGEN, 2011). Foi feito um controle sem a adição de xilana. Decorrido o tempo de incubação, foi feita a lavagem da polpa adicionando-se 10 ml de água, a amostra foi agitada com um bastão de vidro e deixada em repouso por 1 hora. O sobrenadante foi separado e a polpa resultante do tratamento foi liofilizada para posterior caracterização química e por espectroscopia de infravermelho (FT-IR).

Foi feito um ensaio de adsorção excluindo a etapa de lavagem com o intuito de se obter um valor de adsorção máximo, ou seja, um valor teórico em que toda a hemicelulose presente nas frações de xilanas tivessem sido adsorvidas à polpa celulósica. A diferença entre os ensaios de adsorção com e sem a etapa de lavagem fornece dados referentes às hemiceluloses que não foram adsorvidas ou que foram fracamente adsorvidas à celulose, mas que foram removidas pela etapa de lavagem da polpa.

As cargas avaliadas para a xilana 4 variaram de 0,02 g a 1,0 g para 0,20 gramas de polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom (base seca) em 4 ml de NaOH (0,1 mM). O procedimento de adsorção foi feito como descrito anteriormente.

A adsorção foi expressa em porcentagem, pela diferença de massa de xilose entre a polpa tratada com as xilanas e a polpa controle, como demonstrado pela equação 4.

$$\text{Adsorção} = \frac{[\text{xilose (gramas) da polpa tratada com xilana} - \text{xilose (gramas) da polpa controle}]}{\text{xilose (gramas) da polpa controle}} \times 100 \quad (4)$$

4.8 Caracterização química dos bagaços e das polpas celulósicas “kraft” de eucalipto

O bagaço de cana de açúcar *in natura* e o pré-tratado com sulfito alcalino, assim como as polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marrom e deslignificada tratadas, foram caracterizadas quimicamente por via úmida, conforme descrito por Ferraz et al. (2000).

O bagaço foi seco em estufa a 30 °C e posteriormente moído (25 mesh) para a sua caracterização. Em seguida, transferiu-se 0,33 gramas (base seca) da amostra do bagaço seco moído para um tubo de ensaio em banho-maria à 30 °C. Adicionou-se 3 ml de H₂SO₄ a 72% ao tubo, agitou-se o conteúdo com auxílio de bastão de vidro a cada 15 minutos durante 60 minutos. Decorrido o tempo de hidrólise foram adicionados 82 ml de água destilada, agitou-se com auxílio de bastão de vidro, o tubo foi vedado com papel alumínio e levado à autoclave à 121 °C (1 Atm), por 60 minutos. Após, foi retirado da autoclave e, depois de esfriado, completado o volume com água destilada até a marca de 200 ml e agitado com auxílio de bastão de vidro até homogeneizar a mistura. Em seguida, o volume foi filtrado em cadinho de vidro com placa sinterizada n°3. O líquido filtrado foi analisado em espectrofotômetro para lignina solúvel em comprimento de onda de 205 nm. Os monômeros (glicose, xilose, arabinose e ácido acético) foram analisados por cromatografia líquida (HPLC) utilizando eluente H₂SO₄ a 0,005 mol/L, fluxo de 0,6 mL/min, detector de índice de refração a 35 °C e coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C. A massa retida no filtro de vidro sinterizado foi seca até massa constante e pesada para determinação de lignina insolúvel.

O teor de extrativos do bagaço foi determinado pela diferença de massa antes e após o processo de extração. Para isto, cerca de 1 g (massa seca) das amostras de bagaço moído (25 mesh) foi extraído em um aparelho Soxhlet com 95% de etanol por 6 horas.

Para a determinação do teor de cinzas, aproximadamente 1 g de bagaço foi pesado em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e tarados, e levados à mufla para calcinação na temperatura de 575 °C por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, o material calcinado foi quantificado por pesagem em balança. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de massa das amostras antes e depois da calcinação.

As polpas celulósicas “kraft”, marrom e deslignificada, após o tratamento, com e sem etapa de lavagem e com e sem adição de xilana, foram liofilizadas e sua composição química determinada conforme metodologia adaptada de Ferraz et al. (2000). Foi utilizado 0,20 g (base seca) de amostra, a qual foi transferida para um tubo de ensaio em banho-maria à 30 °C. Adicionou-se 1,81 ml de H₂SO₄ a 72% ao tubo, agitando-se com auxílio de bastão de vidro a cada 15 minutos durante 60 minutos. Decorrido o tempo de hidrólise foram adicionados 50 ml de água destilada, agitado com auxílio de bastão de vidro, vedado com papel alumínio e levado à autoclave à 121 °C, por 60 minutos. Após, foi retirado da autoclave e, depois de esfriado, completado o volume com água destilada até se obter 121 ml e agitado com auxílio de bastão de vidro até homogeneizar a mistura. Em seguida, o volume foi filtrado em cadinho de vidro com placa sinterizada n°3. Os monômeros (glicose, xilose, arabinose e ácido acético) foram analisados por cromatografia líquida (HPLC) utilizando-se eluente H₂SO₄ a 0,005 mol/L, fluxo de 0,6mL/min, detector de índice de refração a 35 °C e coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C.

4.9 Caracterização química das xilanas isoladas

A composição de carboidratos das xilanas foi determinada pela metodologia adaptada de Sluiter et al. (2008). As xilanas foram transformadas em monômeros pela hidrólise em meio ácido. Para isso, 0,02 g de xilana (base seca) foi diluído em 1 ml de água destilada e o pH determinado. Após a medição do pH foi adicionado um volume de ácido sulfúrico a 72% (tabelado), de forma a obter uma concentração final de 4% de H₂SO₄ em um volume final de 5 mL de reação. Feito isso, as amostras foram autoclavadas por 60 min a 120 °C. Como controle foram utilizados 5 ml de uma solução de xilose a 0,15 g/l, autoclavada nas mesmas condições descritas anteriormente e comparada com uma amostra de xilose 0,15 g/L não autoclavada. A degradação da xilose do controle aceita é de no máximo 5% para os resultados serem considerados. Os monômeros (xilose, arabinose e glicose) foram analisados por cromatografia líquida (HPLC) utilizando eluente H₂SO₄ a 0,005 mol/L, fluxo de 0,6mL/min, detector de índice de refração a 35 °C e coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C.

A partir das concentrações de (xilose + arabinose) em cada ensaio, foi determinada a concentração de arabinoxilana. Para isso foi utilizado o fator de conversão de xilose e arabinose em xilana (0,88).

A concentração de lignina foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV/Vis (GOUVEA et. al., 2009). As xilanas foram diluídas em solução de NaOH 0,01 M e pH 12. O cálculo da lignina foi realizado empregando-se a Equação 5.

$$AT = A * CO * C_{lig} \quad (5)$$

AT - absorbância da solução de lignina, em 280 nm;

A – Absortividade da lignina em meio alcalino = $23,7 \text{ (g/l)}^{-1} \text{cm}^{-1}$

CO – Caminho óptico = 1 cm

C_{lig} - concentração de lignina, em g/L;

4.10 Determinação dos ácidos hidroxicinâmicos

A concentração de ácidos fenólicos ou hidroxicinâmicos totais (ácido p-cumárico e ácido ferúlico) das amostras de xilanas extraídas do bagaço pré-tratado foram determinadas por dois métodos:

No primeiro método, as xilanas foram diluídas em solução de NaOH 0,01 M, pH 12 e foi feita uma varredura das amostras entre 200 e 360 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. A quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos foi feita pela medida de absorbância da solução a 315 nm e a concentração dos ácidos hidroxicinâmicos foi determinada através de uma curva de calibração.

A curva de calibração foi preparada a partir de soluções de ácido ferúlico e de ácido p-cumárico, ambas de 0,1 mg/ml, utilizadas para o preparo de uma série de diluições (1:10, 1:50, 1:100 e 1:200) em NaOH 0,01 M, pH 12 e os valores lidos a 315 nm.

No segundo método, pesou-se 300 mg (base seca) de xilana e adicionou-se 16 ml de NaOH 4 M e 2 mg de antraquinona em reatores (100 ml) de aço inoxidável 316 por 2 horas a 170 °C. A mistura obtida foi resfriada, acidificada com HCl 9 mol L⁻¹ até atingir pH 2 e o volume foi ajustado para 100 ml com água destilada, em um balão volumétrico. A solução foi estocada a 4 °C por 16 horas e posteriormente filtrada em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

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

4.11 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada para as polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marron e deslignificada, com e sem adição de xilanas extraídas do bagaço de cana.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento quimiotermomecânico do bagaço de cana-de-açúcar e sua composição química

O bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado visando diminuir a sua recalcitrância e possibilitar um melhor aproveitamento dos seus constituintes. O rendimento de sólidos após o pré-tratamento com 10% (m/m) Na_2SO_3 e 5% (m/m) NaOH, seguido do refino e lavagem foi de 73,6%. Tal rendimento foi muito semelhante ao obtido com outras amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas nas mesmas condições, com rendimentos de sólidos próximos a 74% (MENDES et al., 2011; MENDES et al., 2013; LAURITO-FRIEND et al., 2015).

A composição química dos bagaços antes e depois de pré-tratados encontra-se na Tabela 1. O bagaço *in natura* apresenta 22,4% de lignina, 42,3% de glucana, 20,4% de xilana, 1,9% de arabinosil, 2,7% de acetil e 5,6% de cinzas. Estes valores estão em conformidade com os reportados para bagaços de cana de diferentes procedências (KIM; DAY, 2011; GÁMEZ et al., 2006). Sanjúan et al. (2001) caracterizaram quimicamente bagaço de canas cultivadas no México e obtiveram resultados de 44,3% de glucana, 22,0% de xilana e 1,7 % de arabinosil. As variações entre bagaços podem ser atribuídas a fatores como a espécie de cana, o tempo de colheita, tipo de solo e alterações climáticas (MASARIN et al., 2011).

O pré-tratamento sulfito alcalino removeu 49,1% de lignina, 9,0% de glucana e 27,2% de hemicelulose. De fato, houve remoção de apenas 18,2% de arabinoxilana e o restante são grupos acetil que foram solubilizados no licor. Isto porque os grupamentos acetil ligados à xilana por ligações do tipo éster são completamente saponificados na condição do pré-tratamento.

O teor de cinzas do bagaço depois do pré-tratamento aumentou, provavelmente porque o procedimento de lavagem não deve ter sido suficiente para remover totalmente os produtos químicos empregados.

A remoção de lignina do bagaço foi semelhante ao reportado em outros trabalhos (MENDES et al., 2011, LAURITO-FRIEND et al., 2015; SPORCK et al., 2017), confirmando a seletividade do pré-tratamento sulfito alcalino, com deslignificações próximas a 50% (FENGEL; WEGENER, 1989; GELLERSTEDT, 2009; KOCH; PULS; BAUCH, 2003; MENDES et al., 2013).

Em relação aos polissacarídeos, houve maior solubilização da xilana em relação à glucana, o que se deve à menor massa molar, substituintes de acetil e ácido metil glucurônicos carregados negativamente e estrutura amorfa da xilana, que favorecem a sua dissolução (FENGEL; WEGENER, 1989; GOMES; CHIMPHANGO; GÖRGENS, 2015).

Se comparado com outros tipos de pré-tratamentos, o sulfito alcalino apresenta alto rendimento pela maior preservação de celulose e xilana, correspondentes a aproximadamente 65% dos sólidos (ZHU et al., 2009; YU et al., 2014; GAO et al., 2013). Estes carboidratos podem ser utilizados tanto na forma polimérica como monossacarídeos em diversas aplicações: na alimentação animal, na produção de combustível e na produção de géis hidrofílicos e edulcorantes (CANILHA et al., 2010; FELIPE et al., 1997; GRÖNHOLM; ERIKSSON; GARTENHOLM, 2004). Além disso, o pré-tratamento deixa a lignina residual sulfonada, tornando-se mais hidrofílica, o que favorece o inchamento das fibras devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio da matriz lignocelulósica e facilitando o acesso de enzimas (MENDES et al., 2011). Assim, a utilização das frações que compõem o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino pode ganhar uma perspectiva economicamente mais atrativa, considerando sua menor recalcitrância e seu alto conteúdo de carboidratos.

Tabela 1 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e após pré-tratamento quimiotermomecânico.

Bagaço de cana-de-açúcar	R ^a (g/100 g bagaço)	Extrativo (g/100 g bagaço)	Cinzas (g/100 g bagaço)	Composição de Bagaço (g/100 g em base polpa)					Composição de Bagaço (g/100 g em bagaço original)				
				Glucana	Lignina	Xilana	Arab	Acetil	Glucana	Lignina	Xilana	Arab	Acetil
<i>In natura</i>	100	2,0±0,4	5,6±0,1	42,3±0,5	22,4±0,7	20,4±0,4	1,9±0,3	2,7±0,1	-	-	-	-	-
Pré-tratado^b	73,6	0	10,5±0,2	48,2±2,6	14,2±0,4	21,4±1,4	1,4±0,3	0	38,5	11,4	17,1	1,1	0

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: a) Rendimento de sólidos após o pré-tratamento, corrigido com os respectivos teores de cinzas

b) Pré-tratamento quimiotermomecânico (10 % m/m Na₂SO₃ e 5% m/m NaOH), 121 °C, 2 h, relação sólido:líquido de 1:10

5.2 Extração enzimática, purificação e fracionamento das xilanas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecânicamente com sulfito alcalino

As arabinoxilanas presentes no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino foram extraídas utilizando xilanase comercial (Luminase) e carga de 5 UI/g bagaço, tendo como base os estudos realizados por Sporck et al. (2017) e Reinoso (2017). Segundo os resultados obtidos por Reinoso (2017), o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino por 6 h com a carga de 5 UI/g bagaço foi de 18%. Quando a reação foi estendida para 24 h o rendimento de extração de xilana chegou a 30%. Por outro lado, Brienzo (2010) analisou os produtos de reação de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar e reportou a presença de xilopentaose (X5) e xilotetraose (X4) logo no início da reação, alcançando a maior concentração em 6 horas. Xilopentaose foi totalmente convertida em outros produtos após 24 horas e X4 apareceu somente até 6 horas, em concentrações inferiores a X5. Portanto, neste estudo a extração de xilana foi conduzida por 6 horas, com o objetivo de se obter xilanas com maior grau de polimerização (DP) e por 24 horas para a obtenção de maior rendimento de extração.

As composições químicas dos hidrolisados das reações de extração enzimática do bagaço de cana pré-tratado estão demonstradas na Tabela 2. Após a reação do bagaço pré-tratado com a xilanase (5 U xilanase/g) por 6 e 24 horas os rendimentos de arabinoxilanas obtidos foram 14,5% e 27,9%, respectivamente. Os rendimentos de extração reproduziram os resultados obtidos por Reinoso (2017) nestas mesmas condições,

Tabela 2 - Composição química do hidrolisado da extração enzimática por 6 e 24 horas.

Amostra	RX ^a (%)	Concentração (g/L)			
		Xilana	Arab	Lignina	Glucana
6 horas	14,5	1,4±0,21	0,2±0,08	0,3±0,09	0,1±0,01
24 horas	27,9	2,8±0,12	0,3±0,09	0,7±0,08	0,2±0,02

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: a) Rendimento de arabinoxilana

As xilanas do bagaço pré-tratado, extraídas enzimaticamente por 6 horas, foram recuperadas por precipitação em gradientes de etanol, conforme descrito em outros estudos (SWENNEN et al., 2006; BIAN et al., 2010; PENG et al., 2009). As xilanas extraídas foram separadas em 3 frações, por adição de diferentes concentrações de etanol (Tabela 3). As xilanas 1 e 2 foram recuperadas após precipitação com 15% e 30 % de etanol (v/v),

respectivamente. Os rendimentos das xilanas 1 e 2 foram muito semelhantes, embora muito baixos. Os valores obtidos foram 2,62% para a xilana 1 e 2,76% para a xilana 2, determinados em relação ao rendimento total de xilanas extraídas em 6 horas. Como apenas 14,12% das xilanas presentes no bagaço de cana-de-açúcar foram extraídas pelo método enzimático e recuperadas por precipitação em etanol, a recuperação das xilanas foi de aproximadamente 5% pela precipitação com etanol de até 30% (v/v). Os baixos rendimentos obtidos indicam que o tamanho, estrutura ou a conformação das xilanas não favoreceu a sua precipitação. Vários estudos reportam que xilanas menos ramificadas e com maiores massas molares são mais insolúveis (SWENNEN et al., 2006, PENG et al., 2012).

Ambas as xilanas possuem ramificações de arabinose, sendo a xilana 2 um pouco mais substituída que a xilana 1. Portanto, um aumento na relação Ara/Xil para a fração de xilana precipitada com maior concentração de etanol esteja associado neste caso à sua estrutura mais ramificada. Maiores graus de substituição das xilanas diminuem a ocorrência de interações intermoleculares através das ligações de hidrogênio, entre os resíduos de xilose da cadeia principal, resultando em maior solubilidade (SAULNIER et al., 2007; PENG et al., 2012; SRNDOVIC, 2012).

O aumento na concentração de etanol para 60% (v/v) não resultou formação de precipitado, sendo que todo o volume de extrato foi submetido ao processo de rotoevaporação para eliminar o etanol e depois o material foi liofilizado para obtenção da xilana 3.

Tabela 3 - Composição química das xilanas extraídas por via enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.

Amostra	Tempo reação enzimática	Precipitação com etanol % (v/v)	RX (%) ^a	Fração (%) ^b	Composição das xilanas extraídas (% m/m)				Impurezas (%) ^d	Relação Ara/Xil
					Xilose	Arabinose	Glucana	Lignina ^c		
Xilana 1	6 horas	15	14,12	2,62	19±0,4	3±0,1	2±0,1	9	67	0,16
Xilana 2		30		2,76	27±3,8	5±0,5	2±0,3	5	61	0,19
Xilana 3		60 (sobrenadante)		94,62	16±1,8	2±0,3	1±0,1	4	77	0,13
Xilana 4	24 horas	-	26,11	-	14±0,4	2±0,1	1±0,1	4	80	0,14

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: a) Rendimento de xilana

b) Porcentagem de cada fração em relação a xilana total extraída em 6 horas.

c) Método espectrofotométrico

d) As impurezas foram determinadas subtraindo-se do valor total os valores de arabinoglucuronoxilanas (GAX) e lignina quantificada na amostra.

O restante das xilanas extraídas enzimaticamente em 6 horas compõem a xilana 3 (94,62 %), podendo-se concluir que o método enzimático produz majoritariamente xilanas de baixa massa molar que se acumulam em frações que não foram precipitadas nas concentrações de etanol e condições empregadas neste trabalho.

A xilana 3 é mais linear quando comparada às outras frações, pois enquanto as frações de xilanas 1 e 2 apresentaram uma relação arabinose:xilose de 0,16 e 0,19 respectivamente, a da xilana 3 foi de 0,13. Nesse caso, devem-se considerar outros fatores dificultando a precipitação, como por exemplo, o menor tamanho das xilanas e a concentração em solução (PENG et al., 2012).

Pode-se constatar a presença de lignina em todas as frações de xilana (Tabela 3). As ligações carboidrato-lignina são relativamente estáveis ao pré-tratamento, tornando o processo de se obter uma xilana pura, sem lignina, muito difícil (SJOSTROM, 1993; LAWOKO; HENRIKSSON; GELLERSTED, 2003; MASARIN et al., 2011). As principais formas de interação molecular entre as unidades condensadas da lignina com os carboidratos envolvem ligações éster e éter (JUNG; DEETZ, 1993; MASARIN et al., 2011). Pode-se observar na Tabela 3 que a xilana 1 apresentou o maior teor de lignina em sua composição do que as demais frações de xilanas extraídas.

Os resultados da extração do bagaço pré-tratado com xilanase comercial (luminase) por um tempo mais longo, de 24 horas, gerou uma amostra que foi concentrada integralmente, a qual se denominou de xilana 4 (Tabela 3). O fracionamento desta xilana com etanol não foi realizado por não considerar viável este procedimento, com base nas características das xilanas extraídas nesta condição. Sporck et. al. (2017) reportaram que a xilana extraída por 24 h com 8 UI luminase/g bagaço apresenta duas frações com baixas massas molares (2.900 g/mol e 540 g/mol), pouco prováveis de se precipitarem com 15%, 30% ou 60% (v/v) de etanol.

O rendimento de extração da xilana 4 foi 26,11% após secagem por liofilização, coerente com o maior tempo de reação empregado, enquanto o DS foi de 0,14. Sua composição se assemelha à da xilana 3 e ambas são as xilanas mais representativas entre as extraídas pelos métodos utilizados.

Os ácidos hidroxicinâmicos, p-cumárico e ferúlico, estão envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. A presença dos ácidos hidroxicinâmicos nas xilanas, extraídas do bagaço de cana, foi determinada pela absorbância a 315 nm e apenas nas xilanas 3 e 4 a análise foi feita também por cromatografia líquida. Deve-se ressaltar que

para as xilanas 1 e 2 não foi possível recuperar uma massa suficiente para realizar esta análise.

A concentração dos ácidos p-cumárico e ferúlico foi determinada em espectrofotômetro a 315 nm nas xilanas extraídas do bagaço pré-tratado. Os resultados do ácido p-cumárico para as xilanas 1, 2, 3 e 4 foram 0,21%; 0,08%; 0,52% e 0,72% (m/m), respectivamente. Quando os resultados foram correlacionados ao ácido ferúlico obteve-se 0,16%; 0,05%; 0,39% e 0,49% (m/m), respectivamente. Comparativamente, a concentração de ácidos hidroxicinâmicos foi menor para a xilana 2. O ácido p-cumárico determinado pelo método cromatográfico foi de 0,4% e 0,5% m/m, nas xilanas 3 e 4, respectivamente, enquanto que para o ácido ferúlico os valores corresponderam a 0,2% e 0,3% (m/m). Os resultados das análises do ácido p-cumárico foram mais próximos, com um coeficiente de variação de 18%, enquanto para o ácido ferúlico foi de 20%. Os dois métodos apresentaram, portanto, boa precisão nos resultados.

Não foram detectados grupos acetil nas amostras, pois esse componente já havia sido totalmente removido durante o pré-tratamento sulfito alcalino (Tabela 1).

Além da lignina, há uma alta concentração de compostos cuja natureza não faz parte da estrutura original do bagaço e que foram descritos como impurezas. Nestas podem ser incluídos os sais provenientes do tampão e também do pré-tratamento sulfito alcalino do bagaço. Enquanto as xilanas 1 e 2 possuem maiores concentrações de xilose (19% e 27%) e menores quantidades de impurezas (67% e 61%), a xilana 3 concentra a maior quantidade em massa de xilana do total extraído, mas também é a fração com mais impurezas (77%), como mostrado na Tabela 3. Isto sugere que o método de precipitação fracionada pode ser utilizado para promover a separação de xilanas com diferentes estruturas e purezas.

O conteúdo de impurezas da xilana 4 foi alto, correspondente a 80% do total de sólidos obtidos após a extração. Sporck et al. (2017) apresentaram um resultado semelhante para as xilanas extraídas com xilanases, também atribuído à presença de sais de fosfato que constituem o tampão da reação e à massa de proteínas utilizadas para a hidrólise enzimática. Além disto, pode se considerar também as cinzas provenientes do bagaço incluídos nos contaminantes destas xilanas, tendo em vista que o bagaço utilizado nesse estudo possuía altas quantidades de cinzas em sua composição.

Essas impurezas podem ser visualizadas nas fotos das xilanas mostradas na Figura 14. As xilanas 1 e 2 apresentaram uma coloração marrom mais escura, possivelmente pela maior presença de lignina (Tabela 3) que, dentre outros fatores, pode ser responsável pelo escurecimento da amostra (HOLIK, 2006). O aspecto mais claro das xilanas 3 e 4 se deve

principalmente pela presença de alta concentração de fosfato de sódio, que apresentam coloração mais clara e foram recuperados em conjunto com estas xilanas.

Figura 14 - Aspecto visual das xilanas isoladas por xilanases.

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: a) extração em 6 horas e precipitação em 15% etanol (v/v);
b) extração em 6 horas e precipitação em 30% etanol (v/v);
c) extração em 6 horas e sobrenadante da precipitação em 60% etanol (v/v)
d) extração em 24 horas sem fracionamento em gradientes de etanol.

5.3 Determinação da massa molar das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar

A distribuição das massas molares de cada xilana encontra-se apresentada na Figura 15 e os resultados em massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Massa molar ponderal média (Mw), massa molar numérica média (Mn), dispersividade (Đ) e grau de substituição (DS) das xilanas extraídas com xilanases a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Tempo reação enzimática	Fracionamento por gradientes de Etanol (v/v)	Amostra	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Đ	DS (A:X)
6 h	15%	Xilana 1	34.180	32.820	1,04	1:6
	30%	Xilana 2	28.130	25.610	1,10	1:5
	60% (sobrenadante)	Xilana 3	2.980	2.890	1,03	1:8
24 h	-	Xilana 4	9.450	3.660	2,57	1:7

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: As massas das xilanas foram determinadas a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular.

A xilana 1, precipitada com 15% (v/v) de etanol, é composta por xilanas grandes e apresenta baixa dispersividade, possuindo em sua maioria xilanas de massas molares entre 19.000 g/mol e 40.000 g/mol, porém também apresentou pequenas quantidades de xilanas maiores que 40.000 g/mol (Figura 15). A massa molar numérica média (Mn) foi de 32.820 g/mol enquanto que a massa molar ponderal média (Mw) foi de 34.180 g/mol (Tabela 4).

A xilana 2, recuperada com 30% (v/v) de etanol, apresentou xilanas com massas molares maiores que 10.000 g/mol (Figura 15) e baixa dispersividade. A massa molar numérica média (Mn) foi de 25.610 g/mol, enquanto que a massa molar ponderal média (Mw) foi de 28.130 g/mol (Tabela 4).

A xilana 3 apresentou massa molar menor que 6.000 g/mol (Figura 15) e com baixa dispersividade. A massa molar numérica média (Mn) foi de 2.890 g/mol enquanto que a massa molar ponderal média (Mw) foi de 2.980 g/mol (Tabela 4).

A xilana 4, obtida pela extração enzimática em 24 horas de reação, não foi submetida ao fracionamento em gradientes de etanol e se mostrou bastante heterogênea em relação à sua distribuição de massas molares, apresentando alta dispersividade (Tabela 4). Na xilana 4 estavam presentes xilanas de massas molares superiores a 20.000 g/mol (Figura 15), porém observou-se a presença majoritária de xilanas pequenas, com massa molar numérica média (Mn) de 3.660 g/mol enquanto que a massa molar ponderal média (Mw) foi de 9.450 g/mol. Mw é bastante sensível às espécies de massas molares elevadas, enquanto Mn é influenciado muito mais pela quantidade de moléculas. Estes resultados corroboram os obtidos por Sporck et al. (2017) em que foram eluídas xilanas de massa molar numérica média (Mn) de 2.900 g/mol, utilizando-se do mesmo método de extração enzimática e de determinação da massa molar (permeação em gel). Observa-se que a massa da xilana foi um pouco menor que a

obtida neste trabalho, diferença atribuída ao uso de uma carga de xilanase um pouco maior (8 UI xilanase/g).

As xilanas extraídas apresentaram um perfil de eluição cromatográfico semelhante às xilanas isoladas do bagaço de cana-de-açúcar por métodos alcalinos e posteriormente hidrolisadas com xilanas (VÁZQUEZ et al., 2000; CARVALHO et al., 2013). Observa-se uma fração de xilana que não é facilmente degradada e que apresenta uma alta massa molar, mas a maior parte é hidrolisada a oligômeros com grau de polimerização (DP) menor ou igual a 20.

Figura 15 - Distribuição em massas molares aparentes das xilanas isoladas do bagaço pelo método enzimático, obtida a partir de análise por cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P-30.

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: As xilanas foram extraídas com 5 UI/g de xilanase comercial (Luminase) em pH 8, a 50° C.
 As xilanas 1 e 2 foram recuperadas após a precipitação com 15% e 30% em etanol (v/v), respectivamente a partir da reação conduzida por 6 horas.
 A xilana 3 foi recuperada após aumentar o gradiente de etanol para 60% v/v e concentração por rotoevaporação e liofilização.
 A xilana 4 foi recuperada por liofilização dos produtos de reação enzimática conduzida por 24 h.

As xilanas, extraídas do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino por método enzimático, apresentaram baixas massas molares quando comparados com outros métodos de extração e outras biomassas. Köhnke et al. (2008) isolaram xilanas de casca de cevada (*Hordeum vulgare*) usando o processo de deslignificação com clorito e

extração alcalina. A fração GAX isolada apresentou uma massa molar média de 20.200 g/mol. Chimphango, Görgens e Van Zyl (2016) utilizaram de métodos alcalinos brandos para a extração das xilanas de bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram uma massa molar média de 20.100 g/mol.

Em relação ao fracionamento das xilanas promovido pela precipitação em gradientes de etanol, observa-se sobreposição na distribuição de massas molares entre a xilana 1 e a xilana 2 (Figura 15). Nestas frações, observa-se que em geral xilanas macromoleculares e mais lineares são precipitadas predominantemente em concentrações de etanol relativamente menores, enquanto que mais xilanas mais ramificadas e com massas molares mais baixas são recuperadas em maiores concentrações de etanol (BIAN et al., 2010). Esse comportamento já havia sido descrito por Swennen et al. (2006) quando realizaram a precipitação em gradiente de etanol de oligossacarídeos de arabinoxilanas extraídas enzimaticamente de farelo de trigo, mostrando que o grau e o padrão de substituição também influenciam o comportamento de precipitação, podendo ser este o fator principal que afetou a precipitação das xilanas 1 e 2 em diferentes gradientes de etanol, apesar de ambas possuírem uma parte de seu conteúdo de xilanas com a mesma massa molar. Neste estudo foi sugerido que uma longa sequência de resíduos de xilose não substituídos permite que as moléculas se associem e precipitem em menores concentrações de etanol. No caso da xilana 2, em geral os resultados confirmam que o aumento da concentração de etanol proporcionou a precipitação de oligossacarídeos menores e com maior substituição, quando comparado à xilana 1.

Na adição de 60% (v/v) de etanol não houve precipitação, apesar de serem xilanas mais lineares, o fator determinante para não ocorrência de precipitação provavelmente foi à baixa massa molar das xilanas residuais no sobrenadante. Neste caso seria necessário um aumento expressivo na concentração de etanol para que fosse possível se realizar a precipitação destas xilanas. Swennen et al. (2006) utilizou em seu estudo valores de etanol de 60 à 90% (v/v) para a precipitação das xilanas de massas molares menores que 5900 g/mol.

5.4 Adsorção das frações de xilanas à polpa celulósica “kraft” de eucalipto

A adsorção de xilanas em polpas de celulose foi determinada quimicamente através da diferença percentual entre a quantidade de xilose original da polpa (controle) e a quantidade de xilose após a adição de xilana e lavagem da polpa.

5.4.1 Deposição de xilanas na polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom

A Figura 16 apresenta o percentual de xilose na polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom sem adição de xilana (controle) e após o tratamento da polpa com as diferentes amostras de xilanas isoladas do bagaço. Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para todos os tratamentos e o controle (Tabela 5).

Figura 16 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para os tratamentos com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom.

Análise de variância	% Xilose	
GL resíduo	10	
F tratamentos	118,83	*
Média geral	15,63	
Desvio-padrão	0,07	
DMS (5%)	0,20	
CV (%)	0,47	
Teste de Tukey a 5%:		
Xilana 1	15,32	b
Xilana 2	15,50	b
Xilana 3	16,12	a
Xilana 4	16,10	a
Controle	15,11	c

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: *: Nível de significância 1%

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

Houve diferenças significativas em todos os tratamentos com relação ao controle (Tabela 5), portanto houve incremento de xilose à polpa celulósica pelo processo de adsorção nessas condições utilizando as frações de xilanas extraídas durante o estudo.

Os resultados mostram um pequeno aumento no percentual de xilose na polpa, sendo que os maiores incrementos foram obtidos com as xilanas 3 e 4, que não apresentaram diferenças significativas entre si. As polpas celulósicas tratadas com tais xilanas apresentaram valores próximos de xilose na sua composição (16,12% e 16,10%, respectivamente), visto que ambas xilanas apresentam características semelhantes, como baixa massa molar e menor grau de substituição. Xilanas com tais características tendem a se fixar umas às outras, formando agregados maiores que se depositam em grande quantidade na polpa celulósica. Esse fenômeno de agregação de xilanas pouco substituídas foi anteriormente reportado por Andrewartha, Phillips e Stone (1979).

Por outro lado, as polpas tratadas com as xilanas 1 e 2 apresentam percentuais de xilose muito próximos entre si (15,32% e 15,50%, respectivamente), sem diferenças significativas entre ambas e apenas um pouco superior à da polpa controle (15,11%). Destaca-se que estas xilanas, apesar de possuírem altas massas molares, também são as mais substituídas. Aparentemente, a presença de ramificações nas xilanas faz com que o processo

de adsorção não ocorra ou ocorra com interações muito fracas, que não resistem à posterior etapa de lavagem da polpa.

Com a metodologia de análise utilizada não é possível determinar o padrão de substituição das xilanas utilizadas, apenas o seu grau de substituição (DS), conforme reportado na Tabela 4. O conhecimento do padrão de substituição da xilana poderia ser uma informação importante para avaliar a sua capacidade de adsorção. Segundo os resultados de Kabel et al. (2007), são necessárias pelo menos 15 unidades de xilose não substituídas para que ocorra a adsorção de xilanas em celulose bacteriana. Como as xilanas 1 e 2 apresentam em média 1 arabinose para cada 6 xiloses, pode-se inferir que elas não possuem a quantidade de xiloses não substituídas necessárias para que ocorra a adsorção.

A Figura 17 mostra os resultados de xilose na polpa antes e após a etapa de lavagem. Esses dados permitem comparar a adsorção máxima (sem a etapa de lavagem) e a real de cada fração de xilana utilizada. A xilose adsorvida foi expressa em porcentagem, através da diferença de massa de xilose entre a polpa tratada com as xilanas e a polpa controle.

Figura 17 - Comparação entre os valores de adsorção real e adsorção teórica (sem etapa de lavagem) de hemicelulose na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo Pessoal

O tratamento com a xilana 2 mostrou a maior diferença entre o máximo teórico (27,66%) e o real de adsorção (2,58%). Este resultado foi atribuído ao fato dessa fração ser a que possui maior quantidade de arabinose, portanto a maior quantidade de ramificações pode ter dificultado uma adsorção eficiente desta fração de xilana à celulose. Fisicamente, a presença de cadeias de xilanas mais ramificadas diminuem pontos de interseção entre as cadeias, que segundo Kabel et al. (2007) causa maior dificuldade de precipitação.

A xilana 1 foi a que mostrou menor adsorção real (1,42%), pois esta fração, além de ser bastante ramificada, também possui menos xilose disponível para adsorção, quando comparada a xilana 2. Esta xilana, assim como a xilana 2, também mostrou uma grande diferença entre a adsorção real e a adsorção máxima (25,09%).

Tanto a xilana 3 como a xilana 4 apresentam xilanas de pequena massa molar e menos ramificadas. A xilana 3 apresentou o maior valor de adsorção real (6,69%), podendo se destacar que esta fração possui mais xilose em sua composição que a xilana 4. Pode-se evidenciar que a xilana 4 teve um comportamento diferente das demais xilanas, mostrando-se mais eficiente em adsorver a quantidade de xilose disponível em sua fração, tendo assim uma menor diferença entre a adsorção teórica (14,99%) e a real (6,55%).

5.4.2 Deposição de xilanas na polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificado

A Figura 18 refere-se à composição da polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificado após o tratamento com as diferentes xilanas isoladas do bagaço. Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para todos os tratamentos e o controle (Tabela 6).

Figura 18 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de eucalipto deslignificado, após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) para os tratamentos com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto deslignificada.

Análise de variância	% Xilana	
GL resíduo	10	
F tratamentos	16,07	*
Média geral	14,57	
Desvio-padrão	0,34	
DMS (5%)	0,91	
CV (%)	2,32	
Teste de Tukey a 5%:		
Xilana 1	14,00	c
Xilana 2	14,39	bc
Xilana 3	15,24	ab
Xilana 4	15,51	a
Controle	13,70	c

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: *: Nível de significância 1%

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

Na polpa deslignificada, não houve diferenças significativas entre os tratamentos com as Xilanas 1 e 2 em relação ao controle (Tabela 6). A polpa tratada com a xilana 1 foi a com menor percentual de xilose (14,00%), seguido da xilana 2 (14,39%), valores um pouco maiores que o percentual de xilose da polpa controle (13,70%).

Os resultados mostram que as xilanas 3 e 4 foram as que mais se adsorveram à polpa, apresentando valores muito próximos de xilose na sua composição (15,24% e 15,51%), respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si.

A comparação entre a adsorção máxima de xilana na polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificada (sem a etapa de lavagem) e a real revela que o tratamento com as xilanas 1 e 2 apresentam grandes diferenças entre o máximo teórico e o real de adsorção (Figura 19). Este resultado era esperado, pois reproduziu o que ocorreu nos ensaios de adsorção da xilana à polpa marrom, como resultado do alto grau de substituição destas xilanas.

Figura 19 - Comparação entre os valores de adsorção real e adsorção teórica (sem etapa de lavagem) de hemicelulose na polpa de celulose “kraft” de Eucalipto deslignificado após tratamento com as xilanas extraídas com xilanase do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo Pessoal

A xilana 1 foi a que mostrou menor adsorção real (2,21%), pois esta fração além de ser bastante ramificada também possui menos xilose disponível para adsorção, quando comparada a xilana 2. Este trabalho corrobora com outros que demonstraram que o nível de interação xilano-celulose depende em sua maioria da estrutura do xilano (KABEL et al., 2007; KÖHNKE et al., 2008; MUGUET et al., 2011).

Em geral, a adsorção das xilanas na polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificado teve melhor desempenho do que a polpa celulósica “kraft” de eucalipto marrom, resultado que pode indicar que a presença de lignina na polpa age negativamente a adsorção da xilana. A diferença entre os resultados pode ser atribuída às forças repulsivas mais fortes que podem ocorrer entre xilana e lignina residual (MILETZKY et al., 2015), dificultando o agrupamento xilanas-xilanas e a adsorção de xilanas às fibras.

O teor de impurezas das xilanas também pode estar afetando a adsorção às polpas celulósicas, considerando que as impurezas podem alterar a força iônica da solução. Dependendo da concentração iônica, as impurezas destas xilanas podem ter contribuído positivamente para a adsorção pela diminuição da solubilidade das xilanas, o que evita de se adicionar mais uma etapa para retirada dessas impurezas antes do processo de adsorção e considerando que estas serão eliminadas pela etapa de lavagem. Essa característica foi demonstrada no trabalho feito por Köhnke et al. (2009) utilizando altas concentrações salinas. As arabinoglucuronoxilanas (GAX) com menores cargas eletrostáticas aumentaram sua adsorção à celulose em alta força iônica, o que poderia ser um efeito da diminuição da solubilidade das GAX.

A maior adsorção à polpa celulósica “kraft” deslignificada foi observada com a xilana 4 (Figura 19). A adsorção de xilana de baixa massa molar e menos substituídas pode apresentar vantagens no processo de fabricação de papel. Barbosa et al. (2016), ao compararem a adsorção de xilanas extraídas de polpas de eucalipto branqueada e marrom, mostraram que as xilanas extraídas da polpa branqueadas, que eram de baixa massa molar e menos substituídas que as xilanas extraídas da polpa marrom, se adsorveram melhor às fibras, resistindo mais à etapa de branqueamento e às forças mecânicas durante o refino. Além disto, Danielsson e Lindström (2009), avaliando a adsorção de xilanas de licores negros e sua influência nas propriedades do papel produzido, verificaram que em cozimentos com adições dos licores negros contendo xilana de menor massa molar e menor grau de substituição são produzidas polpas superiores em resistência à tração. Por sua vez, adição de licor negro contendo xilana com maior grau de substituição e maior massa molar produziu polpas de resistência inferior quando comparada a dada densidade de folha.

Analisando os dados das características das xilanas (Tabela 4) juntamente com os resultados da adsorção (Figuras 17 e 19) observa-se que o grau de substituição das xilanas (DS) foi muito relevante para a adsorção de xilanas à polpa celulósica. Xilana com baixo DS pode se agregar mais facilmente e constituir moléculas maiores que xilanas com DS mais alto. Agregados grandes deverão permanecer na superfície das fibras celulósicas e contribuir para maior área de contato ou uniões mais fortes entre as fibras (DANIELSSON; LINDSTRÖM, 2009).

Os trabalhos de Köhnke et al. (2008) e de Kabel et al. (2007) são mais uma evidência que a adsorção ocorre para xilanas de baixa substituição (proporção de arabinose para xilose de 0,10) a celulose. Ambos autores chegaram a essa conclusão analisando o aumento em carboidratos nas fibras após a adsorção, em função da estrutura da xilana. Resultado semelhante com o que foi obtido neste estudo, sendo as xilanas 3 e 4 com o grau de substituição mais próximo do valor referenciado por Köhnke et al. (2008) e Kabel et al. (2007), possibilitando o uso da extração enzimática de xilanas para a redeposição em polpa celulósica como alternativa às extrações por métodos químicos.

Vários estudos de adsorção de xilanas a fibras celulósicas têm sido realizados com fibras branqueadas. De fato, a adsorção de xilanas foi maior neste tipo de polpa que na polpa marrom. Porém, essa tecnologia seria de difícil implementação industrial, pois raramente as xilanas são extraídas puras e o procedimento de purificação encareceria muito o produto. Para contornar esta dificuldade, Muguet et al. (2011) propuseram como alternativa a adsorção de xilana à polpa marrom, durante a etapa de deslignificação com oxigênio. Os resultados deste estudo mostraram que as xilanas foram completamente estáveis ao branqueamento e refino das polpas. Além disto, as xilanas depositadas passam por um processo de branqueamento nos estágios subsequentes e, por isso, os traços de lignina ligados quimicamente às xilanas são removidos, não causando problemas de amarelecimento da polpa.

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

A Figura 20 mostra o espectro infravermelho para as polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marrom após tratamento com as xilanas. Como referência para esta análise, a Tabela 7 apresenta as principais atribuições para as bandas de absorção no infravermelho características das xilanas. A linha base foi corrigida em regiões próximas a 4000, 2400 e 800 cm^{-1} , e o espectro foi normalizado em 1050 cm^{-1} .

Os espectros de hemiceluloses extraídas de materiais lignocelulósicos serviram de parâmetro para realizar esta análise (SPORCK et al., 2017; EBRINGEROVÁ et al., 1992; XU et al., 2006; PENG et al., 2009; BURANOV; MAZZA, 2010; BIAN et al., 2012; SUKHBAATAR et al., 2014)

Tabela 7 - Principais atribuições para as absorções no infravermelho de xilanas.

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

Fonte: Sporck et al. (2017)

Na Figura 20, a absorção a 895 cm⁻¹ é referente ao estiramento e deformação das ligações C-O-C, C-C-O e C-CH que, no caso das hemiceluloses, refere-se às ligações β-glicosídicas entre as xilanopiranoses da cadeia principal. As bandas entre 1175 e 1000 cm⁻¹ refletem o estiramento das ligações C-O, C-C, C-OH e C-O-C. Estas bandas estão presentes em todas as xilanas e com maior absorção nas xilanas 3 e 4, que foram os tratamentos com maior adsorção à polpa celulósica. Porém, verifica-se menor absorbância para a polpa com tratamento com a xilana 2, inclusive menor que a polpa controle. As absorbâncias a 987 e 1065 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C-O-C, C-OH e C-H presentes em anéis glicosídicos e grupos laterais, correspondendo nas hemiceluloses aos grupos arabinosil. A xilana 2 também apresenta a menor absorbância nesta banda, provavelmente por ser uma xilana mais ramificada e não ter se adsorvido na polpa, sendo removida na etapa de lavagem.

Figura 20 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das polpas celulósicas “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com as xilanas.

Fonte: Arquivo Pessoal

A banda em 1511 cm^{-1} refere-se ao estiramento de ligações $\text{C}=\text{C}$ presentes em anéis aromáticos, que representam pequenas quantidades de lignina presente nas xilanas, correspondente à oxidação do nitrobenzeno. Neste caso, a lignina se encontra ligada à xilana, sendo a xilana 3 a que mais se adsorveu, também foi a que adicionou mais lignina à polpa, enquanto que as xilanas 1 e 4 não aparentam ter elevado o conteúdo de lignina e para a xilana 2 foi visto um decréscimo comparado a polpa controle. A banda em 1735 cm^{-1} se refere à vibração de estiramento de ligações do tipo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), presentes nos ácidos glucurônicos e nos ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e cumárico), não houve diferenças significativas visto que estes compostos se encontram em baixas concentrações nestas xilanas.

Estes resultados reafirmam a maior adsorção das xilanas 3 e 4, porém o resultado da xilana 2 é inferior ao que foi visto até o momento.

Figura 21 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das polpas celulósicas “kraft” de eucalipto deslignificado após tratamento com as xilanas.

Fonte: Arquivo Pessoal

Na Figura 21 o espectro refere-se ao tratamento das xilanas à polpa celulósica “kraft” de eucalipto deslignificada. A absorção a 895 cm^{-1} e nas bandas entre 1175 e 1000 cm^{-1} tiveram maiores valores para os tratamentos com a xilana 3 seguida da xilana 4 e a menor absorbância para a polpa com tratamento com a xilana 2. As absorbâncias a 987 e 1065 cm^{-1} , que correspondem aos grupos arabinosil, também apresentam a xilana 2 com a menor absorbância, como ocorreu com a polpa marrom. Na banda em 1511 cm^{-1} (anéis aromáticos) houve um grande incremento nos tratamentos com as xilana 3 e xilana 4, atribuída à lignina que se encontra ligada à xilana, enquanto que na xilana 2 também foi visto um decréscimo dessa banda comparado à polpa controle. A banda em 1735 cm^{-1} (ácidos glucurônicos e ácidos hidroxicinâmicos) apresentou neste caso um incremento para as polpas tratadas com as xilanas 3 e 4, diferente do que foi visto para a polpa marrom. Os resultados para a polpa celulósica “kraft” deslignificada apresentaram espectros mais diferenciados entre a polpa controle e os tratamentos com as xilanas do que foi verificado para a polpa celulósica “kraft”

marrom. Como já foi dito, esta polpa apresentou melhores condições para a adsorção e o FT-IR reafirmou estes resultados.

5.4.4 Efeito da concentração de xilana na adsorção as fibras

Foi feito um experimento de adsorção de xilana à polpa celulósica “kraft” marrom variando-se a carga de xilana no tratamento. Para este estudo foi utilizada a xilana 4, que apresentou a maior eficiência de adsorção, a fim de se verificar se o aumento da carga de xilana afetaria a adsorção à polpa. Os resultados referentes à porcentagem de xilose na composição das polpas tratadas com xilana estão apresentados na Figura 22 e a porcentagem de xilose adsorvida na Tabela 8.

Figura 22 - Percentual de xilose na composição total da polpa de celulose “kraft” de Eucalipto marrom após tratamento com variação da quantidade utilizada da Xilana 4.

Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 8 - Percentual de xilose adsorvida nas polpas celulósicas “kraft” de eucalipto marron após tratamento com diferentes cargas de Xilana 4.

Xilana adicionada (g/g de polpa)	Xilose adsorvida (% m/m) ^a
0,1	6,55
0,25	8,52
0,5	18,55
2,5	43,47
5	139,28

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: a) Aumento de xilose em relação a polpa controle com conteúdo original de 0,03 g de xilose.

Constata-se que o aumento da carga de xilana em solução aumenta a quantidade adsorvida durante o tratamento. Ban e Van Heiningen (2011) concluíram que a proporção de extratos de hemicelulose em relação a fibra é um fator importante no processo de adsorção de hemicelulose. Uma explicação pode ser a interação fraca entre as fibras celulósicas e as xilanas, em que o aumento da concentração de xilanas aumenta o contato interativo e, assim, melhoram a adsorção. Por outro lado, nesse caso observou-se um efeito não linear de adsorção, sendo que um aumento crescente na carga de xilana não resultou um aumento proporcional de adsorção.

Este resultado pode ser explicado pela teoria proposta por Vincken et al. (1995), em que na maior concentração de xilana, um novo equilíbrio de adsorção resulta em mais xilana adsorvendo na celulose. Nos casos de frações de xilana poliméricas, a adsorção ocorre em pontos na superfície da celulose e então a adsorção limita-se à área superficial disponível, quando esgotada esta área o aumento de concentração da solução de xilana não causará aumento no rendimento de adsorção. Neste caso, possivelmente as frações de xilana de pequena massa molar em concentrações mais elevadas poderiam estar adsorvendo em pequenos poros presentes à superfície da polpa de celulose, fazendo a área disponível para que ocorra a adsorção aumentar exponencialmente, possibilitando também um aumento expressivo no rendimento de adsorção pelo aumento da concentração da solução de xilana.

6 CONCLUSÃO

O pré-tratamento sulfito alcalino produziu uma polpa com alto rendimento de sólidos e se mostrou bastante seletivo na remoção de lignina e preservação dos polissacarídeos das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

A extração enzimática de xilana em 6 horas gerou produtos com maior grau de polimerização porém com baixo rendimento, enquanto na reação por 24 horas os produtos foram de menor massa molar porém se alcançou um maior rendimento.

As xilanas extraídas enzimaticamente do bagaço de cana-de-açúcar apresentaram uma grande variação nas massas molares. O fracionamento das xilanas, obtidas em 6 h de reação enzimática por gradientes de etanol, produziu 3 frações com massas molares médias de 34.180 g/mol, 28.980 g/mol e 2.980 g/mol. A reação enzimática em 24 horas extraiu xilanas com massas molares médias de 9.450 g/mol, porém com grande dispersividade.

As xilanas extraídas contêm impurezas, dentre elas a lignina que se encontra ligada covalentemente as xilanas, as cinzas que permaneceram mesmo após a lavagem do bagaço e os resíduos do tampão utilizado para a reação enzimática.

A precipitação fracionada foi eficiente na separação das xilanas, obtendo-se xilanas com diferentes massas molares e purezas variadas. De modo geral, xilanas com maiores massas molares e mais lineares precipitaram em menores concentrações de etanol, enquanto que xilanas menores e mais ramificadas precipitaram em maiores concentrações de etanol. Porém, esta tendência de precipitação pode mudar dependendo do padrão de substituição da xilana.

A adsorção de xilana em celulose ocorreu para xilanas de menor grau de substituição. A polpa celulósica “kraft” deslignificada foi mais apropriada para a adsorção de xilanas do que a polpa celulósica “kraft” marrom, resultado confirmado pelo FT-IR. O aumento de concentração da solução de xilanas aumentou a taxa de adsorção para xilanas de baixas massas molares, resultado muito atraente para aplicação de xilanas que são extraídas enzimaticamente.

É possível concluir que a extração enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente com sulfito alcalino produziu majoritariamente xilanas com baixas massas molares e pouco substituídas, características que favoreceram o processo de adsorção, podendo ser uma alternativa para redeposição de hemicelulose à polpa celulósica durante o processo de polpação.

REFERÊNCIAS

- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of Xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts processing**, v. 87, p. 145-151, 2009.
- ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In: STENIUS, P. (Ed.). **Forest products chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000. p. 12-57
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANDREWARTHA, K. A.; PHILLIPS, D. R.; STONE, B. A. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 77, p. 191-204, 1979.
- ANTAL M.; EBRINGEROVA A.; HROMADKOVA Z. Struktur und papiertechnische Eigenschaften von Aminoalkylxylanen. **Das Papier**, v. 51, n. 5, p. 223-226, 1997.
- ANTAL M.; EBRINGEROVA A.; MICKO M. M. Kationisierte Hemicellulosen aus Espenholzmehl und ihr Einsatz in der Papierherstellung. **Das Papier** v. 45, n. 5, p. 232-235, 1991.
- BACHNER, K.; FISCHER, K.; BÄUCKER, E. Zusammenhang zwischen aufbau der zellwand und festigkeitseigenschaften bei faserstoffen von konventionellen und neuen aufschlussverfahren. **Das Papier**, v.47, p. 30-40, 1993.
- BAN, W. P.; VAN HEININGEN, A. Adsorption of hemicellulose extracts from hardwood onto cellulosic fibers. 1. Effects of adsorption and optimization factors. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, p. 57-65, 2011.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; WALTON, J. D. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 22-36, 2010.
- BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J.S.; WALTON, JD. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p. 82-92, 2010.
- BARBOSA, B. M.; COLODETTE, J. L.; MUGUET, M. C. D. S.; GOMES, V. J.; OLIVEIRA, R. C. D. Efeitos da xilana na produção de celulose de eucalipto. **Cerne**, v. 22, n. 2, p. 207-214, 2016.
- BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 305-350, 2003.
- BHADURI, S. K.; GHOSH, I. N.; DEB SARKAR, N. L. Ramie hemicelluloses as beater additive in paper making from jute-stick kraft pulp. **Industrial Crops and Product**, v. 4, p. 79-84, 1995.

- BIAN, J.; PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 802-809, 2010.
- BIAN, J.; PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C.; KENNEDY J. F. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638-645, 2012.
- BIELY, P.; PUCHART, V.; STRINGER, M. A.; KROGH, K. B. R. M. Trichoderma reesei XYN VI – a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. **The Febs Journal**, v.281, n.17, p. 3894-3903, 2014.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n.7, p. 1260-1274, 2016.
- BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de pentoses e xilooligossacarídeos**. 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 17-25, 2010.
- BUSSE-WICHER, M.; GOMES, T. C. F.; TRYFONA, T.; NIKOLOVSKI, N.; STOTT, K.; GRANTHAM, N. J.; BOLAM, D. N.; SKAF, M. S.; DUPREE, P. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 79, p. 492-506, 2014.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE M. D.; SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84-92, 2010.
- CARA, C.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; CARVALHEIRO, F.; MOURA, P.; GÍRIO, F. Separation of olive tree pruning oligomers from liquid hot water hydrolyzates using preparative gel filtration chromatography. **New Biotechnology**, v. 25, p. S249, 2009.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.
- CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75-85, 2013.
- CERQUEIRA, D.A.; RODRIGUES, G.; MEIRELES C.D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 579-582, 2007.
- CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHIMPHANGO, A. F. A.; GÖRGENS, J.F.; VAN ZYL, W.H. In situ enzyme aided adsorption of soluble xylan biopolymers onto cellulosic material. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 172-178, 2016.

CHRISTOV, L. P.; PRIOR, B. A. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties and significance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 6, p. 460-475, 1993.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: Editora UNICAMP, 2005. 452 p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:
<<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safras/cana-serie-historica>>. Acesso em: 31 Maio 2018

DANIELSSON, S. **Xylan reactions in kraft cooking: process and product considerations**. 2007. 73 f. Doctoral Thesis (Department of Fiber and Polymer Technology) - KTH, Stockholm, Sweden, 2007.

DANIELSSON, S.; LINDSTRÖM, E. M. The effect of black liquor exchange in the kraft cook on the properties of Eucalyptus urograndis kraft pulp. **O Papel**, v. 70, p. 35 -50, 2009.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, AND F. SMITH. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; ALFÖLDI, J.; BERTH, G. Structural and solution properties of corn cob heteroxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 2, p. 99-105, 1992.

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

EKEBERG, D.; GRETLAND, K. S.; GUSTAFSSON, J.; BRÅTEN, S. M.; FREDHEIM, G.E. Characterisation of lignosulphonates and kraft lignin by hydrophobic interaction chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, p. 121-128, 2006.

FELIPE, M. D. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S.; Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 11-14, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1989. 613 p.

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

GÁMEZ, S; GONZALEZ-CABRIALES, J. J.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G., VAZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v.74, p. 78-88, 2006.

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

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

GATENHOLM, P; TENKANEN, M. **Hemicelluloses: science and technology**. New York: American Chemical Society, 2003. 388 p.

GELLERSTEDT, G. Chemistry of Chemical Pulp. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (Ed.). **Pulp and paper chemistry and technology: wood chemistry and wood biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG, 2009. p. 91, v.2.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-8000, 2010.

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

GOUVEIA, R.; NASCIMENTO, R. T. D.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GOVENDER, S. **Purification, application and immunolocalization of thermostable xylanases**. 2014. 181 f. Master of Technology (Biotechnology) - Durban University of Technology, Durban, South Africa, 2014.

GRÖNHOLM, M.; ERIKSSON, L.; GARTENHOLM, P. Material properties of plasticized hardwood xylans for potential application as oxygen barrier films. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1528-1535, 2004.

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

HAYASHI, T.; KAIDA, R. Hemicelluloses as recalcitrant components for saccharification in Wood. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to cellulosic ethanol**. New York, EUA: Springer, 2011. p. 45-52.

HEDJAZI, S.; KORDSACHIA, O.; PATT, R.; LATIBARI, A. J.; TSCHIRNER, U. Alkaline sulfite–anthraquinone (AS/AQ) pulping of wheat straw and totally chlorine free (TCF) bleaching of pulps. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 27-36, 2009.

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

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009. p. 121-146.

HENRIKSSON, G.; TEERI, T. Biotechnology in the forest industry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009. p. 273-300.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v.100, n.10, p. 2706-2711, 2009.

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

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

IOELOVICH, M.; IVULONOK, Z. Study of structure-strength relationship for cellulose fibers and films. **Wood Chemistry**, v. 4, p. 3-8, 1987.

IOELOVICH, M.; LEYKIN, A. Structural investigations of various cotton fibers and cotton celluloses. **BioResources**, v. 3, p. 170-177, 2008.

IRVINE, G. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 352, p. 387-397, 1997

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

KABEL, M. A.; CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; AVGERINOS, E.; KOUKIOS, E.; PARAJO, J. C.; GÍRIO, F. M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Hydrothermally treated xylan rich byproducts yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 47-56, 2002.

- KABEL, A.; VINCKEN, J.P.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 94-105, 2007.
- KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, n.7, p. 803-807, 2011.
- KOCH, G.; PULS, J.; BAUCH, J. Topochemical characterization of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). **Holzforschung**, v.57, p. 339-345, 2003.
- KÖHNKE, T.; BRELID, H.; WESTMAN, G. Adsorption of cationized barley husk xylan on kraft pulp fibres: influence of degree of cationization on adsorption characteristics. **Cellulose**, v. 16, n. 6, p. 1109-1121, 2009.
- KÖHNKE, T.; PUJOLRAS, C.; ROUBROEKS, J.P.; GATENHOLM, P. The effect of barley husk arabinoxylan adsorption on the properties of cellulose fibres. **Cellulose**, v. 15, n. 4, p. 537-546, 2008.
- LAURITO-FRIEND, D. F.; MENDES, F. M.; REINOSO, F. M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, 2015.
- LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. **Holzforschung**, v.60, p. 156-161, 2006.
- LI, J.; KISARA, K.; DANIELSSON, S.; LINDSTRÖM, M. E.; GELLERSTEDT, G. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 11, p. 1442–1449, 2007.
- LINDER, A.; BERGMAN, R.; BODIN, A.; GATENHOLM, P. Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. **Langmuir**, v.19, p. 5072-5077, 2003.
- LINO, A. G. **Aproveitamento de xilanas de licores negros para melhoria do rendimento e de qualidade de polpa kraft branqueada**. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2011.
- LONGUE, D.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. **Ciência Florestal**, v.21, p. 541-550, 2011.
- MANFREDI, M.; OLIVEIRA, R. C. Aplicação de tratamento ultrassônico da polpa e adição de xilanas na indústria de fibras secundária. In: Encontro Nacional da TECNICELPA / VI CIADICYP, 21., 2010, Lisboa. **Anais...** Lisboa: TECNICELPA, 2010. 1 CD-ROM.

- 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. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, p. 55, 2011.
- MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A. AND MILAGRES, A. M. F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395-401, 2011.
- MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 890-895, 2013.
- MILETZKY, A.; PUNZ, M.; ZANKEL, A.; SCHLADER, S.; CZIBULA, C.; GANSER, C.; TEICHERT, C.; SPIRK, S.; ZO'HRER, S.; BAUER, W.; SCHENNACH, R. Modifying Cellulose Fibers by Adsorption/ Precipitation of Xylan. **Cellulose**, v. 22, p. 189-201, 2015.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MUGUET, M. C. D. S.; PEDRAZZI C.; COLODETTE J. L. Xylan deposition onto eucalypt pulp fibers during oxygen delignification. **Holzforschung**, v. 65, p. 605-612, 2011.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 20-28, 2007.
- PALM, M.; ZACCHI, G. Separation of hemicellulosic oligomers from steam treated spruce wood using gel filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 36, p. 191-201, 2004
- PEDRAZZI, C.; COLODETTE, J. L.; GOMIDE, J. L.; OLIVEIRA, R. C.; MUGUET, M. C. D. S. Influência do processo de polpação e do conteúdo de xilanas da polpa na branqueabilidade. **O Papel**, v. 72, n. 5, p. 37-55, 2011.
- PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p. 6305-6317, 2009.
- PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 879-903, 2012.

PENG, X. W.; REN, J. L.; SUN, R. C.; Homogeneous esterification of xylan-rich hemicelluloses with maleic anhydride in ionic liquid. **Biomacromolecules**, v.11, n. 12, p. 3519–3524, 2010.

PENG, J. L.; REN, L.; ZHONG, X.; PENG, F.; SUN, R. C. Xylan-rich hemicelluloses-graft-acrylic acid ionic hydrogels with rapid responses to pH, salt, and organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 8208-8215, 2011.

PITARELO, A. P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.35, p.1-8, 2012.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

REINOSO, F.A. **Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, extração enzimática da hemicelulose e sacarificação dos polissacarídeos residuais**. 2017. 153 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

REN J. L.; PENG, F.; SUN, R. C.; KENNEDY, J. F. Influence of hemicellulosic derivatives on the sulfate kraft pulp strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 338-342, 2009.

ROCHA, M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇAVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

ROWELL, M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. CRC Press, 2005. 487 p.

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

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANJÚAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pitch and fiber from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und weskstoff**, v. 59, p. 447-450, 2001

SANT'ANNA, C.; COSTA, T. L.; ABUD, Y.; BIANCATTO, L.; MIGUENS, F.C.; DE SOUZA, W. Sugarcane cell wall structure and lignina distribution investigated by confocal and electron microscopy. **Microscopy Research & Technique**, v. 76, p. 829-834, 2013.

SANTOS, S.; SANSÍGOLO, C. A. Influência da densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na qualidade da polpa branqueada. **Ciência Florestal**, v. 7, n. 1, p. 53-63, 2007

SARBU, A.; GONÇALVES, F.; PINHO, M. N. Oat spelts xylan molecular mass estimation by size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 297-304, 2003.

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

SCHOONEVELD-BERGAMNS, M. E. F., BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural features of (Glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 63-75, 1999.

SILVA, T.C.F.; COLODETTE, J.L.; LUCIA, L.A.; OLIVEIRA, R.C.D.; OLIVEIRA, F.N.; SILVA, L.H.M. Adsorption of chemically modified xylans on eucalyptus pulp and its effect on the pulp physical properties. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 50, p. 1138-1145, 2011.

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

SIXTA, H. **Handbook of pulp**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2006. 1316 p.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. San Diego: Academic press, 1993. 293 p.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Laboratory Analytical Procedure (LAP). **National Renewable Energy Laboratory**. Technical Report, p. 14, 2008.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 205-218, 2003.

SPORCK, D.; REINOSO, F. A. M.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; RIO, J. C. D.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 296, 2017.

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

STRIEGEL, A.; YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D.; **Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 496 p.

SUKHBAATAR, B.; HASSAN, E. I. B.; KIM, M.; STEELE, P.; INGRAM, L. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 196-202, 2014.

SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

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

SUN, J. X.; SUN, R. C.; SUN, X. F.; SU, Y. Q. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 291-300, 2004b.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 1, v. 17, p. 39-67, 1997.

SUZUKI, S.; SAITO, T.; UCHIYAMA, M.; AKIYA, S.; Studies on the anti-tumor activity of polysaccharides. I. Isolation of hemicelluloses from Yakushima-bamboo and their growth inhibitory activities against sarcoma-180 solid tumor. **Chem Pharm Bull**, v.16, n. 10, p. 2032-2039, 1968.

SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; LINDEMANS, G. C. J. E.; DELCOUR, J. A. Large - scale production and characterisation of wheat bran arabinoxyloligosaccharides. **Journal of the Science Food Agriculture**, v. 86, p. 1722-1731, 2006.

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TIMAR-BALAZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation** Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. 444 p.

TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. **Process Biochemistry**, v.42, n. 4, p. 497-509, 2007.

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

VARDAKOU, M.; KATAPODIS, P.; TOPAKAS, E., KEKOS, D.; MACRIS BJ.; CHRISTAKOPOULOS P. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. **Innovative Food Science & Emerging Technology**, n. 5, p. 107- 112, 2004

- VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 387-393, 2000.
- VÁZQUEZ, M. J., GARROTE, G., ALONSO, J. L., DOMÍNGUEZ, H. AND PARAJO, J. C. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 889–896, 2005
- VINCKEN, J.P.; DE KEIZER, A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1579–1585, 1995.
- WANG, Y.; SONG, H.; HOU, J.; JIA, C.; YAO, S. Systematic isolation and utilization of lignocellulosic components from sugarcane bagasse. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 14, p. 2217–2224, 2013a.
- WANG, Z.; ZHU, J. Y; FU, Y.; QIN, M.; SHAO, Z.; JIANG, J.; YANG, F. Lignosulfonate-mediated cellulase adsorption: enhanced enzymatic saccharification of lignocellulose through weakening nonproductive binding to lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 156, 2013b.
- WANG, Y.; AZHAR, S.; LINDSTRÖM, M. E.; HENRIKSSON, G. Stabilization of polysaccharides during alkaline pre-treatment of wood combined with enzyme-supported extractions in a biorefinery. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 35, n. 2, p. 91-101, 2015.
- WANG, X. **Improving the papermaking properties of kraft pulp by controlling hornification and internal fibrillation**. 2006. 51 f. Doctoral Thesis (Technology)- Helsinki University of Technology, Helsinki, Finland, 2006.
- WILKIE, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. In: Tipson, R.S., and Horton, R. (Ed.). **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36, p. 215-264, 1979.
- WILLIAMSON, G.; FAULDS, C. B.; KROON, P. A. Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, n. 2, p. 205-209, 1998.
- WYLEN, G. J. V; SONNTAG R.E. **Fundamentals of classical thermodynamics**. 4th ed. New York: John Wiley, 1985. 589 p.
- WYMAN, C.E. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. Washington: Taylor Francis, 1996. 424 p.
- XU, F. SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 253-261, 2006.
- YANG, B.; WYMAN C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26-40, 2008.

YU, Z.; GWAK, K.; TREASURE, T.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; PARK, S. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. **ChemSusChem**, v. 7, n. 7, p. 1942-1950, 2014.

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

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

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHOU, S.; LIU, X.; GUO, Y.; WANG, Q.; PENG, D.; CAO, L. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 784-789, 2010.

ZHU, J.Y.; PAN, X. J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, p.2411-2418, 2009.