UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDA MACHADO MENDES CARVALHO

**Caracterização ultraestrutural e hidrólise enzimática de cana-de-açúcar
e bagaço pré-tratados quimio-mecanicamente**

Lorena, 2014

FERNANDA MACHADO MENDES CARVALHO

Caracterização ultraestrutural e hidrólise enzimática de cana-de-açúcar e bagaço pré-tratados quimio-mecanicamente

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

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

Edição reimpressa e corrigida

Lorena, 2014

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

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

Carvalho, Fernanda Machado Mendes

Caracterização ultraestrutural e hidrólise enzimática de cana-de-açúcar e bagaço pré-tratados quimio-mecanicamente. / Fernanda Machado Mendes Carvalho. –ed. reimpr., corr.- 2014.

157 p.: il.

Tese (Doutora em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Cana-de-açúcar 2. Sacarificação 3. Celulases 4. Pré-tratamento sulfito-alcalino 5. Microespectrofotometria. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira, orient.

664.1 - CDU

*Ao meu querido e eterno
irmão Vinícius.
In memoriam.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por estar sempre guiando os meus passos.

Aos meus amados pais, Célio e Marta, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Vinícius, pelo amor, proteção e por sempre ter me incentivado a lutar. Foi um exemplo nesta vida.

Ao meu marido Fernando, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, incentivo e paciência durante todos esses anos.

À minha sobrinha e afilhada Luara, por toda alegria que me proporciona.

À minha orientadora, Prof^a. Dr. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela exemplar orientação, confiança, atenção, ensinamentos, compreensão, dedicação e paciência. Muito obrigada!

Ao Prof^o. Dr. André Ferraz, pelos ensinamentos, orientação e sugestões para solucionar os problemas encontrados durante esse trabalho.

Aos meus familiares, pelo amor, apoio e companheirismo.

Às amigas Joseana, Débora e Luciane, pela sincera amizade, companheirismo e ajuda durante todos esses anos.

À Mariana Bazzeggio, pela amizade e pela importante ajuda neste trabalho.

Ao amigo Zé Moreira, pelo apoio, disposição e colaboração na realização deste trabalho.

A todos funcionários e amigos do Debiq, em especial, Djalma, Germano, Felipe, Paula, Celso, Guilherme, Thales, Omar, Fernando, Ângela, Fernanda, Victor e Maiara pela amizade e apoio.

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

Ao Professor Dr. Pedro Fardim pela acolhida, confiança e ensinamentos durante minha estada na Abo Akademi em Turku, Finlândia.

A Dra. Elina Orblin e Dr. Jan Gustafsson pela acolhida, disponibilidade e ensinamentos na Abo Akademi.

À FAPESP, agência financiadora deste projeto (2011/08826-0).

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

À banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

RESUMO

MENDES-CARVALHO, F. M. **Caracterização ultraestrutural e hidrólise enzimática de cana-de-açúcar e bagaço pré-tratados quimio-mecanicamente.** 2014. 157p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

O presente trabalho tem como objetivo estudar as modificações ocorridas na cana-de-açúcar, com diferentes composições químicas e estruturais, pelo pré-tratamento sulfito alcalino. A remoção de lignina e hemicelulose, bem como a introdução de grupos sulfônicos em cana-de-açúcar que ocorrem durante o pré-tratamento sulfito alcalino tornam mais fácil a hidrólise da celulose. A compreensão das modificações químicas e físicas em materiais lignocelulósicos que ocorrem durante este pré-tratamento é fundamental para a geração de processos mais eficazes. Neste trabalho, bagaço e entrenós de cana-de-açúcar, selecionados de plantas híbridas com composição química variada, foram pré-tratados em condições brandas com 10% de sulfito e 5% de hidróxido de sódio por diferentes tempos. No início do pré-tratamento, a deslignificação aumentou rapidamente, o mesmo não aconteceu com a hemicelulose. Nos primeiros 30 min de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar houve remoção de 50% da lignina inicial e 30% da hemicelulose, o que ocasionou uma melhora significativa na conversão de celulose, atingindo 64%. Mesmo sem remoção adicional de lignina e hemicelulose, o processo continuou a introduzir os grupos ácidos, o que contribuiu para o inchamento da fibra. A largura da fibra do bagaço não tratado aumentou de 10,4 μm para 30 μm no material pré-tratado com 120 min. Estas modificações na fibra foram responsáveis pelo aumento na eficiência da hidrólise enzimática da celulose, a qual atingiu 92%. Híbridos experimentais com teores reduzidos de lignina apresentaram taxas iniciais de hidrólise mais elevadas e um menor tempo de pré-tratamento para alcançar a conversão total de celulose do que a cana de referência. Diferentes regiões (medula, interface, córtex e fração externa) dos entrenós das canas foram hidrolisadas por celulasas. O pré-tratamento da interface, córtex e fração externa com sulfito-alcalino produziu substratos menos recalcitrantes com o aumento do tempo de reação e resultou na melhora da hidrólise enzimática. Foram utilizadas várias técnicas para avaliar as mudanças que ocorreram durante o pré-tratamento, as quais foram capazes de estudar a morfologia da superfície e as características químicas das amostras. O tratamento químico ocasionou uma intensa deslignificação e alterações morfológicas nas superfícies das fibras da cana-de-açúcar. A redução na absorção a 285 nm e 315 nm das paredes celulares das fibras, parênquima e dos vasos aumentou substancialmente os valores de conversão enzimática da celulose e da hemicelulose. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM) revelou que as fibras da região do córtex e, especialmente, da interface mostrou paredes celulares colapsadas após a parcial deslignificação. Após o tratamento sulfito alcalino, os dados de espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS) e espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS) apresentaram um aumento das intensidades dos sinais nas superfícies das fibras, os quais foram atribuídos à presença de carboidratos em algumas amostras. Em conformidade, os sinais de lignina diminuíram nas superfícies das fibras das mesmas amostras.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Sacarificação, Celulasas, Pré-tratamento sulfito-alcalino, Microespectrofotometria de UV.

ABSTRACT

MENDES-CARVALHO, F. M. **Ultrasstructural characterization and enzymatic hydrolysis of chemomechanical pretreated sugarcane and sugarcane bagasse.** 2014. 157p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

The present work aims to study the changes occurring in sugar cane, with different in structure and chemical compositions, by sulfite-alkaline pre-treatment. Removing lignin and hemicellulose as well as introducing sulfonic groups in sugar cane pretreated with alkaline sulfite made cellulose hydrolysis easier. Understanding the chemical and physical alterations occurring during this pretreatment of lignocellulosic materials is fundamental for the generation of effective pretreatment methods. In the present work, sugarcane bagasse and also sugar cane internodes, selected from experimental hybrid plants, were pretreated with the alkaline-sulfite process under mild conditions with varied cooking times. The first 30 min of pretreatment of sugar cane bagasse, which removed approximately half of the initial lignin and 30% of hemicellulose seemed responsible for a significant enhancement of the cellulose conversion level, which reached 64%. After the first 30 min of pretreatment, delignification increased slightly and hemicellulose removal was not enhanced. However, the process continued to introduce acid groups into the residual lignin that enhanced the fiber swelling up to 120 min of cooking. The fiber widths increased from 10,4 μm in the untreated bagasse to 30 μm in the 120 min-pretreated material. These changes were responsible for an additional increase in the efficiency of enzymatic hydrolysis of the cellulose, which reached 92%. Experimental hybrids with less original lignin presented higher initial hydrolysis rates than reference sugar cane and required lower time of pretreatment to achieve the total cellulose conversion. Different regions (pith, interface, rind and outermost fraction) of the internodes of types of sugarcanes were hydrolyzed by cellulases. The pretreatment of the interface, rind and outermost fraction with alkaline sulfite produced less recalcitrant substrates with increasing reaction time and resulted in improvement enzymatic hydrolysis. Several techniques enabling the study of surface morphological and chemical characteristics were used to evaluate the changes occurring during the pretreatment step. The chemical treatment caused intense delignification and morphological changes on the sugar cane fiber surfaces. The reduction in the absorption at 285 nm and 315 nm of the cell walls of the fibers, parenchyma and vessel, substantially increased the values of enzymatic conversion of cellulose and hemicellulose. Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) indicated that the fibers from rind regions and especially from the interface showed collapsed cell walls after partial delignification. After the alkaline sulfite treatment, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and time-of-flight-secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) data showed increased signal intensities on the fibers surfaces assigned to carbohydrates of some samples. In accordance, the lignin signals diminished on the fiber surfaces of the same samples.

Keywords: Sugar cane, Saccharification, Cellulases, Sulfite-alkaline pretreatment, UV-microspectrophotometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura anatômica do entrenó da cana-de-açúcar com suas regiões de medula e córtex. As setas indicam os feixes fibrovasculares (a) e as células de parênquima (b) (adaptado SANT'ANNA et al., 2013).....	28
Figura 2: Corte transversal da região do córtex de um entrenó da cana de açúcar após a coloração com azul de toluidina. Os tipos celulares estão indicados: F=fibra, V= vaso, P=parênquima (SIQUEIRA et al., 2011).....	29
Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular da cana-de-açúcar. A imagem (a) mostra a lamela média (ML), a parede celular primária (PCW) e secundária (SCW). A imagem (b) mostra as subcamadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3) com suas espessuras (SANT'ANNA et al., 2013).....	31
Figura 4: Representação esquemática da organização das microfibrilas de celulose (Adaptado de U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, 2014)	33
Figura 5: Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopiranoose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil (McDOUGALL et al., 1993).....	34
Figura 6: Precusores da biossíntese da lignina (adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).....	35
Figura 7: Ligação éster entre ácido ferúlico e arabinoxilana presentes em gramíneas (adaptado de KATO et al., 1987).....	36
Figura 8: Mecanismo da sulfonação da lignina na polpação sulfito em meio neutro e alcalino (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).....	42
Figura 9: Representação da matriz de celulose com regiões amorfas e cristalinas e das enzimas do complexo celulolítico agindo no substrato (SERPA, POLIKAPORV, 2011)..	46
Figura 10: Representação da ação das hemicelulases na xilana (adaptado ARO et al., 2005).....	47
Figura 11: Micrografia óptica de cortes transversal dos entrenós de milho mostrando a extensão da hidrólise com celulases provenientes de rúmen por 24h e 96h (JUNG; CASLER 2006). Pith, par, scl e Rind representam: medula, parênquima, esclerênquima e córtex, respectivamente. Escala de 500 μ m.....	49

Figura 12: (a) Instrumento esquemático TOF-SIMS (MAHONEY et al., 2006). (b) Ilustração do processo de emissão do íon secundário e geração do espectro de massa (http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf500582w).....	53
Figura 13: Ilustração esquemática do funcionamento do XPS (REINERT e HUFNER, 2005).....	55
Figura 14: Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões da cana (COSTA, 2012).....	62
Figura 15: Foto ilustrativa dos fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó das canas. As quatro frações estão indicadas: A - Fração externa; B - Córtex; C - Interface; D - Medula (COSTA, 2012).....	62
Figura 16: Amostras impregnadas com resina epoxídica.....	69
Figura 17: Ilustração de corte de cana de açúcar fixado em resina epoxídica e visto ao microscópio no aumento de 400 vezes. O quadrado ilustrado em uma célula da região central da imagem mostra a área submetida à análise micro-espectrofotométrica.....	70
Figura 18: Representação esquemática do processo de determinação do valor de retenção de água.....	75
Figura 19: Titulação condutimétrica de grupos ácidos em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos: (-●-) sem tratamento, (-▲-) 30 minutos, (-○-) 60 minutos, (-■-) 90 minutos, (-◆-) 120 minutos.....	79
Figura 20: Grupos sulfônicos (-○-), quantidade de enxofre na fibra (-Δ-) e valor de retenção de água (-□-) no bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos de cozimento.....	80
Figura 21: Microscopia óptica das fibras de bagaço submetida ao pré-tratamento sulfito alcalino. Fibra do bagaço de usina não tratado (a), Fibra do bagaço de usina pré-tratado por 30min (b), 60min (c), 90min (d) e 120min. Magnificação 400X.....	81
Figura 22: Micrografias obtidas em MEV de amostras de bagaço de cana-de-açúcar: Feixe de fibra do bagaço não tratado (a), feixe de fibra do bagaço pré-tratado por (b)30min, (c) 60 min, (d) 90 min e 120min (e). Magnificação de 300X e a barra da escala é 20µm.....	82
Figura 23: Hidrólise enzimática da celulose (a) e da hemicelulose (b) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos de cozimento: (-✕-) não-tratado, (-◆-) tratado com sulfito alcalino por 30 min, (-■-) 60 min (-▲-) 90 min e (-○-) 120 min.....	84
Figura 24: Remoção de lignina na interface, córtex e fração externa das canas referência, 58, 89,146 e 140 tratadas com sulfito alcalino por 120 minutos a 121 °C.....	93

Figura 25: Taxa de remoção de lignina na interface e no córtex das canas referência, 58, 89,146 e 140 tratadas com sulfito alcalino por 30 minutos a 121 °C.....	93
Figura 26: Sulfonação da lignina da interface (A), do córtex(B) e da fração externa (C) das canas referência e dos híbridos 58, 89, 146 e 140 pré-tratados com 10% Na ₂ SO ₃ e 5% de NaOH por 30 min (barra azul), 60 min (barra vermelha), 90 min (barra verde) e 120min (barra lilás).....	95
Figura 27: Conversão enzimática da celulose das regiões da cana referência pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de cozimento.(-x-) não-tratada, (-●-) 30 min, (-▲-) 60 min, (-■-) 90 min e (-◆-) 120 min.....	98
Figura 28: Conversão enzimática da hemicelulose das regiões da cana referência pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de cozimento.(-x-) não-tratada,(-●-) 30 min, (-▲-) 60 min, (-■-) 90 min e (-◆-) 120 min.....	99
Figura 29: Conversão enzimática da celulose da interface das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-)120 min.....	100
Figura 30: Conversão enzimática da celulose do córtex das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.....	101
Figura 31: Conversão enzimática da celulose da fração externa das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.....	103
Figura 32: Conversão enzimática da hemicelulose da interface das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.....	104
Figura 33: Conversão enzimática da hemicelulose do córtex das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.....	105
Figura 34: Conversão enzimática da hemicelulose da fração externa das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-◆-) 30 min ; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.....	106
Figura 35: Adsorção máxima de proteínas nas regiões interface, córtex e fração externa das canas não-tratadas 89 (barra azul escuro), 140 (barra verde escuro) e pré-tratadas com 10%	

Na ₂ SO ₃ e 5% NaOH 89 (barra azul claro) e 140 (barra verde claro) por 120min. As medulas destas canas não foram pré-tratadas.....	107
Figura 36: Microscopias óticas das diferentes regiões de um entrenó do cultivar 58, sem tratamento: fração externa (A), córtex (B), interface (C) e medula (D). Aumento 25x.....	109
Figura 37: Microscopias óticas do córtex e da interface de um entrenó do híbrido 58 pré-tratado com sulfito alcalino: córtex pré-tratado por 30 min (A), córtex pré-tratado por 120 min (B), interface pré-tratada por 30 min (C) interface pré-tratada por 120 min (D). Aumento de 50x.....	110
Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura da interface das canas: referência (A, B), híbrido 58 (C, D), híbrido 146 (E, F), híbrido 89 (G, H). As imagens antes (A, C, E, G) e após o pré-tratamento sulfito alcalino (B, D, F, H) são mostradas em aumento de 1500x.....	112
Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura do córtex das canas: referência (A, B), híbrido 58 (C, D), híbrido 146 (E, F), híbrido 89 (G, H). As imagens antes (A, C, E, G) e após o pré-tratamento sulfito alcalino (B, D, F, H) são mostradas em aumento de 1500x.....	113
Figura 40: Percentual de redução na absorbância a 285 nm na parede celular das amostras pré-tratadas com sulfito alcalino em diferentes tempos. Vasos presentes no córtex (A) e na interface (B) das canas referência, 89, 58, 146 e 140 e fibras do córtex (C) e interface (D).....	117
Figura 41: Percentual de redução na absorbância a 315 nm na parede celular das amostras pré-tratadas com sulfito alcalino em diferentes tempos. Vasos presentes no córtex (A) e na interface (B) das canas referência, 89, 58, 146 e 140 e fibras do córtex (C) e interface (D).....	118
Figura 42: Percentual de redução das absorbâncias a 285 nm (A, B) e 315 nm (C, D) de paredes celulares do córtex e interface das canas referência, 89, 58, 146 e 140.....	120
Figura 43: Conversão de celulose nas paredes da fibra e do vaso e a correspondente absorbância a 285 nm (●fibra, ▲vaso) e 315 nm (■fibra, ◆vaso) das regiões da interface e córtex das canas referência (azul), 89 (alaranjado), 58 (verde), 146 (lilás) e 140 (vermelho) tratadas com sulfito alcalino.....	122
Figura 44: Imagens no ToF-SIMS de total de íons, lignina e carboidratos na superfície da interface 146 não tratada e tratada. A barra da escala é 10µm.....	128

Figura 45: Imagens no ToF-SIMS de total de íons, lignina e carboidratos na superfície da interface e do córtex 89 não tratada e tratada. A barra da escala é 10µm.....129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química das canas-de-açúcar.....	61
Tabela 2: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar tratado com solução sulfito alcalino em diferentes tempos.....	77
Tabela 3: Características químicas e físicas do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado.....	78
Tabela 4: Composição química de diferentes frações do entrenó das canas.....	86
Tabela 5: Composição química de diferentes frações do entrenó da cana de referência tratada com 10% de sulfito e 5% de NaOH por diferentes tempos a 121 °C.....	88
Tabela 6: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 58 tratado com 10% de sulfito e 5% de NaOH por diferentes tempos de tratamento a 121 °C.....	89
Tabela 7: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 89 com 10% e 5% de NaOH de sulfito em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.....	90
Tabela 8: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 146 com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.....	91
Tabela 9: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 140 com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.....	92
Tabela 10: Retenção de água na interface, no córtex e na fração externa das canas não-tratadas e pré-tratadas com 10% Na ₂ SO ₃ e 5% de NaOH por 30 min, 60 min, 90 min e 120min.....	96
Tabela 11: Intensidade de absorção no UV e paredes celulares de duas regiões distintas (córtex e interface) do entrenó obtidas a partir de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito-alcalino em diferentes tempos.....	116
Tabela 12: Medidas da lignina superficial por XPS de amostras da interface e córtex de canas pré-tratadas com sulfito alcalino.....	124
Tabela 13: Intensidades de sinais dos espectro de massa de pentoses, hexoses e lignina normalizados obtidos pelo modo de íons positivo do ToF-SIMS. Desvio padrão em parenteses.....	126

ABREVIATURAS

AGs: grupos aniônicos
CBD: domínio de ligação à celulose
CBH: celobiohidrolase
CD: domínio catalítico
CEC: Conversão enzimática de celulose
CEH: Conversão enzimática de hemicelulose
C3H: hidroxicinamato 3-hidroxilase
C4H: cinamato 4-hidroxilase
CCoA-OMT: 5-hidroxiferuloil-CoA-O-metiltransferase
CTC: Centro de Tecnologia Canavieira
DER: éter diglicídico de polipropileno glicol
DMAE: dimetilamina-etanol
DNS: ácido dinitrossalicílico
EDS: detector de dispersão de energia
EG: endoglucanase
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERL: resina epóxi ciclo alifática
FE-SEM: Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
FPU: unidade de papel de filtro
HCT: hidroxí-cinamoil transferase
IAC: Instituto Agrônomo de Campinas
LS: lignosulfonato
MEV: microscopia eletrônica de varredura
NSA: anidrido succínico nonenyl
pNP: p-nitrofenol
pNPG: p-nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo
RIDESA: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
SPORL: Pré-tratamento com sulfito para diminuir a recalcitrância de ignocelulósico
ToF-SIMS: Espectrometria de massa de íons secundários acoplados a analisador de tempo de voo
UI: unidade internacional
UV: ultravioleta

XPS: Espectroscopia fotoelétrica de raio-X

WRV: valor de retenção de água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR	27
2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	30
2.2.1. Celulose	32
2.2.2. Hemicelulose	33
2.2.3. Lignina	34
2.2.4. Características dos híbridos de cana-de-açúcar com teores variados de lignina	37
2.3. PRÉ-TRATAMENTOS	38
2.3.1 Pré-tratamento quimiotermodinâmico	40
2.4. ENZIMAS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE E HEMICELULOSE.....	44
2.5. FATORES QUE INTERFEREM NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	47
2.6. TÉCNICAS DE ANÁLISE SUPERFICIAL E ESTRUTURAL DA FIBRA	51
2.6.1. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS)	52
2.6.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS)	54
2.6.3. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)	56
2.6.4. Microespectrofotometria de ultravioleta	57
2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	58
3. OBJETIVO.....	60
4. MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1. AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E BAGAÇO	61
4.2. SEPARAÇÃO DAS REGIÕES DO COLMO DAS CANAS	62
4.3. TRATAMENTO SULFITO ALCALINO	63
4.4. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	64
4.4.1. Determinação da atividade de Celulases totais	65
4.4.2. Determinação da atividade de β -Glicosidase.....	66
4.5. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS	66
4.6. ANÁLISES MICROSCÓPICAS DO BAGAÇO E DA CANA-DE-AÇÚCAR	67
4.6.1. Microscopia óptica	67

4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura	67
4.6.3. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM).....	68
4.7. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DAS REGIÕES DA CANA.....	68
4.7.1. Microespectrofotometria no ultravioleta	68
4.7.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio - X (XPS)	71
4.7.3. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS) .	72
4.8. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE CANA	73
4.9. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS ÁCIDOS.....	74
4.10. DETERMINAÇÃO DO VALOR DE RETENÇÃO DE ÁGUA (WRV).....	75
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.1. PRÉ-TRATAMENTO SULFITO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	76
5.1.1. Caracterização físico-química do bagaço	76
5.1.2 Análise microscópica das amostras de bagaço	81
5.2. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES REGIÕES DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	84
5.2.1. Caracterização química da cana-de-açúcar pré-tratada com sulfito-alcálico ...	85
5.2.2. Determinação de grupos ácidos das frações dos colmos das canas pré-tratadas com sulfito alcalino.....	94
5.2.3. Determinação do grau de retenção de água nas frações dos colmos das canas pré-tratadas com sulfito alcalino	96
5.2.4. Hidrólise enzimática das frações obtidas a partir de entrenós de cana de açúcar	97
5.2.5. Adsorção de proteínas	106
5.3. ASPECTOS ANATÔMICOS DA PAREDE CELULAR	108
5.3.1. Microscopia ótica	108
5.3.2. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM).....	110
5.4. TOPOQUÍMICA DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR	114
5.4.1. Microespectrofotometria no ultravioleta	114
5.4.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS)	122
5.4.3. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS)	125
6. CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS	133

APÊNDICE A- Espectros ultravioletas de cada tipo celular das regiões córtex, interface e medula das cana-de-açúcar sem tratamento	152
APÊNDICE B- Espectro de ToF-SIMS com íons positivos das amostras	156

1. INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento econômico mundial tem acarretado um rápido aumento na demanda energética e uma preocupação cada vez maior com a diminuição da oferta futura de derivados de petróleo e com a degradação ambiental. Esses fatores aliados maximizam a importância da introdução de energia sustentável a partir de fontes renováveis na matriz energética mundial. Diante disto, aumentou o interesse na conversão de biomassa em etanol e, hoje, esse biocombustível é uma alternativa promissora, estudada mundialmente. Na biomassa vegetal, os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes, e estão presentes nos produtos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho, palha de arroz, entre uma série de outros. O bagaço de cana é particularmente uma fonte valiosa de substratos lignocelulósicos, uma vez que já está presente nas usinas de açúcar e álcool, onde etanol de primeira geração é produzido e, assim, o processamento do bagaço para produção de etanol de segunda geração pode compartilhar parte dos equipamentos existentes, como as unidades de concentração, fermentação, destilação, cogeração e armazenamento.

Os carboidratos do bagaço, ou de qualquer outro material lignocelulósico, não correspondem a monossacarídeos prontamente fermentáveis, pois se encontram na forma de polímeros de celulose e hemicelulose, recobertos por uma macromolécula aromática complexa, denominada lignina. Diversos trabalhos têm demonstrado que a recalcitrância destes materiais lignocelulósicos está associada com a distribuição topoquímica da lignina e da hemicelulose e com a porosidade limitada da parede celular, estas limitações se devem em parte ao elevado grau de organização da parede que contém, além das microfibrilas de celulose, lignina e hemicelulose encapsulando estas microfibrilas (CANILHA et al., 2010; LIMAYEM; RICKE, 2012; WYMAN et al., 2005). Esta complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica, em geral, é resistente à bioconversão. Devido a essa dificuldade na estrutura da biomassa, muitos processos têm sido desenvolvidos no intuito de converter os carboidratos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis, buscando por melhores rendimentos e menores custos de processamento (CANILHA et al., 2010; JORGENSEN et al., 2007).

A remoção parcial de lignina e de hemicelulose do substrato tem se mostrado necessária à eficiente sacarificação enzimática. Esta remoção de componentes pode ser obtida por pré-tratamentos químicos, físicos, biológicos ou a combinação destes (ALVIRA

et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Dentre os processos já descritos para esta finalidade, o pré-tratamento químio-mecânico empregando sulfito alcalino se mostrou eficiente tanto para bagaço de cana como para madeiras de folhosas e de coníferas (MENDES et al., 2011; WYMAN et al., 2005; ZHU et al., 2009). Este processo tem sido utilizado em nossa pesquisa com resultados promissores, em que foi demonstrada a alta eficiência da hidrólise de celulose mesmo com parcial deslignificação e um alto rendimento do processo (MENDES et al., 2011).

Plantas com níveis reduzidos de lignina, obtidos através da manipulação genética ou cruzamentos, também são mais susceptíveis à hidrólise enzimática (CHEN; DIXON, 2007; GRABBER et al., 1996). Dados de Masarin et al. (2011), obtidos com híbridos de cana, confirmam tais resultados, porém o nível de lignina das canas ainda é relativamente alto, necessitando de pré-tratamentos para alcançar a completa conversão enzimática.

O desenvolvimento de técnicas capazes de desconstruir a parede celular vegetal demanda o aprofundamento do conhecimento da estrutura química e morfológica da parede celular da cana-de-açúcar. Muitas informações têm sido obtidas da literatura sobre as alterações na composição química causada por diferentes pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos, entretanto pouco tem sido reportado sobre mudanças físicas e estruturais nos materiais pré-tratados. Dessa forma, é importante avançar o conhecimento sobre as alterações estruturais ocasionadas pelo pré-tratamento, entender como estas mudanças afetam a hidrólise enzimática, para posteriormente poder viabilizar e moldar a etapa de sacarificação enzimática. Baseado nisto, este trabalho procurou avaliar as modificações químicas e estruturais causadas pelo pré-tratamento sulfito-alcalino na cana-de-açúcar e entender como essas modificações influenciam a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar, uma das mais importantes monoculturas agrícolas no Brasil, é uma gramínea pertencente à classe Monocotiledônea, ordem Cyperales, família Poaceae e gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. As canas cultivadas atualmente, na sua maioria, são híbridas provenientes do cruzamento de diferentes espécies de cana. Nesses híbridos, procura-se aliar a rusticidade, resistência a moléstias e as boas qualidades de riqueza em açúcar das variedades nobres de *Saccharum officinarum* (CARVALHO; FURTADO, 2013). Ao longo de várias décadas, especialistas e pesquisadores foram aprimorando a qualidade da planta cana-de-açúcar, apesar de sua complexa composição genética. No Brasil, programas de melhoramento da cana-de-açúcar são realizados em várias instituições, tais como, pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) e Canavialis (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Estes centros foram responsáveis pelos principais avanços no desenvolvimento de variedades, no desenvolvimento tecnológico e de inovação do setor e, atualmente, continuam representando grande parte da capacidade tecnológica do país em desenvolver e adaptar variedades às mudanças climáticas. Variedades estas que também devem ser mais produtivas, consumir menos insumos, ser mais resistentes a pragas, mais apropriadas ao ciclo sazonal e suportar a mecanização (CARVALHO; FURTADO, 2013). Desde a implantação do Programa “Próalcool” no Brasil, a produtividade de cana nesses 30 anos tem aumentado na proporção de 761 Kg/ha/ano (1,5%) (LOUREIRO et al., 2011). A previsão do total de cana-de-açúcar para ser moída é de 659,85 milhões de toneladas na safra de 2013/2014, com aumento de 12,0% em relação à safra 2012/13, que foi de 588,92 milhões de toneladas, significando que a quantidade que será moída deve ser 70,93 milhões de toneladas maiores que na safra anterior (CONAB, 2013).

A cana-de-açúcar é composta na parte aérea pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana e pela parte radicular, que é raiz no subsolo. Difere da maioria das gramíneas por apresentar um caule firme e grande

diversidade morfológica. O caule ou colmo da cana é dividido longitudinalmente por uma série de nós e entre estes, estão os entrenós. Os nós usualmente são menores que os entrenós e ambos estão recobertos externamente por uma única camada de células, denominada epiderme.

O colmo da cana é constituído principalmente de feixes fibrovasculares e células de parênquima (Figura 1). Os feixes fibrovasculares são responsáveis pelo transporte e suporte mecânico, em geral são compostos pelos vasos xilema e floema, circundados pelas fibras. Os feixes estão espalhados nos colmos, porém mais densamente presentes na sua periferia e ficam cercados por células de parênquima (DRIEMEIER et al., 2012; SANT'ANNA et al., 2013). As fibras, devido a sua função de suporte mecânico, apresentam dimensões de 15-25 μm de largura e 0,6-1,7 mm de comprimento, paredes grossas (4 μm) e um menor lúmen, diferentemente dos vasos e do parênquima, que apresentam 2,7 μm e 1,7 μm , respectivamente, de espessura da parede celular (SANJUAN et al., 2001). As células de parênquimas predominam no colmo da cana-de-açúcar e possuem grandes vacúolos com a função de armazenar a sacarose (MOORE, 1987).

Figura 1: Estrutura anatômica do entrenó da cana-de-açúcar com suas regiões de medula e córtex. As setas indicam os feixes fibrovasculares (a) e as células de parênquima (b)

Fonte: adaptado SANT'ANNA et al., 2013.

No interior do colmo, há duas regiões distintas, a medula e o córtex (Figura 1). A medula tem predominância de tecido vegetal parenquimatoso, e conforme mencionado suas células têm um lúmen largo e parede celular estreita (SANJUAN et al., 2001). Nesta região também há vasos e fibras, porém em menor predominância do que as células de parênquima (SIQUEIRA et al., 2011). O córtex, região mais externa do colmo é uma região rica em feixes vasculares. O número de fibras ao redor dos vasos nos feixes vasculares são maiores no córtex do que na medula, formando feixes fibrovasculares maiores (Figura 2).

Figura 2: Corte transversal da região do córtex de um entrenó da cana de açúcar após a coloração com azul de toluidina. Os tipos celulares estão indicados: F=fibra, V= vaso, P= parênquima.

Fonte: SIQUEIRA et al., 2011.

Em monocotiledôneas, o volume ocupado pelas células de parênquima pode variar de 30-70% do entrenó, mas representa menos de 20% da massa seca. Em um recente estudo, Costa et al. (2013) dividiram os entrenós de três híbridos de cana-de-açúcar em quatro frações diferentes desde o centro até a parte mais externa do caule. Essas frações foram denominadas de medula, interface, córtex e fração externa, que representam aproximadamente 10%, 29%, 49% e 12%, respectivamente, do volume dos entrenós.

As regiões do córtex e fração externa em que predominam os feixes fibrovasculares correspondem a 75% da massa seca do entrenó.

A fração mais externa inclui uma parte dos feixes vasculares periféricos, as células corticais e a epiderme. Costa et al. (2013) reportam também que o número e o diâmetro dos feixes vasculares variam significativamente entre as regiões do colmo das canas. Foram avaliadas quatro canas e para todas, o número de feixes vasculares por área aumentou no sentido da medula para o córtex. Este aumento na frequência de feixes vasculares parece correlacionar-se com o aumento da recalcitrância das mesmas frações. Já que em comparação com as partes mais externas, as partes internas foram mais facilmente hidrolisadas por enzimas.

Entre as canas, observaram-se diferenças entre o número e tamanho dos feixes vasculares especialmente na região do córtex, com menor hidrolisabilidade quando se observava feixes grandes, mesmo em menor número (COSTA et al., 2013).

2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar, produzido após a moagem e extração do caldo da cana, vem se destacando devido a sua abundância e a diversos produtos que dele podem ser obtidos (RIPOLLI; RIPOLLI, 2004). Em geral, uma tonelada de cana de açúcar gera 280 kg de bagaço com 50% de umidade, podendo ter diferentes usos como: insumo para produção de papel, plástico, ração animal, entre outros (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Por ser composto por cerca de 70% de polissacarídeos, celulose e hemicelulose, ele apresenta grande potencial para ser utilizado como substrato para a produção de etanol celulósico (SANJUÁN et al., 2001). Entretanto, sua principal utilização é como combustível para o sistema de produção de vapor e eletricidade, pois a complexidade da parede celular limita os processos de conversão dos polissacarídeos.

Os polissacarídeos do bagaço, ou de qualquer outro material lignocelulósico se encontram recobertos por uma macromolécula aromática complexa, denominada lignina (CANILHA et al., 2010). A parede celular do bagaço de cana-de-açúcar é constituída por uma parede primária fina (P), inicialmente depositada durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3). Essas camadas S1, S2 e S3 apresentam espessura variável 100-200nm, 400-500nm, 220-300nm, respectivamente, e com distintas orientações das fibrilas de celulose embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina (SANT'ANNA et al.,

2013). As células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina (máximo 1 μm de espessura), composta por elevada concentração de lignina (Figura 3).

Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular da cana-de-açúcar. A imagem (a) mostra a lamela média (ML), a parede celular primária (PCW) e secundária (SCW). A imagem (b) mostra as subcamadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3) com suas espessuras.

Fonte: SANT'ANNA et al., 2013.

A composição química do bagaço varia em função da variedade de cana, do solo, do clima, da disponibilidade de água e da época na safra, dentre outros aspectos. Sua composição é de aproximadamente 40-50% de celulose, 25% de hemicelulose, 25% de lignina, 2% de cinzas e 5% de extrativos (FENGEL; WEGENER, 1989; PANDEY et al., 2000; SAHA, 2003). Masarin et al. (2011), mostrou que a composição do bagaço pode variar significativamente com a variedade de cana plantada. Em um conjunto de 13 amostras os teores mínimos e máximos de celulose, hemicelulose e lignina variaram de 38,2 a 43,2%, 25,2 a 31,6% e 16,8 a 24,5%, respectivamente.

2.2.1. Celulose

A celulose é o composto orgânico mais abundante na Terra e o principal componente das paredes celulares das plantas. É um polímero linear com alto grau de polimerização, podendo atingir até 15.000 subunidades de glicose e estão associadas por ligações β -1,4-glicosídicas (FENGEL; WEGENER, 1989). Em função da linearidade da celulose, as suas moléculas formam pontes de hidrogênio entre grupos OH de unidades de glicose adjacentes da mesma molécula de celulose (ligação intramolecular - responsável pela rigidez) e entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (ligação intermolecular-responsável pela formação da estrutura supramolecular). Assim, feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, as quais formam regiões altamente ordenadas (cristalinas) e regiões menos ordenadas (amorfas). As fibrilas se organizam em microfibrilas e estas originam as fibras celulósicas que estão envolvidas por uma matriz de hemicelulose e lignina (Figura 4) (FENGEL; WEGENER, 1989). As microfibrilas são compostas de aproximadamente 30-36 cadeias de glicose, possuem um diâmetro de 2-10 nm tem ligações cruzadas com outros componentes da parede celular, tais como as xiloglucanas (ARANTES; SADDLER, 2010). As redes de microfibrilas de celulose são denominadas de macrofibrilas, que estão organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa presente nas camadas da parede celular da planta.

Figura 4: Representação esquemática da organização das microfibrilas de celulose.

Fonte: Adaptado de U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, 2014.

2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose, também chamada de poliose, é um polissacarídeo estrutural que está intimamente ligada à celulose e à lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material (TELEMAN et al., 2009). É composta por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) na cadeia principal, e grupos pendentes de ácidos glucurônico, acetil e arabinose, dependendo de sua origem. As cadeias de hemicelulose podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas, ou por duas ou mais unidades, como xiloglucanas, arabinoglucanas e 4-O-metil-glucuronoxilanas (FENGEL; WEGENER, 1989). Os grupos pendentes na cadeia principal determinam a solubilidade, a interação física da molécula com os componentes

lignocelulósicos e influenciam no modo e na extensão da hidrólise enzimática (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). O baixo grau de polimerização (até 200) e as ramificações proporcionam um arranjo irregular entre as cadeias e explicam porque a hemicelulose possui estrutura amorfa e, portanto, é menos estável termicamente e quimicamente quando comparada com a celulose (TELEMAN et al., 2009).

A hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar é composta majoritariamente por 4-O-metil-glucuronarabinosilanas acetiladas ou arabinosilada na posição C2 e/ou C3 e a arabinose pode ser esterificada com ácido cumárico e ferúlico (Figura 5). A α -D-glucuronopiranosil ou o seu derivado 4-O-metil aparecem como substituintes no carbono 2 (CARPITA; GIBEAUT, 1993; WENDE; FRY, 1997).

Figura 5: Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopirranose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil.

Fonte: MCDOUGALL et al., 1993.

2.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula que confere rigidez à parede das células vegetais. A função da lignina é “cimentar” as fibras de celulose, agindo como uma barreira à degradação da parede celular, estando intimamente ligadas às hemiceluloses (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). É uma macromolécula amorfa, hidrofóbica e heterogênea, composta basicamente de unidades de fenilpropano. Sua estrutura é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diaril-éter β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, β - β e β -O-5, sendo as β -O-4 as mais abundantes (HIGUCHI, 1984). A lignina é polimerizada a partir de três monômeros chamados

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

Figura 6: Precursores da biossíntese da lignina.

Fonte: adaptado de EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009.

A composição da lignina varia entre os diversos grupos de plantas. Em gimnospermas predomina o tipo G (guaiacila), em angiospermas G-S (guaiacila-siringila) e em gramíneas a lignina tipo G-S-H (guaiacila-siringila-p-hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006). A lignina de bagaço contém grandes quantidades de estruturas não condensadas, consistindo de unidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil em proporções aproximadamente iguais (BAUCHER et al., 2003). A forte associação entre os constituintes da parede vegetal sugere a existência de ligações químicas entre a lignina e hemicelulose (ALÉN, 2000). No bagaço de cana-de-açúcar, essas ligações podem ser explicadas pela existência de ácido ferúlico e ácido p-cumarílico que permitem ligações éster com a arabino-glucurono-xilana e ligações éster-éter com lignina (Figura 7) (ATSUSHI et al., 1984).

Figura 7: Ligação éster entre ácido ferúlico e arabinoxilana presentes em gramíneas.

Fonte: adaptado de KATO et al., 1987.

A deposição de lignina é regulada de forma espaço-tempo e varia entre as paredes celulares primárias e secundárias e entre os tecidos (GRABBER et al., 2004). Durante as fases iniciais de lignificação, unidades H e G e apenas algumas unidades de S são incorporadas no polímero. Subsequentemente, álcool coniferílico e quantidades crescentes de álcool sinapílico são incorporados durante a formação da parede secundária para formar uma mistura de G e S unidades (GRABBER, 2005). Em gramíneas, significativas quantidades de ácido ferúlico e ácido cumárico, também são incorporadas durante o desenvolvimento da parede celular secundária e da lignificação (VOGEL, 2008). A distribuição diferencial de unidades de lignina também ocorre entre os tipos de células diferentes (BOTTCHEER et al., 2013).

A capacidade da lignina em resistir à degradação faz com que seja um importante componente da parede celular da planta e a responsável pela sua recalcitrância à degradação (VANHOLME et al., 2010; VAN ACKER et al., 2013). O fato de a lignina ser formada a partir de diferentes unidades monoméricas, diferentes ligações químicas e ter baixa reatividade dificulta a capacidade de qualquer enzima reconhecê-la e degradá-la (WENG et al., 2008). A lignina também tem sido caracterizada como inibidor de celulasas e, portanto, muitos dos métodos de pré-tratamento buscam diminuir o teor de lignina do substrato (MOSIER et al., 2005). Além disso, a lignina e alguns dos seus subprodutos podem inibir o crescimento de microrganismos que realizam o processo de fermentação, diminuindo rendimento do processo de produção de biocombustível (SIMMONS et al.,

2010). Por conseguinte, o processo de conversão de biomassa em biocombustíveis requer pré-tratamentos para remover a lignina, afrouxar a rígida parede celular e prover o acesso aos polissacarídeos da parede celular para a sacarificação (BOTTCHER et al., 2013). Diante disto, aumentou o número de estudos para modificar a composição e quantidade de lignina utilizando o melhoramento genético e a engenharia genética (LI et al., 2008; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Esses estudos resultaram em plantas transgênicas mais eficientes para produção de papel ou forragens com maior digestibilidade, além de proporcionar um melhor entendimento da via biossintética da lignina (BOERJAN et al., 2003; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002).

A manipulação genética da biossíntese de lignina foi também proposta para reduzir a necessidade de processos de pré-tratamento para produção de açúcares fermentáveis. A biossíntese de lignina de alfafa mostrou que a regulação de seis diferentes enzimas da via biossintética: cinamato 4-hidroxilase (C4H), hidroxí-cinamoil transferase (HCT), hidroxícinamato 3-hidroxilase (C3H), 5-hidroxiferuloil-CoA-O-metiltransferase (CCoA-OMT), ferulato 5-hidroxilase (F5H) e ácido caféico O-metiltransferase (COMT) poderia reduzir ou eliminar a necessidade de pré-tratamento químico na produção de açúcares fermentáveis (CHEN; DIXON, 2007). Amostras de alfafa com teor reduzido de lignina foram pré-tratadas com ácido e posteriormente realizaram a sacarificação enzimática. Os resultados demonstraram que o menor conteúdo de lignina nas linhagens transgênicas contribuiu para superar a recalcitrância da biomassa, durante a conversão de celulose a glicose.

2.2.4. Características dos híbridos de cana-de-açúcar com teores variados de lignina

No Brasil, o programa de melhoramento de cana (RIDESA) tem selecionado canas com baixo teor de lignina ou composição alterada, usando um método de seleção para aumentar a frequência de alelos favoráveis através de ciclos repetidos de cruzamentos e seleção. A caracterização de uma população de clones mostrou uma grande variação no teor de lignina (de 5 a 18%) em bagaço de cana de açúcar (LOUREIRO et al., 2011). O baixo teor de lignina é um fator desejável em plantas utilizadas para a produção de etanol celulósico, porém a produtividade de biomassa e o teor de sacarose também são relevantes. Diante disto, um estudo realizado por Masarin et al. (2011), foram avaliadas a composição

química e características agronômicas de algumas plantas híbridas de cana-de-açúcar. A partir desse grupo de plantas analisaram-se os parâmetros de produtividade de biomassa e sacarose evidenciando os bons resultados dos clones (58 e 89), com baixo teor de lignina. O clone 87 teve alta produtividade de biomassa e produção de sacarose, com um teor de lignina intermediário, ao passo que o clone 8 também teve alta produtividade, mas possui o teor mais elevado de lignina. Em contraste, apesar de terem um baixo teor de lignina, os clones 53, 146 e 166 possuem muito baixa produtividade em biomassa (MASARIN et al., 2011). Os teores de lignina total variaram entre 17% - 24%, enquanto os de glucanas foram de 38% a 43%. A baixa quantidade de lignina em alguns híbridos foi compensada por um aumento variável do teor dos outros componentes, inclusive os extrativos. Os autores também observaram em outra análise, que os ácidos hidroxicinâmicos representam boa parte dos aromáticos presentes nas amostras, com valores entre 5,0 % e 9,2 % para hidroxicinâmicos totais e predominância do ácido p-cumárico em relação ao ferúlico.

Neste estudo foi realizada a hidrólise enzimática direta em todas as canas e após 72h de hidrólise com 20 FPU e 40UI de β -glicosidase por grama de bagaço, a conversão máxima de celulose a glicose foi de 31%, de acordo com este estudo, estas plantas precisam de uma deslignificação para aumentar a eficiência enzimática na conversão de celulose (MASARIN et al., 2011).

Neste contexto, pesquisadores buscam relacionar informações sobre pré-tratamentos e programas de melhoramento genético de plantas para aumentar a eficiência da produção de etanol celulósico.

2.3. PRÉ-TRATAMENTOS

A utilização da biomassa lignocelulósica como fonte de carboidratos para obtenção de combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado tem sido severamente dificultada pela sua recalcitrância à hidrólise enzimática (SANNIGRAHI et al., 2010). Devido a essa dificuldade, muitos processos têm sido desenvolvidos no intuito de converter os carboidratos presentes na biomassa em açúcares, buscando por melhores rendimentos e menores custos de processamento (JORGENSEN et al., 2007; KUMAR et al., 2009; WANG et al., 2009). A hidrólise enzimática de matérias lignocelulósicas não tratados é altamente restrita, e o pré-tratamento é, por conseguinte, um pré-requisito para a

hidrólise enzimática eficiente dos carboidratos da parede celular (MOSIER et al., 2005). O pré-tratamento físico, químico ou biológico, ou a combinação destes, introduz modificações à estrutura da biomassa, o que leva a uma melhor ação enzimática sobre os polissacarídeos da parede celular. Sob condições controladas deve evitar a degradação dos polissacarídeos e subsequente formação de subprodutos que são inibidores tanto da hidrólise enzimática quanto da fermentação (MOSIER et al., 2005). Várias tecnologias de pré-tratamento foram e ainda estão sendo desenvolvidas, uma vez que nenhum dos métodos existentes provou ser superior aos outros em todos os aspectos. Além disso, os pré-tratamentos não são igualmente ideais para todas as matérias-primas, devido à diversidade estrutural do material lignocelulósico.

O pré-tratamento tem o objetivo de alterar ou remover a lignina e/ou hemicelulose, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose (CANILHA et al., 2010; ZHANG; LYND, 2004). A parede da célula vegetal é impermeável a grandes moléculas, incluindo proteínas, como as celulasas. Para superar esta barreira, reagentes que incluem, mas não apenas se restringem a ácidos e bases podem ser utilizados para solubilizar a hemicelulose e/ou a lignina e, assim, aumentar a porosidade da matriz (GOULD, 1984; SHELL et al., 1991). Os pré-tratamentos com ácidos diluídos (<4%) tendem a remover uma parte expressiva da hemicelulose para a fase líquida, deixando a lignina e a celulose na fase sólida. Dependendo da temperatura, o pré-tratamento ácido usualmente gera produtos de degradação do açúcar, como o furfural, que é um inibidor do crescimento de microrganismos (SAHA, 2004). Comparado aos pré-tratamentos ácidos, o pré-tratamento alcalino produz uma menor degradação de açúcares, dissolvem principalmente a lignina e parte da hemicelulose.

A degradação da lignina por soluções alcalinas começa com a ionização dos grupos fenólicos produzindo metileno quinona como intermediário. Com a quebra das estruturas aril-éter, observa-se a fragmentação da macromolécula de lignina em compostos solúveis no meio reacional. O pré-tratamento alcalino também promove a clivagem de ligações éster de ácidos hidroxicinâmicos ligados à lignina ou hemicelulose (CAO et al., 2012; MASARIN et al., 2011; MENDES et al., 2011).

Pré-tratamentos mecânicos também podem ser utilizados para aumentar a reatividade do material pré-tratado frente às enzimas hidrolíticas. A redução da granulometria do material de partida por moagem, embora altamente desfavorável do ponto de vista de consumo energético, aumenta a área superficial disponível e diminui a

cristalinidade da celulose, favorecendo a sacarificação enzimática (RIVERS; EMERTT, 1989).

Pré-tratamentos biológicos, com fungos e bactérias que promovem a degradação seletiva da lignina e/ou da hemicelulose, representam outra opção, entretanto as velocidades de biodegradação são lentas.

Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos representam as melhores opções para fracionar a biomassa (RAMOS, 2003). Um exemplo, pré-tratamento quimiotermomecânico, é um processo que combina a etapa mecânica com a química, ou seja, os materiais são pré-tratados durante o cozimento com reagente químico e posteriormente utiliza-se um refinador para o desfibramento do material.

2.3.1 Pré-tratamento quimiotermomecânico

Os processos quimiotermomecânicos resultam da combinação de tratamentos, normalmente com sulfito a altas temperaturas e tratamentos mecânicos, responsáveis pelo desfibramento (SJOSTROM, 1993).

O tratamento com sulfito diminui a cristalinidade da celulose e aumenta a hidrofiliabilidade da lignina com a sulfonação (HEUSER, 1950; MEEIER, 1962; ZHU et al., 2009). O tratamento com hidróxido de sódio reduz o teor de lignina de 60% a 90%, em concentrações que variam de 1 % a 8%, diminui a cristalinidade da celulose interrompendo algumas ligações estruturais e aumenta a área superficial para a penetração da enzima (MAC DONALD et al., 1983; SILVERSTEIN et al., 2007; SOTO et al., 1994; ZHAO et al., 2008). Para obter a máxima digestibilidade enzimática, a combinação dos efeitos de NaOH e Na₂SO₃ em determinada temperatura e concentração de reagentes é uma solução potente para a remoção de lignina e a despolimerização da xilana sem degradar a celulose (IDREES et al., 2013).

O pré-tratamento quimiotermomecânico de cavacos de madeira com sulfito e subsequente sacarificação enzimática foram reportados (WANG et al., 2009; ZHU et al., 2009; ZHU; PAN, 2010). As amostras são impregnadas com solução de sulfito em meio ácido, tratadas a 180°C por 30 minutos, e em seguida refinadas em refinador de discos. Os autores nomearam o processo de SPORL (Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose) porque com este material pré-tratado foi obtida uma alta conversão

enzimática de celulose a glicose (90%). A diminuição da recalcitrância do material é alcançada em razão da combinação dos efeitos: dissolução da hemicelulose, redução do grau de polimerização da celulose e da xilana, parcial deslignificação, parcial sulfonação da lignina e aumento da área superficial através da fibrilação (ZHU et al., 2009). A sulfonação da lignina aumenta a hidrofilicidade da amostra pré-tratada por SPORL e reduz a adsorção improdutiva de enzimas na lignina (ZHU; PAN, 2010). Em relação ao pré-tratamento apenas com ácido, a adição de sulfito reduz o gasto de energia, gera menos inibidores do crescimento microbiano e a celulose obtida pode ser totalmente convertida a glicose por celulasas (WANG et al., 2009; ZHU et al., 2009).

O pré-tratamento químico-mecânico com sulfito alcalino empregado na indústria de celulose e papel para a obtenção de polpas de alto rendimento (75-95%) também pode atender aos requisitos citados anteriormente como primordiais à hidrólise enzimática dos polissacarídeos. As reações da lignina em meio alcalino, conforme já descrito, inicia com a desprotonação de um OH fenólico, estrutura disponível em pequenas quantidades na macromolécula. A desprotonação de um OH fenólico pode dar origem a uma metileno quinona, através da clivagem no carbono alfa (Figura 8) (FENGEL; WEGENER, 1989). O SO_3^{2-} reage com o carbono benzílico do metileno quinona sulfonando a lignina (Figura 8). Pelo menos nas estruturas acíclicas, a metileno quinona é facilmente atacada pelo íon sulfito ou íon bissulfito, assim, a estrutura que era hidrofóbica se torna mais hidrofílica (STENIUS, 2000; SJOSTROM, 1993). Essa alteração na polaridade da molécula ocasiona o inchamento da fibra através da retenção de mais água.

Figura 8: Mecanismo da sulfonação da lignina na polpação sulfito em meio neutro e alcalino.

Fonte: EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009.

Segundo Del Rio et al. (2011), o inchamento da fibra pode ser influenciado por diversos fatores como: a natureza dos grupos carregados no interior e exterior das fibras, o pH do meio, a hidrofiliabilidade dos substratos e a presença de eletrólitos. Neste trabalho, amostras de madeira mole (Lodgepole) pré-tratadas com organossolve (etanol/butanol e água) foram submetidas a dois tratamentos: mecânico (refino) e químico (sulfonação). O tratamento mecânico diminuiu o tamanho das partículas, porém não alterou a acessibilidade enzimática. O processo de sulfonação foi realizado a 140° C em três concentrações diferentes de Na_2SO_3 (0,25M; 0,5M e 1M). Os autores relataram que a concentração de lignina residual foi semelhante para todas as cargas de sulfito de sódio (15,1%; 14,9% e 15,3%, respectivamente) e houve uma solubilização de 21% de lignina comparando com material apenas tratado com organossolve. Níveis semelhantes de deslignificação e de incorporação de grupos sulfônicos obtidos em concentrações de sulfito que variaram de 0,25M a 1M indicaram que a quantidade de sulfito de sódio foi maior do que a necessária para sulfonar todos os sítios disponíveis no substrato.

Os valores de retenção de água também foram semelhantes (2,80; 2,78 e 2,83), com aumento da concentração de sulfito, porém a amostra refinada teve um valor maior de retenção de água (3,20). A explicação apresentada no trabalho para o menor efeito de retenção de água nas fibras sulfonadas foi que o teste de retenção de água não é sensível suficientemente para detectar diferenças causadas pela pequena quantidade de grupos sulfônicos (32 mmol/kg) incorporados na fibra. Porém, observou-se que houve uma maior

hidrólise enzimática da fibra tratada com sulfito devido a menor adsorção improdutiva das celulasas na lignina sulfonada (DEL RIO et al., 2011).

A remoção da lignina durante o cozimento com sulfito alcalino não procede uniformemente, pois a penetração dos íons hidroxilas e sulfito nos cavacos de madeira difundem-se das partes mais internas para as mais externas. Desta forma, a deslignificação ocorre da parede secundária para a lamela média (GELLERSTEDT et al., 2009; KOCH et al., 2003). Para uma boa etapa de digestão é importante que a impregnação dos reagentes químicos seja completa até atingir a temperatura de cozimento (SJOSTROM, 1993).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o pré-tratamento quimiotermomecânico no bagaço de cana-de-açúcar em meio sulfito alcalino mostraram a conversão de 85% da celulose de amostras pré-tratadas, em que cerca de 50% da lignina e 33% da hemicelulose haviam sido removidas (MENDES et al., 2011). A hidrólise da celulose destas amostras foi facilitada não apenas pela redução no conteúdo de lignina e hemicelulose, mas também pela incorporação de grupos sulfônicos na superfície do bagaço. No trabalho de Laurito-Friend (2013), os bagaços de cana-de-açúcar foram tratados com diferentes concentrações de solução sulfito alcalino, para solubilizar lignina e hemicelulose e favorecer o acesso das enzimas ao substrato. Híbridos de cana-de-açúcar com teores reduzidos de lignina e uma variedade comercial foram submetidas ao processo quimio-mecânico por 2 horas, a 121°C, com soluções de hidróxido de sódio (2,5%, 3,75% e 5% m/m) e sulfito de sódio (5%, 7,5% e 10% m/m), combinadas na proporção de 1:2, respectivamente. Na maior concentração de reagentes, o pré-tratamento foi mais eficiente para remover a lignina e hemicelulose, favorecendo maiores conversões enzimáticas. O maior rendimento de hidrólise da celulose foi de 92% para o híbrido 58 (após 96 horas de reação), que associou o efeito da deslignificação (53,5%) com alta incorporação de sulfito (600 mmol/Kg de lignina). As remoções de lignina e hemicelulose favoreceram a hidrólise enzimática, porém, as maiores conversões de celulose e as maiores velocidades iniciais de hidrólise não ocorreram nas amostras com menor teor de lignina e hemicelulose residual. Esses resultados sugerem que a deslignificação total das amostras não é necessária para promover boas conversões enzimáticas. A melhoria na digestibilidade do bagaço foi atribuída às modificações da lignina, devido à introdução de íons sulfito na amostra.

2.4. ENZIMAS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE E HEMICELULOSE

As celulasas são hidrolases que catalisam a quebra de ligações glicosídicas β 1-4 em celulose com adição concomitante de água ao ponto de clivagem. Embora haja apenas um tipo de ligação química presente na celulose, enzimas com diferentes modos de ação são necessárias para a completa degradação deste polímero.

A bioconversão da celulose é um processo complexo e requer a ação de pelo menos 3 enzimas: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1. 21) (HENRISSAT, 1994; TEERI 1997; ZHANG; LYND 2004; ZHANG et al., 2006) (Figura 9). As endoglucanases clivam as ligações no interior da cadeia de celulose, em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando novas extremidades de cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) são capazes de se ligar aos domínios cristalinos da celulose e liberarem celobiose ou glicoses a partir das extremidades da cadeia. A celobiohidrolase (CBH) pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa celulose a partir do terminal redutor liberando celobiose, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa o mesmo substrato a partir do terminal não redutor. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2009). A hidrólise completa da celulose ocorre então pela ação das β -glucosidases, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (MUÑOZ et al., 2001) (Figura 9). Os sistemas celulolíticos contêm várias exo e endo enzimas que podem apresentar preferência variada pelas formas de celulose, cristalina ou amorfa. A variação na afinidade para as várias formas de celulose é a presença do domínio de ligação a carboidratos (CBM), o qual está covalentemente ligado ao domínio catalítico das enzimas.

Todas estas enzimas são hidrolases, mas além delas outras proteínas estão envolvidas no afrouxamento da estrutura da celulose cristalina. As swolleninas são proteínas com a capacidade de afrouxar as fibras de celulose, sem a produção de açúcares redutores no meio. Os fungos produzem proteínas classificadas como enzimas auxiliares (AA9 e AA10), dependente de cobre, que promove a clivagem oxidativa de ligações β -1,4 glicosídicas de polissacarídeos, usando oxigênio molecular e um doador de elétrons. Os produtos da reação são oligossacarídeos oxidados (ISAKSEN et al., 2014).

As celulasas são produzidos principalmente por microorganismos (bactérias e fungos) (LYND et al., 2002), mas também por organismos representativos do reino animal, incluindo insetos, os moluscos, nemátodos e protozoários (WATANABE; TOKUDA, 2001).

O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* é um dos mais eficientes para a sacarificação da celulose. É constituído por no mínimo duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II), cinco endoglucanases (EG I-V) e duas β -glicosidases. Todas as endoglucanases (exceto a EG III) e celobiohidrolases de *T. reesei*, assim como muitas outras celulasas de outros microorganismos, têm dois domínios, o domínio catalítico (CD) que abriga o sítio ativo e o domínio de ligação à celulose (CBD), os quais são ligados entre si por uma estrutura polipeptídica flexível rica em serina, treonina, prolina e glicina chamada “linker” (LEE; BROWN, 1997; PALONEN et al., 2004). O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. A função do CBD está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulasas na superfície da celulose através de interações não covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas (PALONEN et al., 2004).

As cepas de *Trichoderma reesei* geralmente apresentam um complexo hidrolítico com elevados níveis de secreção de endoglucanases e celobiohidrolases e baixos níveis de secreção de celobiasas (β -glucosidases), o que pode levar ao acúmulo de celobiose e consequente inibição de outras enzimas, como endoglucanases e celobiohidrolases. Assim extratos comerciais de *T. reesei* necessitam ser suplementados com β -glucosidase, a qual tem como principal fonte *Aspergillus niger* (GUSAKOV, 2011; SINGHANIA et al., 2010).

Figura 9: Representação da matriz de celulose com regiões amorfas e cristalinas e das enzimas do complexo celulolítico agindo no substrato.

Fonte: Adaptado de SERPA; POLIKAPORV, 2011.

Devido à grande complexidade e heterogeneidade da hemicelulose, a sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas. As hemicelulases são classificadas de acordo com sua ação sobre os substratos. As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes das plantas, sua completa degradação requer a ação cooperativa de uma variedade de enzimas hidrolíticas, tais como endo-1,4- β -xilanase e 1,4- β -xilosidase (PÉREZ et al., 2002). As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) clivam as ligações glicosídicas da cadeia de xilana, as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam xilobiose a xilose (POLIZELI et al., 2005). Enquanto estas enzimas são responsáveis pela despolimerização, as enzimas acessórias clivam as ramificações: α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e α -glucuronidase (EC 3.2.1.1), removem arabinose e ácido 4-O-metilglucurônico, respectivamente, da cadeia de xilana (SAHA, 2003). As esterases (EC 3.1.1.6) hidrolisam as ligações éster existentes entre as unidades de xilose e ácido acético (acetil-xilana-esterase) e também entre arabinose e ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico (feruloil esterase) e o ácido p-cumárico (p-cumaril esterase) (Figura 10) (BATTAN et al., 2007; SAHA, 2003).

Figura 10: Representação da ação das hemicelulases na xilana.

Fonte: Adaptado ARO et al., 2005.

2.5. FATORES QUE INTERFEREM NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Para que a hidrólise enzimática da biomassa vegetal seja eficiente, é preciso que as enzimas tenham amplo acesso ao substrato. Em outras palavras, é necessário “abrir” a estrutura da fibra vegetal e da parede celular de forma a facilitar a hidrólise da celulose na presença de baixas concentrações de enzimas (CANILHA et al., 2010; ZHANG et al., 2006).

Algumas características do substrato limitam a hidrólise da celulose e da hemicelulose. A baixa porosidade de paredes celulares lignificadas impede a infiltração da enzima no material lignocelulósico não pré-tratado. Muitos grupos têm mostrado que o tamanho e volume dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas são realmente uns dos principais fatores que limitam a hidrólise da biomassa lignocelulósica (GRETHLEIN, 1985; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Diante disso, o aumento da

porosidade por meio de processos de pré-tratamento melhora significativamente a posterior hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010).

A proporção entre a celulose cristalina e a amorfa no material também é relevante, pois quanto maior o seu valor, menor a conversão enzimática (JEOH et al., 2008). Alguns estudos indicam que a cristalinidade tem maior influência nas velocidades iniciais de conversão da celulose, devido a presença das pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose, que ocasiona uma diminuição na acessibilidade das celulasas. Após este período inicial de reação, as cadeias com alto grau de empacotamento são transformadas em um material amorfo bem menos organizado, muito mais susceptível à hidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; PURI, 1984; ZHAO et al., 2012).

O grau de polimerização, determinado pelo número de unidades de glicose na cadeia da celulose, varia de acordo com a fonte e o grau de maturação da parede celular, porém não é um fator independente, pois quando modificado, a cristalinidade e a porosidade do substrato também são alteradas (FENGEL; WEGENER, 1989; ZHAO et al., 2012).

A distribuição topoquímica da lignina e da hemicelulose nas diferentes camadas e paredes das plantas impede as celulasas de se adsorverem à celulose para iniciar a hidrólise enzimática, tendo em vista que esses dois componentes se depositam sobre as fibras de celulose durante a diferenciação celular (KRISTENSEN et al., 2008; YANG; WYMAN, 2004). Adicionado a isto, a espessura variável das paredes das células em diferentes tecidos, a diversidade na distribuição celular e a quantidade de feixes fibrovasculares também interferem a ação enzimática (COSTA et al., 2013; HIMMEL et al., 2007; MOONEY et al., 1999). Siqueira et al. (2011) mostraram que 60% da celulose da medula de cana-de-açúcar foi hidrolisada por Celluclast (10 FPU) sem a necessidade do pré-tratamento. Este fato se deve a menor recalcitrância da região medular que é composta por uma grande parte por células do parênquima e pouquíssimos feixes fibrovasculares, as quais apresentam parede celular pouco espessa e menos lignificada. Essa diferença de recalcitrância entre as regiões de córtex e medula foi demonstrada através da microscopia ótica em milho (JUNG; CASLER, 2006). Cortes finos do entrenó (100 μ m de espessura) foram hidrolisados com celulasas e outras enzimas hidrolíticas do rúmen por 24h e 96h “in vitro”. Através da análise da microscopia óptica os autores mostraram que as células do córtex e os feixes vasculares eram mais recalcitrantes quando comparados com o parênquima da medula. Após o contato das enzimas com as células, uma grande parte do parênquima da medula foi degradado, permanecendo apenas os feixes de fibras e vasos.

Este trabalho também revela a diferente distribuição topoquímica da lignina e de ácidos hidroxinâmicos nas diferentes regiões, uma vez que houve uma grande degradação do parênquima medular devido sua menor recalcitrância, diferentemente do parênquima do córtex, onde houve uma pequena degradação celular pelas enzimas, provavelmente por ter mais lignina e ácidos hidroxinâmicos nestas células (Figura 11).

Figura 11: Micrografia óptica de cortes transversal dos entrenós de milho mostrando a extensão da hidrólise com celulasas provenientes de rúmen por 24h e 96h. Pith, par, scl e Rind representam: medula, parênquima, esclerênquima e córtex, respectivamente. Escala de 500µm.

Fonte: JUNG; CASLER 2006.

Grabber e colaboradores (2008), mostraram que a incorporação de ferulato na lignina aumenta a quantidade de ligações éster na parede celular, facilitando a deslignificação dos materiais lignocelulósicos pelo pré-tratamento alcalino e a degradação enzimática das fibras. Em outro estudo, as paredes celulares de milho foram lignificadas artificialmente com adições separadas de soluções de álcool sinápico, cumárico e coniferílico e com isso a digestibilidade da biota do rúmen foi diminuída em função da lignificação (GRABBER et al., 2009).

Outro pré-requisito da hidrólise da celulose por celulasas é que ocorra a adsorção das enzimas nos substratos. O grau de adsorção das celulasas na celulose é fator determinante para as taxas de conversão e rendimentos. A susceptibilidade da celulose ao

ataque enzimático é determinada pela acessibilidade dos sítios de ligação da celulase, o que determina a subsequente adsorção da enzima no substrato sólido. Entretanto, as enzimas utilizadas para hidrólise da celulose e/ou hemicelulose adsorvem-se inespecificamente à lignina. A fração de celulases e hemicelulases que se tornam improdutivas devido a esta adsorção pode chegar a 70% do total adicionado (BERLIN et al., 2005; JORGENSEN; OLSSON, 2006; LU et al., 2002). Este nível de perda de atividade das celulases e hemicelulases reforça o uso de pré-tratamento para a remoção de lignina e são vantajosos para a hidrólise dos carboidratos. Além de minimizar a adsorção improdutiva das enzimas, estes pré-tratamentos geralmente acarretam em aumento na acessibilidade à celulose (YANG et al., 2002). A ligação improdutiva das celulases à lignina previne a reciclagem das enzimas, atrapalhando uma estratégia que tem um grande impacto na viabilidade econômica do processo (GREGG et al., 1998; LEE et al., 1995; RAMOS et al., 1993; SINGH et al., 1991). Para superar esta limitação, a superfície da lignina pode ser coberta com outras proteínas (albumina, por exemplo), tensoativos não iônicos (Tween 20, por exemplo), ou polímeros (polietileno glicol, por exemplo) que bloqueiam sítios hidrofóbicos a fim de minimizar a adsorção indesejável das enzimas (ERIKSSON et al., 2002; PALONEN et al., 2004). Tais aditivos (proteína/surfactante/polímero) agem ligando-se irreversivelmente à lignina, competindo com a enzima, pelo sítio ligante da lignina, o que promove um aumento da disponibilidade de enzimas livres no meio reacional e uma maior adsorção destas à celulose (CASTRO, 2010; MAEDA et al., 2011). Porém alguns aditivos, como exemplo, BSA e surfactante podem encarecer o processo e torná-lo economicamente inviável para o uso na biorefinaria (LIU; ZHU, 2010).

Pré-tratamentos que aumentam a hidrofilicidade da lignina, são muito efetivos em reduzir a ligação improdutiva à lignina (LOU et al., 2013; NAKAGAME et al., 2011a). Um trabalho de ZHOU et al. (2013), estudou o efeito da presença de lignosulfonato (LS) na sacarificação enzimática e os resultados mostraram que LS atua como um tensoativo e melhora a sacarificação da celulose pura. Quando LS é aplicado a materiais lignocelulósicos, ele age como um surfactante que bloqueia a ligação não-produtiva entre celulase e a lignina, levando a um aumento da sacarificação enzimática. Os lignosulfonatos são co-produtos da polpação sulfito e pode também ser produzido por meio da sulfonação da lignina kraft ou por reações com sulfito em materiais lignocelulósicos, como exemplo no processo SPORL.

Além de diminuir a acessibilidade das enzimas hidrolíticas (MOONEY et al., 1998), e promover a adsorção improdutiva (PALONEN et al., 2004), a lignina ainda pode afetar negativamente à hidrólise enzimática da celulose devido à inibição por compostos solúveis derivados de sua estrutura (XIMENES et al., 2011).

A extensão da inibição de derivados de lignina é dependente da origem botânica e do tipo do pré-tratamento aplicado à matéria-prima lignocelulósica, porque ambos fatores afetam as propriedades químicas e de localização da lignina. Dependendo do método de pré-tratamento, a lignina é relocada e/ou solubilizada a partir das paredes celulares. Ambos, solubilização e relocação da lignina afetam a acessibilidade enzimática à celulose.

A lignina, os ácidos aromáticos e a hemicelulose funcionam como uma barreira física à penetração das enzimas na parede celular. A ligação lignina-carboidrato constitui outra barreira à ação das enzimas. (NAKAGAME et al., 2011b).

Os xilo-oligômeros provenientes da hemicelulose durante a hidrólise enzimática apresentam uma barreira adicional à ação da enzima por inibição da atividade de celulase (QING et al., 2010). A remoção dos xilo-oligossacarídeos ou sua conversão a xilose reduz esta inibição enzimática, assim a remoção quimicamente ou enzimaticamente dos xilo-oligômeros antes de adicionar a celulase na etapa de sacarificação enzimática é importante para aumentar a eficácia enzimática (QING; WYMAN, 2011).

2.6. TÉCNICAS DE ANÁLISE SUPERFICIAL E ESTRUTURAL DA FIBRA

Estudos das modificações físicas e morfológicas e da distribuição dos componentes na parede celular da fibra têm sido realizados por diversas técnicas, tais como a microespectrofotometria de ultravioleta, espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS), espectrometria de massas de íons secundários acoplados a analisador de tempo de voo (TOF-SIMS) e microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM). Estas técnicas em conjunto são importantes para caracterizar a superfície, a composição e a topoquímica da fibra (FARDIM et al., 2005).

2.6.1. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS)

A espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS) é uma técnica versátil, com grande potencial para a análise simultânea de componentes orgânicos e inorgânicos em superfícies de amostras com profundidade de análise de 1 nm (CONNERS; BANERJEE, 1995).

A técnica se baseia na aplicação de um feixe iônico primário sobre a amostra localizada numa câmara de alto vácuo (1×10^{-10} Torr) no aparelho TOF-SIMS (Figura 12). A interação do feixe de íons primários com a amostra resulta na dessorção dos íons secundários e neutros a partir da superfície do material. Os íons secundários resultantes são acelerados para um espectrômetro no qual sua massa é analisada por meio da medição do tempo de voo entre a superfície e o detector, gerando espectro de massa (MAHONEY et al., 2006; VICKERMAN, 2009). Como os íons secundários de diferentes massas chegam ao detector sequencialmente, é possível detectar todas as massas dos íons que são emitidas pela amostra. Assim pode ser utilizado o espectro de massa e a imagem de íons secundários para determinar a composição química e a distribuição dos vários constituintes da amostra.

As imagens são geradas através da coleção dos espectros de massa de cada ponto da superfície (correspondente a cada pixel da imagem) à medida que o feixe primário faz a varredura da superfície da amostra. Estas imagens fornecem uma importante informação da distribuição superficial da espécie química de interesse. Nas imagens ToF-SIMS, os pontos (pixels) mais claros (brancos) representam maior intensidade, ou seja, maior número de sinais nesse ponto. A intensidade do sinal depende do tipo de composto, da facilidade com que é fragmentado para os íons, do teor do composto sobre a superfície, e também da topografia. Íons secundários escapam mais facilmente a partir de partes elevadas da amostra. O efeito da topografia pode ser mostrado nas imagens de íons totais, em que todo o espectro de massa de cada pixel (ponto) está incluído na imagem.

Figura 12: (a) Instrumento esquemático TOF-SIMS e (b) Ilustração do processo de emissão do íon secundário e geração do espectro de massa.

Fonte: (a) MAHONEY et al., 2006 e (b) Disponível em <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf500582w>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2014.

A aplicação do TOF-SIMS para análise de materiais vegetais começou com a investigação de espécies inorgânicas, tais como sódio, cálcio ou fósforo e também em pesquisas na área de celulose e papel. Íons secundários característicos provenientes de lignina, carboidratos, extrativos, e metais são apropriados para a avaliação da sua localização e da distribuição espacial em tecidos e paredes celulares da madeira. Em madeira, o TOF-SIMS foi principalmente utilizado para a caracterização de fibras de celulose e superfícies de papel (FARDIM; DURÁN, 2003).

Recentemente, o TOF-SIMS tem sido aplicado no campo de pesquisa em biocombustíveis e biomassa. Jung et al. (2010) empregou TOF-SIMS para caracterizar a superfície da amostra de polpa de *Populus deltoids* (planta nativa da América do Norte)

após o pré-tratamento com ácido diluído. Na amostra pré-tratada, o conteúdo de xilana sobre a superfície foi relativamente aumentada em comparação com a amostra não tratada, enquanto que o teor de xilana em massa diminuiu significativamente após o pré-tratamento. Os resultados mostraram que a análise por TOF-SIMS pode ser utilizada para caracterizar a superfície de amostras tratadas e não-tratadas.

Zhou et al. (2011) determinou a distribuição espacial de lignina S e G na parede celular de madeira (*Populus trichocarpa*) por esta técnica e observou que a lignina guaiacil está predominantemente na parede de vaso e a siringil predomina na parede de fibra.

Além disso, TOF-SIMS pode ser utilizado como uma ferramenta para analisar a distribuição de grupos aniônicos (AGs) na superfície de fibras de madeira. Estes grupos são principalmente grupos fenólicos e ácidos carboxílicos e são relevantes na fabricação de celulose e papel. Acredita-se que o número de grupos carregados melhore indiretamente as propriedades de resistência do papel devido a melhoria no inchamento das fibras. Em função disso, a flexibilidade e a conformabilidade das fibras aumentam, favorecendo o contato entre as fibras (FARDIM; HOLMBOM, 2005; ORBLIN; FARDIM, 2010).

A composição química e a distribuição dos componentes na superfície do bagaço de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos alcalino, peróxido alcalino e hidrotrópico foram estudados utilizando a técnica de TOF-SIMS. A distribuição de lignina e extrativos na fibra foi alterada pelos pré-tratamentos. O tratamento hidrotrópico mostrou, além da diminuição da lignina e extrativos na superfície, a remoção de xilana, o que permitiu uma maior exposição da celulose na superfície da fibra após o pré-tratamento e consequentemente uma melhor conversão de celulose a glicose, em relação aos substratos tratados (MOU et al., 2014).

2.6.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS)

A espectroscopia fotoelétrica de raios-X (XPS), também conhecida como espectroscopia de elétrons para análise química (ESCA), consiste na irradiação de um material com um feixe de raios-X a um comprimento fixo de onda, provocando a emissão de elétrons a partir da sua superfície. A instrumentação consiste em uma fonte de raios-X e um detector de energia dos fotoelétrons colocados em uma câmara de vácuo. A energia cinética (E_k) destes elétrons ejetados é determinada pela diferença entre o valor da energia

da radiação incidente ($h\nu$) e a energia de ligação do elétron (E_b) segundo a equação: $E_k = h\nu - E_b$ (O'CONNOR et al., 1992). Estes elétrons são coletados pelo detector de elétrons (Figura 13) (BARR, 1994).

Figura 13: Ilustração esquemática do funcionamento do XPS.

Fonte: Adaptado de REINERT; HUFNER, 2005.

A energia de ligação obtida pela técnica de XPS é resultante do ambiente químico existente na amostra, tornando o XPS uma ferramenta importante para distinguir diferentes configurações de ligações químicas, assim como diferentes elementos. Isto possibilita a obtenção de análise química elementar quantitativa, estados de oxidação, presença de ligantes e grupos funcionais e caráter das ligações (iônicas e covalentes). O equipamento pode funcionar em alta resolução e em baixa resolução, sendo que em alta resolução fornece informações sobre as ligações e o estado químico do elemento e em baixa resolução as análises são quantitativas e qualitativas dos elementos presentes. A técnica de espectroscopia XPS fornece informações da superfície do material, tipicamente entre 2 e 10 camadas atômicas (2-20 Å). A sensibilidade da técnica está na faixa de 0,1-1,0% (porcentagem atômica), para todos os elementos da tabela periódica, exceto H e He. Pode ser utilizada para todos os materiais sólidos, estáveis em alto vácuo, condutores, como metais, isolantes, como cerâmicas, polímeros, vidros e outros (O'CONNOR et al., 1992).

A caracterização por XPS tem tido um crescimento importante nas últimas décadas, principalmente em campos multidisciplinares da ciência, tais como biomateriais, compósitos, nanotecnologia e outros.

O XPS foi utilizado para análise de fibras lignocelulósicas por Dorris e Gray em 1978. Neste trabalho, eles avaliaram a quantidade de celulose, lignina e extrativos da superfície da fibra de madeira em diferentes fases da polpação. Desde então, o XPS foi usado na avaliação da composição de superfície de materiais de celulose e papel em inúmeras investigações tais como: modificação de fibra durante a polpação e refino, análise de polpas mecânicas e quimiomecânicas, presença de grupos aniônicos em polpas quimiomecânicas (FARDIM; DURÁN, 2003; FARDIM et al., 2002; LI et al., 2012).

A concentração de lignina na superfície da fibra pode ser determinada analisando a razão entre oxigênio e carbono, em baixa resolução no XPS. Os valores teóricos O/C de celulose e lignina são 0,83 e 0,33, respectivamente, portanto, altos valores de O/C indicam baixas concentrações de lignina. Em alta resolução, os átomos de carbono presentes nos componentes da madeira podem ser divididos em quatro grandes classes: átomos de carbono ligados a átomos de carbono (C1) (C-C, C-H, C=C), átomos de carbono ligados através de simples ligação à um átomo de oxigênio (C2) (C-O ou C-O-C), átomos de carbono ligados tanto à dois átomos de oxigênio ou a oxigênio carbonílico (C3)(C=O ou O-C-O), e átomos de carbono com três ligações à oxigênio(C4) (O-C=O). Estas ligações estão presentes em celulose, hemicelulose, lignina e extrativos: C1 existe em lignina e extrativos, e somente pode referir-se a lignina quando os extrativos são removidos por acetona. C2 e C3 estão presentes na celulose e hemicelulose e C4 nos ácidos carboxílicos (ZHONG et al., 2010).

2.6.3. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

A FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) é uma técnica de emissão de campo através do microscópio eletrônico de varredura que permite a análise de estruturas nanométricas a partir de imagens em altas resoluções. A emissão de campo (FE-SEM) fornece imagens topográficas de superfícies (ORBLIN et al., 2012).

Os elétrons gerados pelo canhão de elétrons são acelerados, sem dispersão, no gradiente de campo elétrico, com vácuo. O feixe passa através das lentes eletromagnéticas,

centrando-se sobre a amostra. Como resultado deste bombardeamento, diferentes tipos de elétrons são emitidos a partir da amostra. Um detector, portanto, capta os elétrons secundários e fornece a imagem.

Os microscópios eletrônicos de varredura oferecem vantagens, incluindo alta aplicação, grande profundidade de foco, ótima resolução e facilidade de preparação da amostra e sua análise. Além disso, como o feixe de elétrons produzidos pela fonte do FE-SEM é cerca de 1000 vezes menor em espessura que a de um microscópio padrão, a qualidade da imagem é nitidamente melhorada. FE-SEM tem sido um método recomendado por possuir o benefício de maior resolução do que as convencionais microscopias eletrônicas de varredura e a sua resolução lateral é tão alta quanto 2nm (FROMM et al., 2003).

2.6.4. Microespectrofotometria de ultravioleta

Microespectrofotometria UV é uma técnica utilizada para a detecção topoquímica de lignina e compostos aromáticos em paredes celulares das plantas e de outros materiais. A técnica baseia-se na retenção de luz ultravioleta incidida em seções transversais com cerca de 1 μm do tecido a ser analisado em comprimentos de onda definidos. A partir de uma área pré-selecionada de absorção são gerados espectros em um determinado comprimento de onda. A absorção da luz está principalmente relacionada com a presença de duplas ligações e do grupo carbonila dos compostos analisados. Conhecendo o comprimento de onda de absorção da molécula em estudo é possível analisar a distribuição desses componentes na parede celular e em diferentes células (KOCH; KLEIST, 2001; LYBEER; KOCH, 2005). Na parede celular de plantas, para quantificar a lignina e ácidos hidróxinâmicos utiliza-se os comprimentos de onda entre 278-285 nm e 315-320 nm, respectivamente.

A lignificação individual das camadas da parede celular e a deposição de compostos fenólicos também podem ser estudadas pela análise de microespectrofotometria no UV (KOCH; SCHMITT, 2013). As camadas da parede celular dos vasos são geralmente caracterizadas por valores de absorbância maiores do que a das fibras, devido a composição química diferente de lignina em ambos tipos celulares. Fergus e Goring (1970) e Terashima et al. (1986) demonstraram que a lignina localizada nas paredes dos

vasos em madeira é constituída predominantemente por unidades do tipo guaiacil, enquanto que a lignina da parede da fibra contém mais unidades de siringil.

A distribuição de lignina e ácidos hidroxicinâmicos em diferentes regiões de cana de açúcar foi estudada por He e Terashima (1990 e 1991). Estes autores demonstraram que a lignificação dos vasos ocorre no estágio de maturação celular seguido pela lignificação das fibras e que nas células de parênquima há predominância de ácidos hidroxinâmicos, ao invés de lignina.

Siqueira et al. (2011) estudaram a distribuição topoquímica de lignina e ácidos hidroxicinâmicos por microespectrofotometria no UV em paredes celulares de cana de açúcar deslignificadas por clorito em meio ácido. A análise destas regiões deslignificadas mostrou uma correlação inversa entre o teor de lignina, as absorbâncias a 280 nm e 315 nm de fibras e vasos com a conversão de celulose.

No trabalho de Costa et al. (2013), a distribuição topoquímica dos ácidos hidroxicinâmicos e da lignina presentes em três tipos de células (fibra, vaso e parênquima) das regiões medula, interface, córtex e fração externa dos entrenós de híbridos de cana-de-açúcar foram avaliados. Para todos os híbridos, os vasos e fibras apresentaram bandas de absorção definidos em 285 e 315 nm, indicando que tanto a lignina e ácidos hidroxicinâmicos estavam presentes nas paredes celulares. Em contraste, as células de parênquima apresentaram apenas uma banda dominante em 315 nm, o que sugere que os ácidos hidroxicinâmicos foram o componente aromático predominante nesse tipo de célula. As intensidades de absorção das paredes das células aumentaram no sentido medula para a fração externa em todos os híbridos.

2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os trabalhos utilizados para esta revisão indicam que a cana-de-açúcar apresenta tipos celulares que variam em número e distribuição no colmo da planta. As várias técnicas espectroscópicas usadas para o mapeamento dos constituintes da parede celular mostram que a baixa recalcitrância das células de parênquima está relacionada à espessura da parede secundária e ao seu baixo nível de lignificação, quando comparada às fibras e vasos. Além da complexidade anatômica, os componentes lignina, hemicelulose e ácidos hidroxinâmicos também limitam a hidrólise da celulose. Estes efeitos têm sido avaliados

por muitos autores em diferentes materiais lignocelulósicos e os resultados mostram que a remoção de lignina e hemicelulose, mesmo que parcial, melhora a conversão enzimática da celulose.

Devido à importância da lignina e hemicelulose na eficiência de conversão enzimática da celulose, a primeira abordagem do trabalho foi avaliar o tempo do pré-tratamento sulfito-alcalino do bagaço de cana com a intenção de analisar este efeito na remoção de componentes e na digestibilidade enzimática. Além da remoção de lignina, também foi avaliada a incorporação de grupos sulfônicos e a capacidade de retenção de água pelas fibras. Essas características são críticas para facilitar a permeação das enzimas através da parede celular no material pré-tratado.

Em vista dos resultados de pré-tratamento sulfito alcalino do bagaço, uma segunda abordagem consistiu em avaliar o efeito deste pré-tratamento nas regiões do colmo da cana. Foi verificado que a região da medula é facilmente digerida por uma mistura de enzimas comerciais e que a deslignificação promove a diminuição expressiva da recalcitrância do córtex. Assim, um ciclo de experimentos de pré-tratamento sulfito alcalino foi realizado com as regiões da cana com o objetivo de avaliar a extensão e a relevância do tempo de pré-tratamento em fibras, vasos e células de parênquima de híbridos de cana com teores contrastantes de componentes.

Neste contexto, a abordagem deste trabalho visa colaborar com o entendimento do efeito do pré-tratamento sulfito alcalino sobre as canas visando a seleção de híbridos mais adequados a este tipo de pré-tratamento e a conversão de celulose.

3. OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi avaliar as modificações químicas e estruturais causadas pelo pré-tratamento sulfito-alcalino no bagaço e na cana-de-açúcar e entender como essas modificações influenciam a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do tempo de pré-tratamento sulfito alcalino na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar;
- Analisar a morfologia e a ultra-estrutura de canas pré-tratadas com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$;
- Avaliar a distribuição dos constituintes químicos em diferentes regiões e tipos celulares do colmo da cana de açúcar após pré-tratamento sulfito alcalino;
- Relacionar as características físico-químicas do material pré-tratado com o rendimento de hidrólise da celulose e hemicelulose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E BAGAÇO

Cinco variedades de canas foram avaliadas neste estudo, entre as quais quatro híbridos foram identificados com os códigos 89, 58, 146, 140 e uma cana proveniente de uma propriedade particular de São José dos Campos que foi denominada como cana referência. Este cultivar corresponde a uma variedade usualmente plantada em fazendas de pequeno porte e muito utilizada para a alimentação animal e para a produção de garapa. Os híbridos foram obtidos de cruzamentos e selecionados a partir de um grupo de plantas com teores variados de lignina. A colheita dos caules foi feita com 16 meses de cultivo, correspondendo, portanto, as plantas maduras de cana de açúcar. Cada caule colhido foi devidamente numerado, os 2 primeiros entrenós desde a base e os 2 últimos desde o topo foram descartados. As pontas foram seladas com filme de PVC e então armazenados a -18 °C até o momento de uso. A composição química dos híbridos foi determinada por Masarin et al. (2011), e reportada na Tabela 1.

O bagaço de cana-de-açúcar usado neste trabalho foi obtido da Companhia Açucareira do Vale do Rosário, Orlândia, SP.

Tabela 1: Composição química das canas-de-açúcar

Amostras	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Ferúlico (%)	Cumárico (%)	Extrativos (%)
89	16,8±0,1	27,3±0,3	40,3±0,1	1,6±0,1	5,7±0,6	7,5±0,1
58	18,6±0,1	26,3±0,1	40,9±0,3	1,4±0,2	7,6±1,3	2,6±0,2
146	18,6±0,1	31,6±0,8	40,9±0,3	2,0±0,1	8,7±0,7	2,4±0,1
140	21,5±0,2	27,0±0,3	38,2±0,5	1,0±0,1	5,2±0,3	5,1±0,5

4.2. SEPARAÇÃO DAS REGIÕES DO COLMO DAS CANAS

Os colmos das canas-de-açúcar foram separados em função das regiões típicas existentes nos entrenós e corresponderam às frações de medula, interface, córtex e fração externa, conforme ilustrado nas Figuras 14 e 15.

Os colmos das canas foram cortados em blocos circulares de aproximadamente 2,5-3 cm no sentido longitudinal. A fração externa da cana foi retirada com auxílio de um estilete e o restante foi marcado com circunferências que acompanham a divisão do raio (R) em 3 partes iguais. As três regiões delimitadas foram então cortadas em pedaços com cerca de 0,8 x 0,8 x 2,5 cm no sentido longitudinal utilizando um estilete. A região mais interna da cana corresponde à medula, a mais externa corresponde ao córtex e entre essas duas regiões há uma fração denominada de interface (COSTA, 2012).

Figura 14: Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões da cana.

Fonte: COSTA, 2012.

Figura 15: Foto ilustrativa dos fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó das canas. As quatro frações estão indicadas: A - Fração externa; B - Córtex; C - Interface; D - Medula.

Fonte: COSTA, 2012.

Para eliminação da sacarose, todas as frações foram submetidas à extração em Soxhlet com água destilada. A extração prosseguiu até que não houvesse a presença de açúcar na água de extração (cerca de 5 ciclos de 8 h cada um). O teor de açúcares totais na água concentrada no balão de extração foi determinado através do método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1976). O critério utilizado para definir o término da extração foi a ausência de cor no teste supracitado. O teste em questão foi feito com a mistura de 1 mL de amostra, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 25 µL de fenol 80%. Os tubos foram agitados e resfriados a temperatura ambiente e a cor desenvolvida foi avaliada visualmente. As amostras livres de sacarose foram armazenadas na geladeira em solução de azida sódica (0,01%). Cerca de 20g (m.u) de cada região das canas foram secas ao ar e moídas em moinho de facas com malha de 25 mesh para realização da análise composicional.

4.3. TRATAMENTO SULFITO ALCALINO

Vinte gramas de amostra de cana-de-açúcar ou de bagaço foram colocadas em um kitassato de 500 ml e fez-se vácuo por 30 minutos. Em seguida, cada material foi impregnado com solução 10% Na_2SO_3 e 5% NaOH (m/m) por 15 min na proporção final de amostra para líquido de 1:10 (p/v). As reações foram conduzidas por 30 min, 60 min, 90 min e 120 min a 121°C. Após cada tempo de pré-tratamento, as amostras foram lavadas com um litro de água e filtradas em funil de Buchner. Durante esta etapa, a água de lavagem foi recirculada para retenção dos finos, até turbidez constante, medida em espectrofotômetro a 600 nm. O pH da água de lavagem foi determinado, ficando entre 6-7. Para o bagaço, após as lavagens sucessivas, seguiu-se com a etapa de desfibramento em um liquidificador com 750 mL de água por 15 minutos. O material foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos e o rendimento do processo foi determinado com base na relação entre a massa seca final pré-tratada e a massa seca inicial da amostra.

4.4. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Os ensaios foram realizados com os bagaços pré-tratados e com cada região da cana: medula, interface, córtex e fração externa. Cada região da cana foi moída a 25 mesh em moinho de faca antes de realizar a hidrólise enzimática. As reações foram conduzidas a 2% de consistência em tubos de centrífuga de 50 ml contendo 10 ml de solução tampão acetato de sódio 50 mM com 0,01% de azida sódica, pH 4,8 e com a mistura de enzimas Celluclast - Sigma (10 FPU/g de amostra) e Novozym 188 Sigma - (beta-glicosidase 20 UI/g de amostra). Os tubos foram fechados e inclinados a 45° em um banho-maria a 45 °C sob agitação de 120 rpm.

Amostras do meio reacional (700 µl) foram retiradas nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 96 h e em seguida fervidas por 5 min para interromper a reação enzimática. Após o resfriamento, foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram analisados por HPLC para determinação dos teores dos açúcares, glicose e xilose. A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada pela relação entre a concentração de glicose obtida após a hidrólise e a concentração potencial no bagaço (Equação 1). A conversão de hemicelulose (CEH) foi determinada pela análise da xilose obtida e a concentração potencial de xilose (Equação 2).

$$\text{CEC (\%)} = ((\text{Glicose})/(\text{glicose potencial})) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{CEH (\%)} = ((\text{Xilose})/(\text{xilose potencial})) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Glicose (potencial)} = \% \text{ celulose} \times \text{massa amostra (seca)} / F_c$$

$$\text{Xilose (potencial)} = \% \text{ xilana} \times \text{massa amostra (seca)} / F_c$$

Onde: F_c = fator de conversão (0,9 para a celulose, 0,88 para a hemicelulose)

4.4.1. Determinação da atividade de Celulases totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por GHOSE (1987) e os açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), uma tira de papel de filtro 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático (Celluclast 1,5 L- Novozymes). Os respectivos brancos (enzima e substrato) e diferentes diluições do padrão de glicose (10 mg/ml) foram submetidos às mesmas condições experimentais para construção da curva de calibração. A reação foi mantida em banho-maria a 45°C por 60 minutos. Após o período de reação, adicionou-se 3 mL de reagente DNS e aqueceu-se a mistura a 100°C por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada e a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro.

Para o cálculo da atividade de celulases totais (FPU), primeiramente foi estimada a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose. Para isso os extratos enzimáticos foram preparados na diluição de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400 para o ensaio da atividade. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva de calibração e usados para construir um gráfico relacionando as diluições das enzimas com a quantidade de glicose liberada. Após encontrar a diluição enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose correspondente a 4% de conversão da celulose a atividade foi determinada de acordo com a equação 3:

$$\text{FPU/ml} = \frac{0,37}{\text{Diluição enzimática que liberou 2 mg de glicose}} \quad \text{Eq.(3)}$$

O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 micromol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra e o tempo de reação.

Para a construção da curva padrão de glicose foi preparada uma solução de glicose 10 mg/mL. Alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram adicionadas em 4 tubos e em cada tubo foi adicionado diferentes volumes (4,0; 2,0; 1,0 e 0,1 mL) de tampão acetato de sódio 50mM pH4,8. A curva de calibração de glicose foi construída através da relação da massa de glicose em 0,5 mL (1,0; 1,6; 2,5 e 3,4 mg) e a absorbância em 540 nm, utilizando 0,5ml de cada solução, 1,0 ml de tampão e 3,0 ml de DNS.

4.4.2. Determinação da atividade de β -Glicosidase

Foram adicionados 0,8 mL de solução de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) 0,1% e 0,2 mL de solução enzimática em tubo de ensaio e incubado a 45°C por 30 min. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10% e feita a leitura da absorbância a 410 nm. Uma amostra controle foi preparada adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10% no início da reação e essa solução foi usada para calibrar o aparelho (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987).

O *p*NP liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*-nitrofenol nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidase corresponde a formação de 1 μ mol de *p*NP por minuto.

4.5. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

O teste de adsorção das proteínas presentes na mistura de Celluclast e Novozym foi feita separadamente na medula, interface, córtex e fração externa da cana.

Preparação dos ensaios

As amostras de cada região das canas foram secas ao ar e moídas a 25 mesh. Os ensaios foram realizados em tubos falcon contendo 0,2 g de amostra, 356,7 μ l de Celluclast – Sigma, 562,3 μ l de Novozym 188 Sigma e tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8) com volume total da reação de 10 mL. Foram feitos dois ensaios controles, um deles com tampão e extrato enzimático e o outro com o tampão e a amostra de cana. Após as 3h de incubação a 4 °C, os tubos falcon foram centrifugados a 4500 rpm por 10 min a 4 °C. A determinação de proteínas foi feita no sobrenadante da solução com o teste de ninidrina.

Teste de ninidrina

Foram adicionados 100 μ l do sobrenadante (descrito acima) em tubos criogênicos de 2 ml com rosca e 300 μ l de HCl 9M. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e

incubados a 105°C em estufa por 24h. Depois disso, os tubos foram resfriados a 4°C, homogeneizados no vórtex e foi feita a transferência de 200 µl da suspensão para outro tubo criogênico contendo 200 µl de NaOH 5M. As soluções foram homogeneizadas novamente e acrescentou-se 400µl de ninidrina 2% (Sigma). Em seguida foi feita a homogeneização das amostras e foram colocadas na estufa a 105 °C por 20 minutos. As amostras foram resfriadas a 4°C e em cada tubo foi adicionado 1 ml de etanol 50%, seguida da leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

A curva padrão foi construída com soluções de albumina do soro bovino (BSA) 100, 200, 400, 600, 850 µg/mL, sob as mesmas condições realizadas com as amostras (STARCHER, 2001). A quantidade de proteínas adsorvida foi determinada pela diferença da quantidade de proteína adicionada e quantidade de proteína presente no sobrenadante da solução e foi expressa em mg/g de amostra.

4.6. ANÁLISES MICROSCÓPICAS DO BAGAÇO E DA CANA-DE-AÇÚCAR

4.6.1. Microscopia óptica

Uma pequena porção das fibras de bagaço foram imersas em 1 ml de água destilada e agitadas por 5 minutos. As amostras foram colocadas em uma lâmina de vidro usando um conta-gotas e foram cobertas com lamínula antes de serem visualizadas ao microscópio óptico (Coleman M103) com lente de 40x. Aproximadamente 10 fibras de cada amostra foram analisadas.

4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar previamente secas ao ar foram fixadas em suporte de alumínio, com fita de carbono e observadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO modelo 1450VP - Carl Zeiss, São Paulo, Brasil). Para obtenção das

imagens, foi utilizado um detector de elétrons secundários de baixo-vácuo com pressão de 40 Pa.

Foi feita a determinação semi-quantitativa do elemento enxofre por microanálise de raios-X, em pontos específicos da imagem, utilizando o detector de dispersão de energia (EDS) e o programa INCA-ENERGY da OXFORD. Através da análise dos picos obtidos no espectro foram determinadas as porcentagens de enxofre presente na amostra antes e após o pré-tratamento sulfito-alcalino.

4.6.3. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

As amostras de cana previamente secas ao ar foram colocadas em um suporte com dupla fita de carbono e coberta com carbono utilizando o equipamento TB 500 Temcarb. As imagens foram obtidas ao microscópio (LEO 1530 Gemini) com uma voltagem de aceleração de 8 kV e com uma distância de trabalho entre 8 e 11 mm. As imagens foram visualizadas com aumento de 1500x. (MOU et al., 2013).

4.7. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DAS REGIÕES DA CANA

4.7.1. Microespectrofotometria no ultravioleta

a) Preparo das amostras

As amostras de medula, interface, córtex e fração externa das canas previamente estocadas em água e azida sódica (0,01%) em geladeira, foram cortadas em pequenos blocos (1x1x5mm), transferidas para tubos eppendorfs de 2 mL com água destilada e mantidas por 24 horas em repouso para remoção de azida. A água foi retirada e as amostras foram desidratadas usando uma série de soluções de acetona (sequencialmente 25, 33 e 100 %) por 20 minutos em cada etapa. A última solução foi trocada três vezes. As amostras desidratadas foram embebidas em uma resina epoxídica (SPURR, 1969).

A resina foi preparada usando os reagentes do kit SIGMA/Aldrich (Spurr Low-Viscosity Embedding Kit - EM0300). Em um frasco de vidro de 30 ml os componentes da resina foram misturados na seguinte proporção: 4,1 g de ERL (resina epóxi ciclo alifática), 5,9 g de NSA (anidrido succínico nonenyl) 1,43 de DER (éter diglicídico de polipropileno glicol) e 0,1 g de DMAE (dimetilamino-etanol). O frasco foi colocado em uma placa de agitação magnética por 20 minutos para a homogeneização da resina.

A etapa de infiltração das amostras foi feita em tubos de eppendorf com gradientes de resina epóxi - acetona por 72 horas com troca a cada 24h como se segue: 1:1 acetona: resina, 100% resina e 100% resina.

Após a infiltração das resinas nas amostras foi realizada a etapa de inclusão. Para isso utilizaram-se bandejas de silicone com cavidades para colocar a resina epoxídica na qual cada amostra foi mergulhada na posição longitudinal nas respectivas lacunas (Figura 16). As lacunas foram completadas com resina epoxídica usando pipeta Pasteur. As bolhas foram removidas com o auxílio de uma agulha antes da bandeja ser colocada na estufa a 70°C por 48 horas para secagem da resina.

O cilindro de resina contendo a amostra foi desbastado manualmente, a fim de formar uma região piramidal em uma das extremidades. Em seguida foi utilizado o ultramicrotomo (LEICA EM-UC7) com uma faca de vidro para obtenção de uma superfície lisa e posteriormente feito o corte de espessura de 1 µm com a faca de diamante (4mm-Histo, DIATOME). Os cortes foram transferidos para lâminas de quartzo e secas à temperatura de aproximadamente 40°C em chapa de aquecimento para obtenção de espectros.

Figura 16: Amostras impregnadas com resina epoxídica.

Fonte: Arquivo pessoal.

b) Obtenção de imagens e espectros

As amostras foram analisadas no microespectrofotômetro ZEISS MSP800 equipado com um detector UV-visível. Os espectros de UV foram registrados a partir de uma área com $1\ \mu\text{m}^2$ focadas na parede secundária de cada amostra. A obtenção dos espectros foi feita pelos programas: TIDA DASQ e TIDA VISION. Pelo menos 20 espectros foram registrados a partir de cada tipo de célula individual (vaso, fibras e parênquima). As absorções a 285 e 315 nm foram utilizadas para detectar a distribuição topoquímica dos componentes aromáticos. Foram selecionados os espectros referentes a cada tipo celular com desvio máximo de 20% do valor de absorbância a 285 nm e 315 nm. Uma ilustração de corte, visto ao microscópio, é mostrada na Figura 17 e a área mostrada em vermelho ilustra um quadrado de 1 micrômetro, região da qual é possível obter os espectros UV.

Para obtenção das imagens, as amostras não tratadas foram preparadas como descrito no item 4.7.1. e coradas com azul de toluidina 1% (1 g de azul de toluidina e 100 ml de água) por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora as lâminas foram lavadas com água destilada, para retirar o excesso de corante. Em seguida, foram secas à temperatura de aproximadamente 40°C sobre uma chapa de aquecimento. Também foram feitas imagens sem impregnação com azul de toluidina, as quais foram analisadas nas lâminas de quartzo após a obtenção dos espectros. Estas imagens foram obtidas no microscópio ZEISS MSP800 em objetiva de 25 e 50 vezes de aumento.

Figura 17: Ilustração de corte de cana de açúcar fixado em resina epoxídica e visto ao microscópio no aumento de 400 vezes. O quadrado ilustrado em uma célula da região central da imagem mostra a área submetida à análise micro-espectrofotométrica.

Fonte: Arquivo pessoal

4.7.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio - X (XPS)

As amostras (aproximadamente 3 g) foram extraídas com solução contendo 135 ml de acetona e 15 ml de água destilada por 5 horas no aparelho soxhlet e posteriormente foram secas ao ar.

As análises de XPS foram realizadas no Top Analytica Ltd. com Physical Electronics PHI Quantum 200 XPS equipado com uma fonte de Raio-X monocromática AlK. O ângulo de saída era 45 ° em relação à superfície da amostra. Pelo menos cinco pontos diferentes de 100 µm foram analisados em cada amostra. Para identificar todos elementos presentes na superfície da amostra foi feito um escaneamento com a energia de passagem 187 eV e tempo de exposição 3,5 min. Em seguida, as proporções de C, O, N e S foram investigados escaneando somente os elementos em questão. A energia de passagem foi 93 eV e o tempo de exposição foi 1,92 para C e O e 7,68 para N e S a fim de compensar as menores quantidades destes elementos. Para detectar o estado químico do carbono na superfície da amostra foi feito o escaneamento em alta resolução. A energia de passagem foi de 23 eV e o tempo de exposição 7,6 min. Os dados foram plotados através do software fornecido pelo fabricante do instrumento (MultiPak v6.1A, Physical Electronics). As relações O/C foram calculadas a partir dos espectros obtidos, com os fatores de sensibilidade fornecidos pelo instrumento. As curvas parciais nos espectros C1s das amostras são alquil carbono (C-C ou C-H), carbono com uma ligação com o oxigênio (C-O), carbono com duas ligações com oxigênio (O-C-O ou C=O) e carbono com três ligações com o oxigênio (O=C-O), denominados de C1, C2, C3 e C4, respectivamente. A energia de ligação do C1 é $(285 \pm 0,3)$ eV (DORRIS; GRAY, 1978). As localizações dos outros picos são $(1,7 \pm 0,3)$ eV (C2), $(3,1 \pm 0,3)$ eV (C3) e $(4,6 \pm 0,3)$ eV (C4).

Uma referência de papel de filtro foi utilizada e extraída (Schleicher & Schuell Blue Ribbon), conforme supracitado durante 5 horas, esta referência representou o O/C e os valores obtidos a partir de C1 da celulose pura. Foi assumido que todos os extrativos foram removidos.

A quantidade de lignina na superfície (ϕ lignin) foi calculada pelo método O/C (STRÖM; CARLSSON, 1992), equação 4:

Eq. (4)

$$\varphi_{lignin} = \left[\frac{\left(\frac{O}{C}\right)_{extracted} - \left(\frac{O}{C}\right)_{cellulose}}{\left(\frac{O}{C}\right)_{lignin} - \left(\frac{O}{C}\right)_{cellulose}} \right] * 100\%$$

Onde a O/C (celulose) e O/C (lignina) são valores teóricos de 0,83 e 0,33, respectivamente, em amostras consideradas extraídas.

4.7.3. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS)

As amostras (aproximadamente 3 g) foram extraídas com solução contendo 135 ml de acetona e 15 ml de água destilada por 5 horas no aparelho soxhlet e posteriormente desintegradas em um liquidificador para o desfibramento durante 20 min com 2 L de água a 25 ° C. As suspensões de fibras foram filtradas através de papel de filtro, transferidos para placas de Petri e secas ao ar. A superfície das fibras foi analisada por ToF-SIMS (Physical Electronics PHI TRIFT II) no Laboratório Top Analytica Ltd., em Turku, Finlândia. As medições foram feitas usando um feixe de íons primários de íon gálio $^{69}\text{Ga}^+$. No equipamento, foi utilizada uma aceleração de voltagem de 25 kW, as análises foram feitas pelo menos duas vezes no modo íon positivo, na qual utilizou-se uma dimensão de varredura de 100 μm x 100 μm e também foi feita uma medição no modo íon negativo com a mesma dimensão e o tempo de aquisição foi de 6 min. Os dados foram analisados no software fornecido pela WinCadence.

A distribuição de lignina na superfície das fibras foi determinada no Tof-SIMS através dos espectros de massa característicos da lignina a saber: m/z 107 e 121 de p-hidroxifenil, m/z 137 e 151 de guaiacil, m/z 167 e 181 de siringil (SAITO et al., 2005), m/z 77 e 91 de anel aromático geralmente (GOACHER et al., 2012; KOLJONEN et al., 2003). Para a detecção de carboidratos e análise de sua distribuição na superfície da amostra, os picos mapeados foram m/z 115, 133, 127, e 145 (FARDIM; DURÁN, 2003).

4.8. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE CANA

Cerca de 3 g de amostra moída (25 mesh) foi extraída com 95% de etanol por 6 h, em um aparelho Soxhlet. A amostra extraída foi hidrolisada com 72% de ácido sulfúrico a 30 °C por 1 h (300 mg de amostra e 3 ml de ácido sulfúrico). À solução foram adicionados 79 ml de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado por 1 h a 121 °C. O material resultante foi resfriado, filtrado em filtro de vidro poroso (Schott número 3) e seco até massa constante, a 105 °C. A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria e a solúvel por espectrofotometria a 205 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm. A fração solúvel foi filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC com uma coluna BioRad HPX87H a 45 °C. A eluição foi feita com 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 ml/min e os açúcares detectados por índice de refração (FERRAZ et al., 2000). A partir destas concentrações foram calculados os teores de glucana, xilana e acetil das amostras multiplicando as porcentagens de cada composto, glicose, xilose e arabinose, ácido acético por 0,9; 0,88 e 0,72; respectivamente. Os fatores mencionados se referem à adição de água aos polímeros durante a hidrólise ácida (Equações 5 e 6).

$$\% \text{ Celulose} = ((Gli \times 0,9) \div m) \times 100 \quad \text{Eq.(5)}$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = ((Xil \times 0,88 + Ara \times 0,88 + Aa \times 0,72) \div m) \times 100 \quad \text{Eq.(6)}$$

onde: Gli = concentração de glicose (g/L); Xil = concentração de xilose (g/L); Ara = concentração de arabinose (g/L); Aa = concentração de ácido acético (g/L); m = massa seca da amostra inicial (g).

A remoção de celulose, hemicelulose e lignina nas amostras tratadas foi determinada de acordo com a Equação 7, em que: C = Teor do componente no material pré-tratado, c = Teor do componente no material não tratado .

Remoção do componente no bagaço (%) = $(100 - ((c \div C) \times 100))$ e remoção na fração da cana (%) = $((c-C)/c) \times 100$ (Eq. (7))

A taxa de remoção de lignina em relação ao tempo de pré-tratamento foi calculada de acordo com a Equação 8 :

$$\Delta \text{ lignina/ Tempo: (Lignina inicial - Lignina final) /Tempo} \quad \text{Eq. (8)}$$

4.9. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS ÁCIDOS

Os grupos ácidos dos materiais tratados pelo processo sulfito-alcálico foram determinados de acordo com Beatson (1992). À amostra (1,5 g massa seca) foi adicionado 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M que permaneceu sob agitação por 45 min. A amostra foi lavada com água deionizada e filtrada até condutância constante de aproximadamente 8µS/cm (condutividade da água deionizada). Ao material foram adicionados 225 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,001 M e 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M e mediu-se a condutividade inicial.

A suspensão de amostra foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 M, com adição de volumes de 0,5 ml até que a condutividade se aproximasse do valor inicial. Com os valores da condutividade e dos respectivos volumes de hidróxido de sódio foi construído o gráfico para determinação do ponto de mínimo. O conteúdo de grupos ácidos foi expresso pela equação 9:

$$\text{Conteúdo de ácido} = \frac{AM_1 - VM_2}{W} \text{ mmol kg}^{-1} \quad \text{Eq. (9)}$$

onde: A é o ponto de mínimo no gráfico (em mL), M_1 é a molaridade do NaOH , M_2 é a molaridade do HCl, V é o volume de ácido clorídrico (em mL), W é a massa seca de lignina na amostra (em kg).

4.10. DETERMINAÇÃO DO VALOR DE RETENÇÃO DE ÁGUA (WRV)

O valor de retenção de água foi determinado de acordo com Guo et al. (2011) (Figura 18). As amostras (1% m/m) foram imersas em água destilada por 24 h. Após este período, as amostras úmidas foram transferidas para um aparato de centrifugação composto por módulo de ultrafiltração, tubo de 50 mL e malha de aço com abertura de 200 mesh (Figura 18). A adaptação da malha de aço no módulo de ultrafiltração, possibilitou a remoção da água não retida pelas amostras por meio de centrifugação a 4500 rpm por 15 min a 25 °C. Finalmente, as amostras foram secas até massa constante em estufa a 105 °C. Utilizando o valor das massas da amostra úmida e seca, o WRV foi calculado pela equação 10:

$$\text{WRV (\%)} = [(\text{Massa úmida} - \text{Massa seca}) / \text{Massa seca}] \times 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

Figura 18: Representação esquemática do processo de determinação do valor de retenção de água.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir de replicatas foram submetidos à análise de variância através do programa Statgraphics plus. As médias foram avaliadas segundo o teste de Multiple Range a um nível de 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRÉ-TRATAMENTO SULFITO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O processo sulfito alcalino foi usado no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, em condições previamente definidas por Mendes et al. (2011), visando a sua sacarificação enzimática. Neste estudo, foi demonstrada a alta eficiência da hidrólise de celulose (85%) mesmo com modesta deslignificação (50%) e um alto rendimento do processo sulfito alcalino com tempo de cozimento de 120 minutos. Diante disso, propôs-se a realização do cozimento do bagaço por tempos menores e foram avaliadas as modificações nos bagaços pré-tratados e seu efeito na hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

5.1.1. Caracterização físico-química do bagaço

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH a 121 °C por tempos variados está mostrada na Tabela 2. O rendimento do material pré-tratado atingiu cerca de 75 % após os primeiros 30 minutos de reação. Dados do balanço de massa indicaram que a maior parte da remoção de lignina e hemicelulose ocorreu durante os primeiros 30 min, atingindo 53 % e 30 % de remoção, respectivamente. A perda de celulose foi inferior a 14% confirmando que o processo sulfito-sulfito é um pré-tratamento que preserva a maior parte dos carboidratos (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; FENGEL; WEGENER, 1989; MENDES et al., 2011).

Tabela 2: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar tratado com solução sulfito alcalino em diferentes tempos.

Tempo de cozimento (min)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Rendimento (%)	Lignina g/100g de bagaço inicial	Celulose g/100g de bagaço inicial	Hemicelulose g/100 g de bagaço inicial
0	24,4±0,09	43,7±1,71	27,4±1,27	100	24,4	43,7	27,4
30	15,3±0,15	49,8±1,12	25,5±0,44	75,2	11,54	37,5	19,2
60	14,7±0,20	51,2±2,06	25,7±1,85	76,2	11,21	39,0	19,6
90	14,2±0,41	51,1±0,67	25,0±0,47	73,1	10,41	37,3	18,3
120	11,2±0,19	52,2±3,04	26,6±0,75	74,0	8,30	38,6	19,7

O tratamento químico por tempos variados resultou em maior solubilização da lignina que dos outros componentes (Tabela 2). Estes dados corroboram com o estudo de Koch et al. (2003) , no qual a variação nos tempos de cozimento (30 min a 270 min) do tratamento sulfito alcalino/antraquinona ou bissulfito de magnésio gerou diferentes substratos de *Picea abies* com quantidades distintas de lignina. Neste trabalho os autores observaram que a fração celulósica em ambos os processos foi preservada e o aumento do tempo da reação ocasionou uma maior deslignificação.

Além da redução no teor de lignina e hemicelulose através do pré-tratamento, é sabido que outras propriedades químicas e também físicas dos materiais lignocelulósicos são particularmente afetadas por pré-tratamentos alcalinos. Os valores de retenção de água (WRV), os teores de ácidos totais e a dimensão das fibras foram determinados nos bagaços pré-tratados com o propósito de obter informações sobre a hidrofiliabilidade ou a capacidade das fibras de reter água e inchar (Tabela 3). Com o pré-tratamento sulfito alcalino espera-se um aumento do teor de grupos iônicos e a clivagem de algumas ligações interpoliméricas, incluindo ligações lignina-carboidrato. Como o pré-tratamento introduz íons sulfito, ocorre a sulfonação da lignina, o que aumenta a retenção de água da fibra e melhora a dissolução da lignina (BIERMANN, 1993; KONN et al., 2006).

Os resultados mostraram um aumento significativo da retenção de água entre o bagaço não tratado e após 30 min de cozimento. Após este tempo de pré-tratamento, não se observou um aumento significativo dos valores de retenção de água, atingindo um patamar de aproximadamente 200%. Esse resultado correlacionou-se com a deslignificação do bagaço (Tabela 2), e também indicou uma saturação da fibra nessas condições. Em um estudo feito por Kumar et al. (2011), foram utilizadas amostras de madeira (*Pseudotsuga*

menziesii) pré-tratadas a vapor e deslignificadas pelo método de clorito-ácido para analisar o efeito do teor de lignina na capacidade de retenção de água. A amostra controle (42,8% de lignina) foi tratada e obtiveram quatro amostras com teores de lignina decrescentes: 38,2, 29,7, 22,4 e 10,9% e também uma amostra completamente deslignificada. Neste trabalho, foi observado que a concentração de lignina correlacionou negativamente com o valor de retenção de água, ou seja, amostras com menor teor de lignina retiveram maior quantidade água. A amostra não deslignificada apresentou valor de WRV de 121,3%, enquanto que as amostras deslignificadas apresentaram valores de 150,9, 177,2, 195,4 e 219,7%, respectivamente. Assim, os autores concluíram que a remoção de lignina ocasiona uma melhoria na capacidade de intumescimento do material.

Tabela 3: Características químicas e físicas do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado

Tempo de tratamento (min)	Valor de retenção de água (%)	Total de grupos ácidos (mmol/Kg de lignina)	Porcentagem de enxofre por EDS - MEV	Largura da fibra em μm
0	146 $\pm$ 8 ^a	293 $\pm$ 26 ^a	0,02	10,4 ^a
30	182 $\pm$ 7 ^b	420 $\pm$ 3 ^b	0,24	16,9 ^a
60	195 $\pm$ 6 ^b	458 $\pm$ 12 ^c	0,25	23,3 ^b
90	204 $\pm$ 11 ^b	478 $\pm$ 5 ^c	0,37	26,5 ^b
120	212 $\pm$ 9 ^b	490 $\pm$ 18 ^c	0,42	30,0 ^c

Em cada coluna, os valores que possuem as mesmas letras sobrescritas não apresentam diferenças estatisticamente significativas com um nível de confiança de 95%.

Esse efeito de aumento na retenção de água também foi determinado por Chandra et al. (2009) com *Pinus contorta* tratados por explosão a vapor ou organossolve-etanol. Os autores observaram que as amostras tratadas com organossolve e com menor quantidade de lignina (21-25%) obtiveram maiores valores de retenção de água do que as amostras tratadas por explosão a vapor que tinha um maior teor de lignina (45-58%).

Quanto aos os grupos ácidos, observou-se que os mesmos foram continuamente incorporados na lignina residual com o aumento no tempo de tratamento (Tabela 3). Os

grupos ácidos detectados nas amostras são atribuídos principalmente ao grupo sulfônico incorporado à lignina residual.

Foram utilizadas duas técnicas diferentes para confirmar a sulfonação de ligninas residuais: a titulação condutimétrica dos grupos ácidos e a determinação do teor de enxofre na superfície das fibras por microscopia de varredura EDS-MEV. Através da titulação condutimétrica foi possível detectar grupos ácidos no bagaço, atribuídos à presença de grupos sulfônicos incorporados à fibra durante o pré-tratamento. Segundo Bu et al. (2012), é possível diferenciar a presença de ácidos fortes e fracos em materiais lignocelulósicos pré-tratados com sulfito. Os autores mostraram dois pontos de inflexão na parte inferior da curva de titulação, que correspondem ao volume de ácido gasto para titular ácidos fortes (primeiro ponto) e fracos (diferença até segundo ponto mínimo). Diferentemente, na titulação do bagaço foi possível identificar apenas um ponto de mínimo (Figura 19), o que sugere a presença de grupos ácidos fortes que foram relatados como grupos ácidos totais na Tabela 3. Entretanto, vale mencionar que a metodologia de determinação de grupos ácidos está sendo alterada por adição de menores volumes de hidróxido de sódio a fim de possibilitar a determinação de ácidos fracos. Por conseguinte, neste trabalho, a ocorrência de ácidos carboxílicos fracos foi atribuída ao conteúdo existente no material não tratado e correspondeu a 293 ± 26 mmol/kg de lignina.

Figura 19: Titulação condutimétrica de grupos ácidos em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos: (-●-) sem tratamento, (-▲-) 30 minutos, (-○-) 60 minutos, (-■-) 90 minutos, (-◆-) 120 minutos.

Fonte: Arquivo pessoal.

O teor de enxofre na superfície das fibras, determinada por EDS-MEV foi baixo no bagaço não tratado, mas aumentou após os primeiros 30 min de pré-tratamento, correspondendo à tendência obtida pelo método condutimétrico (Tabela 3). Observa-se também uma correlação positiva entre a sulfonação e o valor de retenção de água (Figura 20), isto se deve à incorporação do íon sulfito à lignina, o que promove uma maior solubilização e ainda deixa a lignina residual carregada (DEL RIO et al, 2011; REHBEIN et al, 2010). Dessa forma, as hidroxilas da celulose e hemicelulose ficam mais disponíveis e a lignina menos hidrofóbica. Os resultados apresentados na tabela 3 estão de acordo com o observado por Böras et al. (1999), quando trataram cavacos de madeira mole com diferentes cargas de sulfito de sódio (0-15%) em tempos de cozimento que variaram de 3 a 120 min a 125 °C, os autores observaram um aumento linear de enxofre na polpa de 0,2 para 1,5%, o que favoreceu o aumento da hidrofiliicidade das fibras.

Figura 20: Grupos sulfônicos (-o-), quantidade de enxofre na fibra (-Δ-) e valor de retenção de água (-□-) no bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos de cozimento.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.2 Análise microscópica das amostras de bagaço

Uma avaliação dos bagaços por microscopia óptica revelou aspectos que corroboram com os dados de composição química e física das tabelas 2 e 3. O inchamento da parede das fibras tratadas com sulfito (Figura 21), ocorreu provavelmente devido à inserção de grupos SO_3^{2-} na lignina residual (BIERMANN, 1993). A largura da fibra do bagaço não tratado (a) é de $10,45\mu\text{m}$ ($\pm 0,095$) e depois do cozimento com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ por 30 min (b) aumentou para $16,88\mu\text{m}$ ($\pm 0,347$). Em tempos maiores de tratamento observaram-se um maior inchamento das fibras cujas medidas foram de $23,35\mu\text{m}$ ($\pm 0,391$) (c), $26,46\mu\text{m}$ ($\pm 0,557$) (d) e $30,00\mu\text{m}$ ($\pm 0,343$) (e).

Figura 21: Microscopia óptica das fibras de bagaço submetida ao pré-tratamento sulfito alcalino. Fibra do bagaço de usina não tratado (a), Fibra do bagaço de usina pré-tratado por 30min (b), 60min (c), 90min (d) e 120min. Magnificação 400X.

Fonte: Arquivo pessoal.

Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que o bagaço não tratado (Figura 22 a) apresentou feixes de fibras com uma estrutura compactada, mas após o pré-tratamento sulfito-alcalino, houve a descompactação e as espessuras das fibras aumentaram (Figura 22 b,c,d,e). A maioria das amostras pré-tratadas apresentou fibras individualizadas, devido à deslignificação parcial e

ao desfibramento mecânico resultantes do pré-tratamento (Figura 22). Este desfibramento ocorreu provavelmente pela remoção da lignina da lamela média, que é responsável pela união das células (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 22: Micrografias obtidas em MEV de amostras de bagaço de cana-de-açúcar: Feixe de fibra do bagaço não tratado (a), feixe de fibra do bagaço pré-tratado por (b) 30min, (c) 60 min, (d) 90 min e 120min (e). A barra da escala é 20 μ m.

Fonte: Arquivo pessoal.

A separação e o aumento da largura das fibras dos bagaços pré-tratados foram as características possíveis de serem visualizadas por MEV (Figura 22), no entanto outros autores descreveram mais detalhes relativos a alterações estruturais de materiais lignocelulósicos obtidos por outros pré-tratamentos. Mussato et al. (2008), observaram a presença de fibras compactas e ordenadas no bagaço de malte de cevada, que após a remoção de lignina e hemicelulose, por tratamentos com ácido sulfúrico diluído e hidróxido de sódio, respectivamente, as fibras foram separadas, formando uma estrutura mais exposta, aumentando sua área superficial externa. Em um estudo de Rezende et al. (2011), com bagaço de cana-de-açúcar tratado com ácido sulfúrico diluído e NaOH, os autores relataram que através das micrografias foi possível visualizar poros na estrutura da parede celular e sua superfície pareceu mais frágil quando comparada com a amostra não-tratada e associaram tal resultado à deslignificação ocorrida no material.

5.1.3. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Após o pré-tratamento do bagaço com 10% de Na_2SO_3 e 5% NaOH por tempos variados, e tendo substratos com níveis diferentes de lignina, grupos sulfônicos e largura de fibra, foi realizada a hidrólise enzimática com a mistura de celulasas.

A avaliação de todo o conjunto de dados sugere que nos primeiros 30 minutos de reação, houve uma melhora significativa na eficiência da hidrólise enzimática dos polissacarídeos de 14 % e 15% da amostra não tratada a 55 % e 64 % (níveis de conversão de xilana e celulose, respectivamente) (Figura 23). Isso ocorre quando se remove aproximadamente metade da lignina inicial e 30% de hemicelulose, associado a um aumento significativo no conteúdo de grupos ácidos e na largura das fibras.

A hidrólise enzimática da celulose aumentou até 92% em função do tempo de pré-tratamento (Figura 23). Este aumento na eficiência de hidrólise de celulose não está relacionado com a remoção de lignina ou hemicelulose, observada durante o pré-tratamento, uma vez que com o aumento dos tempos de reação, houve um pequeno aumento na remoção de lignina (de 53% a 66%), enquanto que a hemicelulose residual permaneceu praticamente constante (Tabela 2). De acordo com Del Rio et al. (2011) quando a composição química do substrato é relativamente semelhante, a área superficial, a porosidade e o inchamento da fibra têm um efeito significativo na hidrólise enzimática. Uma provável explicação para o aumento dos rendimentos de hidrólise pode ser devido a introdução de íons sulfito nas amostras. As adsorções improdutivas das celulasas à lignina também podem ser diminuídas aumentando-se o conteúdo iônico associado à macromolécula de lignina, favorecendo assim a hidrólise enzimática (NAKAGAME, et al., 2011a).

A conversão de hemicelulose (Figura 23b) apresentou o mesmo comportamento de hidrólise enzimática da celulose, porém ocorreram menores conversões, como esperado quando se utiliza o extrato comercial de celulasas (celluclast) (MENDES et al, 2011). Na amostra não tratada após 8h de conversão da xilana a xilose, não houve aumento com o tempo de reação, ou seja, após 96h de hidrólise a máxima conversão foi aproximadamente 14%. Após o pré-tratamento sulfito alcalino, a conversão em 8h de reação, atingiu acima de 30% de conversão de xilana a xilose, mostrando a grande melhora com o pré-tratamento, pois as amostras ficaram mais susceptíveis à sacarificação enzimática.

Figura 23: Hidrólise enzimática da celulose (a) e da hemicelulose (b) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos de cozimento: (-x-) não-tratado, (-♦-) tratado com sulfito alcalino por 30 min, (-■-) 60 min (-▲-) 90 min e (-○-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES REGIÕES DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar apresenta vários tipos celulares que se distribuem nas diferentes partes do seu colmo. As paredes dessas células têm espessura, composição e acessibilidade diferenciadas. Sendo assim, alguns estudos foram realizados comparando a hidrólise

enzimática de diferentes regiões da cana-de-açúcar in natura e de híbridos (COSTA et al., 2013). Neste trabalho a fração externa, córtex, interface e medula das canas foram pré-tratadas com 10% Na_2SO_3 e 5% de NaOH por diferentes tempos a 120 °C, seguido pela hidrólise com mistura de celulases. Os resultados a seguir comparam a solubilização de componentes de canas de composição química variável e a conversão de celulose e hemicelulose a monômeros.

5.2.1. Caracterização química da cana-de-açúcar pré-tratada com sulfito-alcálico

A Tabela 4 apresenta a composição química de cada fração da cana de referência e dos híbridos antes de serem pré-tratados. A composição química das cinco amostras (referência, 58, 89, 146 e 140) mostrou uma grande diferença no teor de lignina tanto entre as regiões medula, interface, córtex e fração externa do entrenó para uma mesma cana como entre diferentes canas.

Observa-se uma maior variação no teor de lignina nas medulas das canas que nas demais regiões e essa variação diminuiu no sentido medula-fração externa. Em todas as amostras observa-se a predominância de celulose na medula (acima de 40%) e o aumento do teor de lignina no sentido da região da medula para a fração externa. Estes dados corroboram com o trabalho de Siqueira et al (2011), no qual avaliou a distribuição topoquímica da lignina na medula e no córtex de cana de açúcar. Os dados mostraram 53,2% de celulose e 12,5% de lignina na medula e 43,7% de celulose e 19,4% de lignina no córtex. No trabalho de Costa et al. (2013) foi avaliado as diferentes frações da cana, no qual mostrou que a região medular é a que apresenta maior teor de glucanas, bem como menor quantidade de lignina, porém é a porção menos representativa em questão de massa e volume. As regiões com alta recalcitrância e mais densas são o córtex e a fração externa. Em termos morfológicos, os autores concluíram que há uma diferença progressiva no sentido centro-periferia em um entrenó de cana, diferença esta que deve estar correlacionada com as diferentes respostas das regiões à acessibilidade enzimática.

Considerando que células de parênquima predominam na região da medula, os dados estão em concordância com os obtidos por He e Terashima (1990; 1991), que detectaram menor conteúdo de lignina nas células de parênquima, em comparação aos feixes vasculares.

O conteúdo de hemicelulose foi menos variável entre as regiões da cana, exceto os híbridos 89 e 58 que apresentaram um baixo teor deste componente na medula (Tabela 4). De uma forma geral, a medula, a interface, o córtex e a fração externa das canas 58 e 89 apresentam menores teores de lignina e de hemicelulose que as demais canas. Os dados também revelam que as amostras com menores teores de lignina, possuem maiores concentrações de celulose. O resultado da soma do conteúdo de lignina e hemicelulose aumentou, no sentido medula-córtex, fator que ajuda a explicar a diferença na recalcitrância entre as amostras de cana e suas regiões, pois as polioses, junto com os componentes aromáticos, encapsulam as fibrilas de celulose, formando uma barreira à acessibilidade das celulasas (KRISTENSEN et al., 2008; YANG; WYMAN, 2004).

Tabela 4: Composição química de diferentes frações do entrenó das canas.

Cana de referência				
Regiões	Medula	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	13,33±0,18	18,02±0,06	20,94±0,15	25,33±0,05
Celulose (%)	55,25±0,16	47,06±0,02	43,45±0,16	42,14±0,01
Hemicelulose (%)	22,98±0,21	25,33±0,21	28,34±0,02	25,85±0,01
Híbrido 58				
Lignina (%)	12,87±0,29	16,09±0,3	19,65±0,7	20,84±0,4
Celulose (%)	54,41±1,87	48,63±0,7	44,54±1,2	44,47±0,7
Hemicelulose (%)	20,97±0,7	26,22±0,45	27,75±1,0	26,69±0,64
Híbrido 89				
Lignina (%)	13,88±0,02	14,97±0,2	19,24±0,1	20,81±0,3
Celulose (%)	56,31±0,2	51,49±0,3	50,15±0,3	47,90±0,4
Hemicelulose (%)	17,34±0,41	21,28±0,52	23,21±0,64	24,01±0,51
Híbrido 146				
Lignina (%)	16,71±0,07	19,10±1,03	22,89±0,11	24,47±0,41
Celulose (%)	46,76±1,26	42,79±0,20	38,02±0,26	39,20±1,66
Hemicelulose (%)	27,57±0,49	28,20±0,41	29,11±0,11	27,85±1,05
Híbrido 140				
Lignina (%)	18,55±0,05	19,84±0,11	20,61±0,28	25,18±0,37
Celulose (%)	41,11±0,64	38,15±0,33	39,46±0,34	36,10±0,33
Hemicelulose (%)	26,77±0,31	27,73±0,50	27,02±0,10	25,57±1,34

A Tabela 5 mostra o resultado da composição química das regiões da cana de referência após os tempos de pré-tratamento sulfito alcalino. Observa-se que ocorreu a redução do teor de lignina da medula, da interface, do córtex e da fração externa principalmente após 30 min de tratamento. Nos tempos de tratamento mais prolongados o teor de lignina praticamente não teve variação. Um pequeno efeito do tempo de pré-tratamento sulfito-alcalino na deslignificação foi observado na região do córtex pelo fato de nesta região predominar células com paredes secundárias lignificadas e mais espessas. No tempo de 120 minutos de tratamento houve uma menor remoção que no tempo de 90 min, o que sugere que no maior tempo pode ter ocorrido uma redeposição da lignina. A remoção de lignina no córtex nos tempos de tratamento 30, 60, 90 e 120 min foi: 20,63%, 32,52%, 41,45% e 34,57%, respectivamente.

Os teores de celulose aumentaram após o tratamento nas regiões: interface, córtex e fração externa. Na medula houve a remoção de celulose e no córtex e na fração externa houve a remoção de hemicelulose, porém estas remoções foram pequenas, reforçando a seletividade do tratamento sulfito alcalino para remoção de lignina.

As medulas dos híbridos 58, 89, 146 e 140 não foram pré-tratadas, pois apresentaram um baixo teor de lignina e de acordo com estudos anteriores, esta fração obtida de diferentes canas, mostrou um rendimento de hidrólise acima de 80%. Apenas na cana 140 o rendimento foi de 50% em 72h (COSTA et al., 2013). Apesar dessa vantagem, tem-se que considerar que a medula representa menos de 7% da massa do entrenó, o que limita seu uso isolado para a produção de grandes concentrações de açúcares (COSTA et al., 2013).

Tabela 5: Composição química de diferentes frações do entrenó da cana de referência tratada com 10% de sulfito e 5% de NaOH por diferentes tempos a 121 °C.

Sem tratamento				
Regiões	Medula	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	13,33±0,18	18,02±0,06	20,94±0,15	25,33±0,05
Celulose (%)	55,25±0,16	47,06±0,02	43,45±0,16	42,14±0,01
Hemicelulose (%)	22,98±0,21	25,33±0,21	28,34±0,02	25,85±0,01
30 minutos				
Lignina (%)	10,68±0,35	12,85±0,19	16,62±0,42	20,57±0,38
Celulose (%)	57,91±0,67	50,45±0,04	47,14±0,02	46,41±0,15
Hemicelulose (%)	24,23±0,14	28,27±1,25	26,47±0,23	24,80±0,04
60 minutos				
Lignina (%)	10,78±0,35	15,64±0,41	14,13±0,40	20,31±0,59
Celulose (%)	54,61±0,40	49,90±1,38	50,69±0,18	49,27±0,57
Hemicelulose (%)	24,62±0,03	24,86±1,39	25,27±0,78	24,00±0,08
90 minutos				
Lignina (%)	11,24±0,02	12,07±1,72	12,26±0,31	20,63±0,69
Celulose (%)	53,53±0,27	52,31±0,03	51,49±0,23	48,54±0,58
Hemicelulose (%)	25,62±0,03	26,13±0,01	27,00±0,07	24,81±0,30
120 minutos				
Lignina (%)	10,72±1,11	13,67±0,16	13,70±0,14	19,18 ±0,18
Celulose (%)	54,82±0,01	50,66±0,11	49,91±0,56	48,23±0,70
Hemicelulose (%)	24,56±0,18	25,74±0,32	26,69±0,20	24,41±0,33

A remoção de lignina da região da interface, do córtex e da fração externa do híbrido 58 variou entre 73%-85%, 63-72% e 23-32%, respectivamente, entre os diferentes tempos de tratamento. Não houve remoção de celulose e hemicelulose durante o tratamento sulfito alcalino nas diferentes regiões desta cana (Tabela 6).

Tabela 6: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 58 tratado com 10% de sulfito e 5% de NaOH por diferentes tempos de tratamento a 121 °C.

Sem-tratamento			
Regiões	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	16,09±0,30	19,65±0,70	20,84±0,40
Celulose (%)	48,63±0,70	44,54±1,20	44,47±0,70
Hemicelulose (%)	26,22±0,45	27,75±1,00	26,69±0,64
30 minutos			
Lignina (%)	4,23±1,26	5,49±0,01	14,53±0,39
Celulose (%)	58,99±0,40	57,09±3,25	56,32±0,35
Hemicelulose (%)	27,23±0,56	28,51±1,97	27,65±0,37
60 minutos			
Lignina (%)	3,05±0,07	5,83±0,46	15,90±0,20
Celulose (%)	58,97±0,54	57,84±1,50	57,20±0,01
Hemicelulose (%)	27,02±0,14	27,11±0,92	27,72±0,52
90 minutos			
Lignina (%)	2,93±0,04	6,08±0,05	14,04±0,28
Celulose (%)	59,85±0,03	57,19±0,63	56,84±0,98
Hemicelulose (%)	27,24±0,02	27,74±1,54	28,55±0,73
120 minutos			
Lignina (%)	3,26±0,08	5,82±0,41	14,17 ±0,33
Celulose (%)	59,15±0,63	55,93±0,41	58,76±0,38
Hemicelulose (%)	27,59±0,12	28,51±0,80	28,91±0,37

No híbrido 89 a remoção de lignina foi gradual com a extensão do tratamento, atingindo níveis semelhantes de remoção no córtex e interface (67%) e de 29,8% na fração externa após 120 minutos de reação (Tabela 7). Na fração externa desta cana, nos primeiros 30 min de reação observa-se apenas 5,91% de remoção de lignina, diferentemente dos outros híbridos.

Tabela 7: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 89 com 10% e 5% de NaOH de sulfito em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.

Sem-tratamento			
Regiões	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	14,97±0,2	19,24±0,1	20,81±0,3
Celulose (%)	51,49±0,3	50,15±0,3	47,90±0,4
Hemicelulose(%)	21,28±0,52	23,21±0,64	24,01±0,51
30 minutos			
Lignina (%)	5,03±0,19	11,01±0,13	19,58±0,40
Celulose (%)	58,36±0,01	50,49±0,10	46,52±0,28
Hemicelulose(%)	27,48±0,28	28,58±0,07	25,21±0,07
60 minutos			
Lignina (%)	5,23±0,02	10,75±0,04	17,32±0,25
Celulose (%)	58,19±0,16	49,87±0,26	47,59±0,40
Hemicelulose(%)	28,32±0,34	29,46±0,13	25,22±0,19
90 minutos			
Lignina (%)	5,22±0,04	7,79±0,01	15,41±0,09
Celulose (%)	58,08±0,51	52,28±0,30	48,57±0,10
Hemicelulose(%)	27,18±0,48	29,97±0,05	26,05±0,13
120 minutos			
Lignina (%)	5,18±0,01	6,28±0,04	14,61±0,81
Celulose (%)	58,28±0,31	54,66±0,29	48,94±0,78
Hemicelulose(%)	27,68±0,58	29,16±0,02	26,60±0,05

Na cana 146, a remoção de lignina na interface variou entre 67,8% no tempo de 30 minutos e atingiu uma remoção de aproximadamente 76% nos outros tempos de tratamento. Na região do córtex a remoção de lignina foi de aproximadamente 58,9-63,1% e na fração externa foi entre 23,8-31,5% de remoção de lignina (Tabela 8).

Tabela 8: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 146 com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.

Sem-tratamento			
Regiões	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	19,10±1,03	22,89±0,11	24,47±0,41
Celulose (%)	42,79±0,20	38,02±0,26	39,20±1,66
Hemicelulose(%)	28,20±0,41	29,11±0,11	27,85±1,05
30 minutos			
Lignina (%)	6,17±0,10	9,32±0,49	18,64±0,01
Celulose (%)	56,00±0,35	50,76±0,46	47,47±0,92
Hemicelulose(%)	28,95±0,90	30,09±0,47	26,27±0,46
60 minutos			
Lignina (%)	4,55±0,23	8,59±0,16	16,69±0,04
Celulose (%)	56,27±1,62	50,20±0,09	46,77±0,51
Hemicelulose(%)	29,46±0,75	31,26±1,21	26,97±0,12
90 minutos			
Lignina (%)	5,07±0,02	9,39±0,29	17,67±0,13
Celulose (%)	54,70±0,22	46,69±0,70	45,55±0,25
Hemicelulose(%)	29,50±1,03	31,42±0,27	26,98±0,66
120 minutos			
Lignina (%)	4,64±0,28	8,44±0,25	17,08±0,32
Celulose (%)	56,38±1,31	49,60±0,31	46,29±1,31
Hemicelulose(%)	29,33±0,33	31,98±0,22	26,29±0,02

Na cana 140, após o pré-tratamento sulfito-alcálico, observou-se que a maior taxa de remoção de lignina não ocorreu nos primeiros 30 min de reação. Na região da interface a remoção de lignina aumentou com tempo mais prolongado de tratamento, variando entre 57% a 73,3%. No córtex a remoção de lignina variou entre 57,7% a 65,5% e na fração externa a remoção foi menor, entre 12,6 a 31,2% (Tabela 9).

Tabela 9: Composição química de diferentes frações do entrenó do cultivar 140 com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de tratamento a 121 °C.

Sem-tratamento			
Regiões	Interface	Córtex	Fração externa
Lignina (%)	19,84±0,11	20,61±0,28	25,18±0,37
Celulose (%)	38,15±0,33	39,46±0,34	36,10±0,33
Hemicelulose(%)	27,73±0,50	27,02±0,10	25,57±1,34
30 minutos			
Lignina (%)	8,34±0,01	8,44±0,08	22,00±0,17
Celulose (%)	50,40±0,05	50,13±1,21	42,09±0,14
Hemicelulose(%)	31,29±0,15	32,37±0,53	26,96±0,12
60 minutos			
Lignina (%)	6,24±0,04	8,71±0,25	18,55±0,08
Celulose (%)	52,04±1,21	49,21±2,07	44,52±0,08
Hemicelulose(%)	31,76±0,83	32,32±2,04	27,34±0,06
90 minutos			
Lignina (%)	7,55±0,04	8,69±0,39	17,06±0,11
Celulose (%)	50,71±1,23	50,06±0,18	45,46±2,27
Hemicelulose(%)	31,85±1,07	31,60±0,63	27,84±1,47
120 minutos			
Lignina (%)	5,30±0,18	7,10±0,12	17,31±0,09
Celulose (%)	52,20±0,69	50,66±0,69	46,19±1,52
Hemicelulose(%)	32,65±1,233	32,29±0,46	28,52±0,87

O pré-tratamento removeu mais lignina dos híbridos do que da cana de referência, além disso, a remoção de lignina foi menor nas regiões que possuem maiores teores de lignina, como na fração externa (Figura 24). Esse dado é importante e sugere que há diferenças nas interações da lignina com os outros constituintes da parede. Durante os primeiros 30 minutos de pré-tratamento a remoção de lignina da interface das canas foi semelhante, entretanto no córtex, verifica-se uma remoção de lignina mais lenta para a cana 89 e de referência (Figura 25), isto foi possível visualizar após a determinação da taxa de remoção de lignina, na qual, a diferença entre o teor de lignina inicial com o teor final foi dividido pelo tempo de 30 minutos de pré-tratamento.

Quanto ao conteúdo de hemicelulose e de celulose, foi observado que em todas amostras não houve uma grande alteração após o pré-tratamento das regiões das canas 58,

89,146 e 140 o que também comprova que o tratamento foi específico para remoção de lignina.

Figura 24: Remoção de lignina na interface, córtex e fração externa das canas referência, 58, 89,146 e 140 tratadas com sulfito alcalino por 120 minutos a 121 °C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 25: Taxa de remoção de lignina na interface e no córtex das canas referência, 58, 89,146 e 140 tratadas com sulfito alcalino por 30 minutos a 121 °C.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.2. Determinação de grupos ácidos das frações dos colmos das canas pré-tratadas com sulfito alcalino

A Figura 26 apresenta os valores de grupos ácidos na interface, no córtex e na fração externa das canas em estudo. Os grupos ácidos, expressos pela massa de lignina de cada região da cana, foram diferentes em uma mesma cana pré-tratada em tempos distintos, isto provavelmente pelas diferenças na quantidade residual de lignina e também aos tempos de exposição da amostra à solução sulfito-alcalino. O aumento do tempo de tratamento promoveu a maior incorporação de grupos ácidos nas amostras, evidenciando que o menor o tempo de pré-tratamento (30 min) não foi suficiente para que ocorresse a total e incorporação de grupos ácidos na lignina.

Na região da interface (Figura 26A) houve uma maior sulfonação da lignina em relação às demais regiões da cana (figuras 26B e C). Comparando a fração externa e o córtex, observa-se uma maior incorporação de grupos ácidos no córtex. Estes resultados podem ser atribuídos à concentração de sulfito empregado no pré-tratamento. Devido a maior concentração de lignina no córtex e fração externa, uma maior concentração de sulfito poderia promover uma maior solubilização e sulfonação da lignina destas regiões.

Figura 26: Sulfonação da lignina da interface (A), do córtex(B) e da fração externa (C) das canas referência e dos híbridos 58, 89, 146 e 140 pré-tratados com 10% Na_2SO_3 e 5% de NaOH por 30 min (barra azul), 60 min (barra vermelha), 90 min (barra verde) e 120 min (barra lilás).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.3. Determinação do grau de retenção de água nas frações dos colmos das canas pré-tratadas com sulfito alcalino

A Tabela 10 apresenta os valores de retenção de água (WRV) da interface, do córtex e da fração externa da cana de referência e dos híbridos 58, 89, 146 e 140 tratados por diferentes tempos. As canas pré-tratadas apresentaram uma maior retenção de água do que as canas não tratadas, entretanto o pré-tratamento por diferentes tempos não mostrou uma diferença significativa nos valores de WRV. O grau de retenção de água depende da concentração de lignina residual, o que explica a proximidade dos valores de retenção de água nos diferentes tempos em uma mesma cana e também justifica o porquê da cana 140 apresentou os menores valores de retenção de água nas amostras tratadas, uma vez que nesta cana a remoção de lignina ocorreu em menor intensidade.

Tabela 10: Retenção de água na interface, no córtex e na fração externa das canas não-tratadas e pré-tratadas com 10% Na_2SO_3 e 5% de NaOH por 30 min, 60 min, 90 min e 120 min.

Amostras	Sem-tratamento	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
<i>Interface</i>					
Referência	163,2±1,2	203,4±6,8	218,9±9,1	220,3±4,6	221,2±2,4
58	170,3±3,7	221,1±1,0	226,6±0,8	226,8±2,9	228,6±3,6
89	164,1±2,3	208,2±16,3	224,2±9,0	224,0±12,7	226,0±12,7
146	150,1±4,0	245,2±2,1	246,7±3,0	241,3±2,3	242,8±4,2
140	164,7±2,2	200,4±4,6	212,4±2,2	206,2±7,3	205,9±14,0
<i>Córtex</i>					
referência	78,0±2,0	160,7±3,0	170,3±2,6	170,7±2,4	213,0±0,1
58	92,5±0,9	194,1±0,4	197,9±5,3	194,0±7,9	195,9±6,2
89	88,1±2,3	149,2±4,2	153,2±3,7	154,9±1,0	176,3±0,3
146	86,4±2,1	183,2±12,5	188,9±1,9	177,0±2,3	186,3±0,0
140	123,7±4,3	153,7±9,7	149,7±7,2	154,6±4,2	140,5±0,9
<i>Fração externa</i>					
referência	56,0±1,2	115,8±0	127,8±2,1	129,2±1,2	129,8±7,8
58	65,1±4,3	113,3±1,1	111,9±0,5	119,7±0,1	122,8±0,6
89	85,6±3,2	100,5±6,9	106,1±0,5	106,8±,13	113,3±4,3
146	55,2±1,8	117,1±1,9	121,7±2,3	123,7±2,9	120,9±0,3
140	100,9±2,0	107,2±5,0	111,9±0,9	118,2±1,5	113,2±0,7

As amostras menos lignificadas (interface e córtex) apresentaram um maior valor de retenção de água em relação à fração externa o que corrobora com os dados de grupos ácidos, onde a interface e o córtex apresentaram maiores valores. As amostras que incorporaram mais grupos ácidos, tornaram-se mais hidrofílicas e retiveram mais água.

5.2.4. Hidrólise enzimática das frações obtidas a partir de entrenós de cana de açúcar

O estudo da hidrólise enzimática dos entrenós da cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito-alcalino foi realizado na interface, córtex e fração externa dos híbridos. Na cana de referência, além destas regiões, realizou-se a hidrólise enzimática também na medula. Os resultados obtidos com a cana de referência estão apresentados nas Figuras 27 e 28. Analisando a curva de hidrólise da celulose da medula e interface, a conversão máxima ocorreu em um curto tempo, mesmo para a amostra não-tratada. A hidrólise da medula sem tratamento alcançou uma conversão de celulose a glicose de 80% em 8 h. Nas medulas tratadas por diferentes tempos, a hidrólise da celulose foi acima de 90% chegando a 100% nas amostras que foram pré-tratadas por tempos acima de 90 min (Figura 27). A hidrólise da interface foi um pouco menor que a da medula. Na amostra sem pré-tratamento obteve-se 70% de conversão de celulose e as amostras pré-tratadas alcançaram o nível de 80% (Figura 27). Tal resultado pode ser atribuído ao baixo teor de lignina na região da medula e da interface da cana-de-açúcar de referência (Tabela 5). A região da medula por apresentar maior proporção de células de parênquima que a interface foi mais facilmente hidrolisada por celulasas. Na parede celular do parênquima predominam os ácidos hidróxinâmicos, em vez de lignina (COSTA et al., 2013).

Em um estudo realizado por Zeng et al. (2012) com medula e córtex de palha de milho pré-tratados com água quente, a conversão de celulose foi de 75 % na medula e 30 % no córtex. O mesmo ocorreu neste trabalho, a digestibilidade enzimática do córtex, sem pré-tratamento foi de apenas 30 % após 96 h de reação (Figura 27).

As regiões do córtex e da fração externa da cana de referência apresentaram diferenças nas conversões de celulose em relação ao tempo do pré-tratamento. Um maior tempo de pré-tratamento possibilitou uma maior remoção de lignina, consequentemente uma maior sacarificação enzimática. Após 48h de hidrólise enzimática do córtex obteve-se

entre 60% e 90% de conversão de celulose. Comparativamente, a hidrólise da fração externa foi de 30% para 60% com o aumento no tempo de pré-tratamento (Figura 27).

Figura 27: Conversão enzimática da celulose das regiões da cana referência pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de cozimento. (-x-) não-tratada, (-●-) 30 min, (-▲-) 60 min, (-■-) 90 min e (-◆-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

A curva de hidrólise enzimática da xilana da cana referência mostrou um comportamento semelhante à da celulose, porém obteve-se menores valores de conversões de xilana a xilose. Na figura 28 observou-se que houve uma melhora na conversão do material tratado em relação ao não tratado em todas as regiões da cana com o aumento nos tempos de cozimento.

A conversão de xilana da medula da cana de referência foi menor que das demais regiões do colmo da cana. O córtex da cana, mesmo sendo mais lignificado que a medula e

interface (Tabela 5), teve a xilana mais facilmente hidrolisada, após o pré-tratamento. Este resultado sugere que a hemicelulose presente na medula esteja dificultando mais o acesso das enzimas que nas demais regiões, provavelmente pela maior concentração de ácidos hidroxinâmicos e também por ter mais grupos pendentes (arabinose) em sua composição.

Figura 28: Conversão enzimática de xilana das regiões da cana referência pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de cozimento. (-x-) não-tratada, (-●-) 30 min, (-▲-) 60 min, (-■-) 90 min e (-◆-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

A conversão de xilana assim como da celulose depende da carga e do tipo de enzimas presentes no extrato enzimático (TABKA et al., 2006). Uma maior conversão de xilana poderia ter ocorrido se fosse utilizada uma maior carga de enzimas, ou ainda se outras enzimas envolvidas na hidrólise completa da hemicelulose estivessem presentes,

uma vez que, os grupos pendentes existentes na hemicelulose impedem a sua hidrólise completa a xilose (PUCHART; BIELY, 2008).

Na figura 29 estão apresentadas as curvas da hidrólise de celulose das regiões de interface dos híbridos pré-tratados por diferentes tempos. A interface de todos os híbridos apresentou uma alta conversão de celulose após 48h de reação enzimática. Houve grande diferença entre a hidrólise da celulose de amostras tratadas e não-tratadas, entretanto o aumento no tempo do pré-tratamento sulfito-alcálico não resultou em melhora na conversão enzimática da celulose.

Figura 29: Conversão enzimática da celulose da interface das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em apenas 24h de hidrólise houve total conversão da celulose a glicose nas canas 58,89 e 146, mesmo nas amostras que foram tratadas no menor tempo (30 min). Na cana

140, após 48h a curva atingiu um platô em 85% de conversão. Estes resultados superaram ao obtido com a cana de referência em que a máxima conversão foi 80%.

A hidrólise enzimática da celulose presente no córtex da cana 58 foi muito rápida, independentemente do tempo de pré-tratamento sulfito-alcálico e em apenas 24 horas atingiu uma sacarificação total da celulose. Diferentemente, a máxima conversão de celulose do híbrido 89 ocorreu em 48h. As canas 146 e 140 após 96h de reação obteve-se 95% de conversão de celulose (Figura 30).

Figura 30: Conversão enzimática da celulose do córtex das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na fração externa das canas 58, 89, 146 e 140, as maiores conversões de celulose foram obtidas com amostras pré-tratadas por 90 e 120 min com sulfito-alcálico. A fração

externa da cana 89 foi a menos recalcitrante entre os híbridos. Após o pré-tratamento por 90 e 120 min houve uma conversão de celulose acima de 90% em 72h de hidrólise enzimática e após 96h atingiu a conversão total de celulose. A hidrólise da fração externa dos híbridos 58,146 e 140 foi de aproximadamente 70% após 96h de reação (Figura 31).

Comparando as canas, os híbridos 58 e 89 obtiveram a máxima conversão em duas regiões, interface e córtex, porém a interface da cana 146 também teve 100% de conversão de celulose a glicose. Em relação ao córtex, a cana que se destacou foi a 58, por ter a conversão máxima em apenas 8h. Entre todas as canas, a fração externa foi a região mais recalcitrante e apenas o híbrido 89 apresentou uma conversão de celulose acima de 90%. A cana 140 diferenciou das outras por apresentar menores conversões e também a menor velocidade inicial de reação.

De modo geral, o tratamento sulfito alcalino mostrou-se muito eficaz para todas as regiões da cana, uma vez que houve um grande aumento na sacarificação enzimática. O teor de lignina e a presença de grupos sulfônicos exercem grande influência na digestibilidade enzimática. A lignina tem efeito limitante na sacarificação enzimática da celulose, relacionada à diminuição da acessibilidade das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas e à adsorção improdutiva. Isso tem sido amplamente confirmado por muitos trabalhos, nos quais a remoção da lignina aumentou consideravelmente a adsorção das enzimas à celulose e consequentemente, os níveis de hidrólise do material (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010). A presença de cargas nas fibras é um dos fatores que causa o inchamento da fibra (DEL RIO et al., 2011) e consequentemente torna-a mais susceptível à sacarificação enzimática. Além disso, a estrutura, a composição da lignina e a maneira como está associada à celulose e hemicelulose são importantes fatores para a acessibilidade enzimática (CHAPPLE et al., 2007; LI et al., 2007; VERMERRIS et al., 2007; ZENG et al,2012).

Figura 31: Conversão enzimática da celulose da fração externa das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré tratamento: (-x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

A hidrólise enzimática da xilana também foi analisada para diferentes regiões dos híbridos (Figura 32, 33, 34). A hidrólise enzimática da xilana apresentou um perfil semelhante ao da celulose, entretanto observou-se que a hidrólise foi mais lenta. Além disso, não se observou diferenças na hidrólise em relação ao tempo de pré-tratamento, como verificado na referência. A xilana da interface das canas 58 e 146 foi 100% hidrolisada em 24h de reação enzimática, enquanto a cana 89 precisou de 72h. A máxima conversão de xilana da interface da cana 140 foi de 70% de conversão de xilana a xilose (Figura 32).

Figura 32: Conversão enzimática de xilana da interface das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nos híbridos, a conversão de xilana do córtex e da fração externa foi acima de 90% e 60%, respectivamente, após 72h de hidrólise enzimática (Figura 33 e 34). A xilana do córtex da cana 58 hidrolisou rapidamente, teve a máxima conversão em 24h de hidrólise, enquanto na cana 89 em 48h. Diferentemente dos outros híbridos as canas 146 e 140 não atingiram 100% de conversão de xilana a xilose nas regiões córtex e fração externa (Figura 33 e 34). De acordo com os resultados apresentados, a xilana da interface e do córtex foram hidrolizadas mais facilmente que a fração externa, como também observado para a celulose. Segundo Chen e Dixon (2007), o rendimento de xilose na etapa de sacarificação enzimática foi maior para plantas híbridas (alfafas), o que indica que alterações na lignina aumentam a acessibilidade das enzimas à hemicelulose residual.

Figura 33: Conversão enzimática de xilana do córtex das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 34: Conversão enzimática de xilana da fração externa das canas 58, 89, 146 e 140 pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH em diferentes tempos de pré-tratamento: (-x-) não-tratada; (-♦-) 30 min; (-■-) 60 min; (-▲-) 90 min e (-x-) 120 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.5. Adsorção de proteínas

Até este ponto do trabalho, a diferença na hidrólise da celulose das regiões das canas foi atribuída à falta de acessibilidade das enzimas no substrato, porém sabe-se que parte das enzimas pode estar sendo ligada improdutivamente. Para avaliar este efeito foram realizados estudos de adsorção com as enzimas Celluclast e Novozym. As canas utilizadas foram a 89 e 140, as quais se diferenciaram nas velocidades iniciais de hidrólise e nas taxas de conversão de polissacarídeos a monossacarídeos. As medulas sem pré-tratamento das canas 89 e 140 apresentaram valores de adsorção de 15,13 mg/g de cana e 10,29 mg/g de cana, respectivamente.

A Figura 35 mostra a adsorção das proteínas presentes na preparação enzimática usada na hidrólise das regiões das canas 89 e 140. A adsorção decresce no sentido interface-fração externa, ou seja, as regiões com menos lignina da cana possuem maior capacidade adsortiva. O pré-tratamento promoveu o aumento na adsorção de enzimas à superfície das amostras (Figura 35). A diferença entre a adsorção do material não tratado e tratado foi maior nas amostras mais recalcitrantes (córtex e fração externa), pelo fato das amostras terem mais lignina, e com a sua remoção houve uma maior exposição da celulose para as enzimas. A cana 140 apresentou menores valores de adsorção de proteínas do que a cana 89, isto provavelmente por esta cana ter um maior teor de lignina e um menor teor de celulose. Mesmo após o tratamento, a interface, o córtex e a fração externa tiveram valores menores do que a interface, córtex e fração externa da cana 89, respectivamente, este dados corroboram com a sacarificação enzimática, uma vez que a cana 89 foi mais facilmente hidrolisada que a cana 140. Os dados de adsorção reforçam este resultado, pois houve uma maior adsorção das celulasas na cana 89 (Figura 35). Tornar a celulose mais acessível é importante para evitar a adsorção improdutiva, pois as enzimas se ligam mais rapidamente à celulose do que à lignina. Este fato é especificamente importante para a diminuição da carga de proteínas, mantendo-se altas conversões enzimáticas (KUMAR et al., 2012; TU; CHANDRA; SADDLER, 2007).

Figura 35: Adsorção máxima de proteínas nas regiões interface, córtex e fração externa das canas não-tratadas 89 (barra azul escuro), 140 (barra verde escuro) e pré-tratadas com 10% Na_2SO_3 e 5% NaOH 89 (barra azul claro) e 140 (barra verde claro) por 120 min. As medulas destas canas não foram pré-tratadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3. ASPECTOS ANATÔMICOS DA PAREDE CELULAR

As regiões da fração externa, córtex, interface e medula das canas (referência e cultivares 58, 89, 146 e 140) foram avaliadas ao microscópio, antes e depois de pré-tratadas com sulfito alcalino. É sabido que o desempenho do processo sulfito alcalino não é o mesmo entre os tipos de cana e isso tem sido atribuído às diferenças de composição química (LAURITO-FRIEND, 2013), porém alterações na estrutura física e anatômica dessas canas também poderiam influenciar a eficácia do pré-tratamento. A cana de açúcar apresenta grande diversidade celular, além disso, no mesmo tipo celular também há variações, por exemplo, as quantidades de fibras de uma mesma região do córtex variam em número e também em espessura de acordo com a proximidade dos vasos. Diante disso, avaliamos as mudanças nas estruturas de fibras, vasos e células de parênquima, das diferentes regiões do colmo das canas, decorrentes do pré-tratamento.

5.3.1. Microscopia ótica

As análises microscópicas dos cortes transversais de cada região das canas mostraram um padrão de distribuição celular semelhante entre si, conforme ilustrado para uma das canas em estudo (Figura 36). De forma geral, verificou-se que o número de feixes vasculares é significativamente maior no sentido medula-fração externa, entretanto, os feixes vasculares se distribuem difusamente pelo parênquima, não havendo limites distintos entre as regiões. Observa-se que na fração externa aparecem várias células corticais unidas entre si e estas formam uma linha localizada na parte mais periférica do entrenó (Figura 36A). Nesta região, há também um grande número de feixes de fibras e uma maior quantidade de fibras ao redor dos vasos o que pode justificar a maior recalcitrância da parte mais externa do colmo de cana.

Na região do córtex, observou-se a predominância de feixes vasculares que se tornam mais ricos em fibras e com vasos menores à medida que se aproximam da parte mais externa do colmo (Figura 36B). A medula e a interface apresentaram principalmente células de parênquima e uma menor quantidade de aglomerados vasculares com poucas fibras ao redor dos vasos (Figura 36C e D).

Conforme mencionado, houve semelhança entre os tipos celulares em cada região nas diferentes canas, à exceção da cana 140, que apresentou no seu colmo um menor número de feixes fibrovasculares, com maior diâmetro. Costa et al. (2013), também analisaram a morfologia das canas 140, 58 e 89 e descreveram o número de feixes vasculares na região do córtex por área maior (13 a 22 feixes por 16 mm^2) quando comparada com outras regiões, enquanto a fração externa apresentou apenas fibras. A medula, por sua vez, apresentou de 5 a 8 feixes por 16 mm^2 . Ao comparar os híbridos 58, 89 e 140, os autores mostraram que a cana 140 foi a que apresentou menos feixes por área, porém com os maiores diâmetros (entre 390 e $583\text{ }\mu\text{m}$, dependendo da região do colmo).

Figura 36: Microscopias óticas das diferentes regiões de um entrenó do cultivar 58, sem tratamento: fração externa (A), córtex (B), interface (C) e medula (D). Aumento 25x.

Fonte: Arquivo pessoal.

As regiões de cada cana, com exceção da medula, foram pré-tratadas com 10% de sulfito e 5% de NaOH por diferentes tempos. A medula não foi pré-tratada, pois apresenta naturalmente uma baixa recalcitrância à hidrólise enzimática, devido ao baixo teor de lignina e por possuir poucos feixes fibrovasculares.

A Figura 37 mostra as micrografias do córtex (A e B) e interface (C e D) da cana 58 tratada com sulfito alcalino após 30 e 120 min a 121 °C. Na condição mais severa de tratamento, houve uma maior alteração na estrutura celular, ou seja, algumas células de parênquima se separaram e foram rompidas, assim como algumas fibras foram separadas dos vasos. A região da interface apresentou maiores alterações estruturais que a região do córtex, devido a maior deslignificação ocorrida no pré-tratamento.

Figura 37: Microscopias óticas do córtex e da interface de um entrenó do híbrido 58 pré-tratado com sulfito alcalino: córtex pré-tratado por 30 min (A), córtex pré-tratado por 120 min (B), interface pré-tratada por 30 min (C) interface pré-tratada por 120 min (D). Aumento de 50x.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

A interface e o córtex das canas foram analisados por FE-SEM a fim de permitir visualizar a superfície da parede das fibras, bem como a sua textura, antes e depois do pré-

tratamento sulfito alcalino. Independente do tipo de cana, as diferenças morfológicas das superfícies mencionadas seguiram um mesmo padrão.

A interface das canas sem pré-tratamento apresentou uma estrutura compacta com feixes de fibras (indicado pelas setas) conectados pela lamela média (Figura 38).

Algumas fibras apresentaram a lamela média na sua superfície, podendo ser visualizada pelo aspecto liso na região longitudinal. Em outras fibras aparecem poros, que intercomunicam com as células vizinhas (Figura 38C, 38E e 38G).

As interfaces das canas depois de pré-tratadas apresentaram mais rugosas e com feixes de fibras mais distanciados. Essa alteração ocorreu porque uma parte da hemicelulose e da lignina foi dissolvida no processo sulfito, diminuindo em cerca de 25% a massa seca das amostras. Com isso, a parede celular se enfraqueceu, perdeu rigidez e resistência, ficando mais vulnerável ao colapso (Figura 38B, 38D, 38F, 38H).

Alguns sinais de quebra ou rompimento das fibras após o pré-tratamento apareceram nas microscopias, sendo que, as microfibrilas ficaram mais afrouxadas, a parede ficou mais porosa e com maior capacidade de absorver e reter líquidos. Observa-se que mesmo após o pré-tratamento não foi possível a total remoção da lamela média que envolve os feixes de fibras, mostrando a resistência desta região da parede celular à deslignificação. Este resultado reforça os estudos anteriores em que se mostrou que a deslignificação durante o processo sulfito alcalino ocorre predominantemente no sentido do lúmen para a lamela média (MENDES et al., 2011; MENDONÇA et al., 2004).

Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura da interface das canas: referência (A, B), híbrido 58 (C, D), híbrido 146 (E, F), híbrido 89 (G, H). As imagens antes (A, C, E, G) e após o pré-tratamento sulfito alcalino (B, D, F, H) são mostradas em aumento de 1500x.

Fonte: Arquivo pessoal.

A figura 39 mostra os feixes de fibras da região do córtex também mais compactos e ordenados nas amostras não tratadas (39A, 39C) do que nas amostras tratadas (39B, 39D),

39F, 39H). No córtex da cana referência há maior presença de lamela média na superfície dos feixes de fibras, possivelmente devido à menor remoção de lignina durante o tratamento sulfito-alcalino, diferentemente do que aconteceu nos híbridos (39B).

Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura do córtex das canas: referência (A, B), híbrido 58 (C, D), híbrido 146 (E, F), híbrido 89 (G,H). As imagens antes (A, C, E, G) e após o pré-tratamento sulfito alcalino (B, D, F, H) são mostradas em aumento de 1500x.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4. TOPOQUÍMICA DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR

A distribuição da lignina, ácidos hidroxicinâmicos e hemicelulose nas paredes celulares das canas foi investigada pela combinação de diversas técnicas de análise de superfície: UV, XPS e TOF-SIMS. Estes estudos foram realizados na tentativa de obter uma caracterização mais completa da superfície e da parede celular das canas pré-tratadas com sulfito alcalino, através da detecção de alterações nas amostras durante o pré-tratamento.

5.4.1. Microespectrofotometria no ultravioleta

Em cada região das diferentes canas foi possível visualizar no microespectrofotômetro UV as fibras, vasos e células de parênquima de cortes ultrafinos dos colmos das canas. Foi feita a varredura espectral entre 240 e 400 nm das paredes celulares destas células para todos os tipos de cana, os quais estão apresentados no apêndice A. Foram avaliados vinte espectros da parede celular e o desvio padrão, calculado a partir de cada tipo celular, foi de no máximo 20% do valor da absorbância média tanto em 285 nm como em 315 nm. A presença da banda em 285 nm ocorre devido a absorção dos anéis aromáticos da lignina, enquanto que a banda em 315 nm ocorre devido a absorção de alfa-beta insaturações de compostos que se ligam à lignina e hemicelulose, tipicamente associada com a presença de ácidos hidroxicinâmicos nas paredes celulares de gramíneas (HE; TERASHIMA,1990).

Ao comparar os espectros de uma mesma cana, as intensidades de absorção a 285 e 315 nm diminuem no sentido córtex-medula, confirmando o resultado de determinação química de lignina. Uma exceção ocorreu na medula e interface da cana 140, que apresentaram altas absorções a 285 nm tendo valores similares ao córtex. Este resultado sugere que esta cana é diferente das demais e que não há uma distinção clara de suas regiões como evidenciado nas outras canas (Apêndice A).

Para todas as canas estudadas, os vasos e fibras apresentaram absorções mais intensas em 285 nm e 315 nm que o parênquima, indicando a maior presença de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos nas paredes celular destes tipos de células. Nas células de

parênquima, observou-se que a banda predominante foi em 315 nm, indicando a presença de ácidos hidroxicinâmicos nestas paredes celulares (Apêndice A).

A tabela 11 apresenta dados de intensidades de absorção no UV de paredes celulares de duas regiões distintas (córtex e interface) do entrenó, obtidas a partir de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito-alcalino em diferentes tempos. Em comparação à interface, o córtex da maior parte das canas, depois de pré-tratado, apresentou maiores absorções na região de UV, o que também corrobora com os dados da composição química.

Em relação ao tempo de pré-tratamento, pode-se verificar em 30 minutos uma grande diminuição na absorbância a 285 e 315 nm em todas as paredes celulares analisadas, e as células de parênquima foram as que tiveram a maior taxa de redução de absorbância no UV. Os pré-tratamentos com tempo superior a 30 minutos não proporcionaram alterações consideráveis nos picos de absorbância dos espectros, o que está de acordo com os dados de caracterização química, uma vez que o teor de lignina pouco variou com o aumento do tempo no pré-tratamento. Os vasos da cana 140, na interface e córtex, tiveram a menor redução na absorbância a 285 nm, e neste caso esta redução foi favorecida pelo aumento do tempo de pré-tratamento (Figura 40 A, B). Nas fibras do córtex da cana 140, o tempo de 120 minutos não foi suficiente para a total redução de absorbância a 285 nm, mas essas células foram menos resistentes na interface das outras canas (Figura 40 C, D).

A remoção dos ácidos hidroxicinâmicos dos vasos expressa pela redução de absorbância a 315 nm, foi completa em 30 minutos de pré-tratamento da interface e córtex para a maioria das canas estudadas. Comparativamente, a redução da absorbância a 315 nm das fibras do córtex foi menor e mesmo na região da interface mostraram dependência com o tempo de pré-tratamento (Figura 41).

Tabela 11: Intensidade de absorção no UV e paredes celulares de duas regiões distintas (córtex e interface) do entrenó obtidas a partir de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito-alcalino em diferentes tempos.

<i>Amostra</i>	<i>Vaso</i>		<i>Fibra</i>		<i>Parênquima</i>	
Referência-Córtex	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,34	0,36	0,30	0,26	0,20	0,25
30 min	0,089	0,027	0,111	0,147	0	0
60 min	0,027	0,020	0,102	0,097	0	0
90 min	0,047	0,034	0,131	0,114	0	0
120 min	0,038	0,0002	0,152	0,125	0,048	0
Referência- Interface	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,27	0,25	0,27	0,22	0,10	0,19
30 min	0,091	0,011	0,084	0,089	0	0
60 min	0,079	0,0010	0,091	0,074	0,081	0
90 min	0,007	0,0216	0,064	0,051	0	0
120 min	0,078	0	0,099	0,089	0,019	0
89 – Córtex	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,29	0,29	0,25	0,23	0,20	0,25
30 min	0,050	0	0,094	0,131	0,007	0
60 min	0,042	0	0,082	0,115	0	0
90 min	0,064	0	0,093	0,105	0	0
120 min	0,022	0	0,085	0,103	0	0
89 – Interface	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,17	0,20	0,20	0,29	0,09	0,13
30 min	0,038	0,076	0,030	0,032	0	0
60 min	0,036	0	0,030	0,032	0	0
90 min	0,040	0	0,026	0,020	0	0
120 min	0,048	0	0,024	0,015	0	0
58 – Córtex	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,21	0,20	0,24	0,23	0,19	0,28
30 min	0,097	0	0,012	0,010	0	0
60 min	0,041	0	0,038	0,021	0	0
90 min	0,017	0	0,024	0,003	0	0
120 min	0,030	0	0,057	0,056	0,006	0
58 – Interface	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,20	0,24	0,21	0,23	0,05	0,15
30 min	0,033	0,005	0,051	0,03	0,09	0,05
60 min	0,109	0,072	0,070	0,06	0,09	0,06
90 min	0,034	0,084	0,046	0,03	0	0
120 min	0,063	0,030	0,063	0,03	0,07	0
146- Córtex	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,21	0,23	0,20	0,16	0,21	0,05
30 min	0,025	0	0,054	0,04	0,09	0
60 min	0,006	0	0,028	0,04	0	0
90 min	0,050	0	0,113	0,08	0,07	0
120 min	0,059	0	0,015	0,07	0	0
146- Interface	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,14	0,17	0,23	0,22	0,12	0,15
30 min	0	0	0,063	0,063	0	0
60 min	0	0	0,018	0,014	0	0
90 min	0	0	0,017	0,013	0	0
120 min	0	0	0,036	0,042	0	0
140- Córtex	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,24	0,27	0,21	0,19	0,17	0,14
30 min	0,14	0,04	0,11	0,04	0,002	0,004
60 min	0,10	0	0,03	0	0,009	0
90 min	0,11	0,02	0,12	0,07	0,005	0
120 min	0,06	0,009	0,10	0,07	0,005	0
140- Interface	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm	285 nm	315 nm
0 min	0,25	0,21	0,26	0,24	0,15	0,15
30 min	0,01	0	0,09	0,13	0,07	0,03
60 min	0,07	0,08	0,05	0,05	0,02	0
90 min	0,04	0	0,04	0,08	0,08	0,01
120 min	0	0	0,03	0,02	0	0

Figura 40: Percentual de redução na absorvância a 285 nm na parede celular das amostras pré-tratadas com sulfito alcalino em diferentes tempos. Vasos presentes no córtex (A) e na interface (B) das canas referência, 89, 58, 146 e 140 e fibras do córtex (C) e interface (D).

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 41: Percentual de redução na absorvância a 315 nm na parede celular das amostras pré-tratadas com sulfito alcalino em diferentes tempos. Vasos presentes no córtex (A) e na interface (B) das canas referência, 89, 58, 146 e 140 e fibras do córtex (C) e interface (D).

Fonte: Arquivo pessoal.

A figura 42 mostra comparação do percentual de redução das absorbâncias a 285 nm e 315 nm de cada tipo celular da interface e córtex das canas pré-tratadas por 30 minutos. Os vasos e fibras da cana 140, da interface e córtex, apresentaram diferenças de absorbância a 285 nm pelo pré-tratamento, sendo que na interface a redução observada foi maior. Esse mesmo comportamento foi verificado para os vasos da cana 58 e fibras da cana 89. No córtex, as paredes celulares dos vasos e fibras foram menos alteradas para a maior parte das canas. Nos vasos dos híbridos observou-se a remoção total dos ácidos hidroxicinâmicos, com a excessão nas interfaces das canas 146 e 89 e no córtex da cana 140. A remoção de ácidos hidroxicinâmicos durante pré-tratamento é importante, pois os ácidos cumáricos e ferúlicos fazem ligações entre a lignina e a hemicelulose, contribuindo com a diminuição da recalcitrância da parede celular (GRABBER et al., 2009). Estes compostos representam uma parte significativa dos componentes aromáticos de gramíneas e podem inclusive serem determinados como lignina Klason, devido a reações de condensação (GRABBER et al., 2000; LAM et al., 1994). Lam et al. (2003), em um estudo com gramíneas (150 linhagens de *Phalaris aquática* e 100 linhagens de *Lolium perenne*) mostraram que a concentração de ácido hidroxicinâmico na parede celular também é importante para explicar a recalcitrância dos lignocelulósicos à digestão direta por celulasas. Barros-Rios et al. (2012), também verificaram uma alta correlação entre a digestibilidade e a baixa concentração de ácidos ferúlicos e diferúlicos na de medulas de caule de milho.

De forma geral, os espectros UV dos diferentes tipos celulares estudados em cada amostra foram bons indicadores da susceptibilidade à hidrólise enzimática, pois a conversão de celulose foi proporcional à redução na absorbância a 285 nm e 315 nm das paredes celulares das fibras e dos vasos das amostras tratadas com sulfito alcalino em diferentes tempos. Estes dados corroboram com o estudo de Siqueira et al. (2011), no qual mostraram que a deslignificação da região do córtex com clorito em meio ácido produz um material mais fácil de ser hidrolisado com celulasas.

Figura 42: Percentual de redução das absorbâncias a 285 nm (A, B) e 315 nm (C, D) de paredes celulares do córtex e interface das canas referência, 89, 58, 146 e 140 pré-tratadas por 30 minutos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Um gráfico com os valores de conversão enzimática da celulose de todas as canas em relação aos valores de absorbância a 285 nm e 315 nm encontrados para cada tipo celular está mostrado na Figura 43. Para obtenção deste gráfico foi feita a média das conversões a 24h e das absorbâncias nos diferentes tempos de tratamento sulfito-alcalino. Na região da interface, a cana de referência e a 140, foram as amostras que obtiveram menores valores de sacarificação enzimática de celulose. Analisando os símbolos no gráfico da interface, apenas os quadrados azul e vermelho estão mais distantes em comparação aos demais, isto por terem maiores valores de absorção correspondente aos ácidos hidroxinâmicos nas paredes celulares das fibras. No caso da cana referência, esta apresenta uma maior quantidade de lignina no vaso e na fibra. A interface das outras canas foi totalmente hidrolisada.

Na região do córtex, percebe-se claramente que há uma distinção na hidrólise enzimática da celulose para os tipos de cana. A celulose da cana 58 foi totalmente hidrolisada, por apresentar baixos valores de lignina e de ácidos hidroxinâmicos nos vasos e nas fibras. Por outro lado, as canas referência e 140 apresentaram as menores conversões de celulose, devido ao maior teor de lignina e ácidos hidroxinâmicos nas fibras e maior teor de lignina nos vasos. Entre essas canas, verifica-se uma menor hidrólise da cana 140, mesmo tendo menores quantidades de ácidos hidroxinâmicos e de lignina na fibra, em comparação com a referência. Uma possível explicação seria a maior quantidade de lignina no vaso da cana 140. Essa hipótese foi reforçada pelos resultados obtidos com as canas 140 e 89. Ambas apresentaram valores semelhantes de absorbância a 285 nm na fibra e a 315 nm nos vasos, no entanto a conversão de celulose da cana 89 foi maior, também atribuída ao fato de apresentar um menor teor de lignina nos vasos. Diante disso, pode-se inferir que a concentração de lignina no vaso influencia negativamente a hidrólise enzimática.

Figura 43: Conversão de celulose nas paredes da fibra e do vaso e a correspondente absorbância a 285 nm (●fibra, ▲vaso) e 315 nm (■fibra, ◆vaso) das regiões da interface e córtex das canas referência (azul), 89 (alaranjado), 58 (verde), 146 (lilás) e 140 (vermelho) tratadas com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.2. Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS)

A composição elementar da superfície das amostras foi determinada por XPS com profundidade variando de 3 a 10 nm, o que corresponde a aproximadamente 0,1% da largura da parede celular. A distribuição dos componentes da superfície da fibra foi

calculada pela comparação dos índices de oxigênio e carbono obtidos nos espectro de baixa resolução, tendo em vista que a relação O/C em celulose é de 0,83 e em lignina de 0,33 (STRÖM; CARLSSON,1992).

A interface e córtex das canas referência, 89, 58 e 146, tratadas com sulfito alcalino por 120 minutos e não tratadas mostraram que o carbono e o oxigênio estavam presentes na superfície das amostras. Em algumas amostras foram detectados nitrogênio e silício e em duas amostras tratadas (interface referência e interface 58) foram encontrados um teor de enxofre acima do limite mínimo de detecção do aparelho (0,1%). O cálcio foi detectado na interface de todas as amostras, provavelmente oriundo das substâncias pécticas da lamela média.

A relação entre o oxigênio (O) e o carbono (C) da superfície das amostras está apresentada na Tabela 12. Nos híbridos 89 e 146 a relação O/C aumentou na superfície das fibras do córtex e interface após o pré-tratamento sulfito alcalino. Este resultado reflete a remoção de lignina da superfície destas amostras. Contrariamente, a relação O/C diminuiu na interface e no córtex das canas referência e 58, enquanto sua concentração em massa também diminuiu. Esse resultado sugere que a lignina residual tenha se redistribuído para a superfície das canas referência e 58 durante o pré-tratamento. Além disso, como o pré-tratamento não removeu totalmente a lignina da lamela média, é possível que no córtex da cana referência o XPS tenha analisado uma região da fibra que estava envolta por lamela média e por isso a relação O/C tenha sido tão baixa nesta amostra.

A superfície coberta por lignina foi calculada a partir das relações O/C obtidas das regiões das canas em relação aos valores das relações para a lignina e celulose (STROM; CARLSSON, 1992). Para esse cálculo considerou-se amostra livre de extrativos, de forma que os componentes presentes na amostra seriam unicamente carboidratos e lignina. Os resultados mostraram que os níveis de remoção de lignina foram semelhantes, como observado com os híbridos, porém apresentaram diferenças na superfície da fibra coberta por lignina (Tabela 12). Esse tipo de variação é ainda mais comum de ser observada entre diferentes pré-tratamentos. A análise por XPS no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH, peróxido alcalino e hidrotrópico (xilenosulfonato de sódio e ácido fórmico) realizado por Mou et al. (2014), mostrou um nível de deslignificação semelhante ao obtido no pré-tratamento sulfito alcalino, porém a porcentagem de lignina na superfície dos bagaços foi comparativamente muito menor.

Tabela 12: Composição elementar da superfície de amostras da interface e córtex de canas pré-tratadas com sulfito alcalino determinadas por XPS.

Amostra	sulfito	lignina (%) ¹	lig. Sup. (%) ²	Baixa resolução O/C	Posição elemento/eV - alta resolução C (1s)			
	alcalino				%total de sinal da área			
					C-C e C-H	C-O	O-C-O e C=O	O=C-O
<i>Cultivar Referência</i>								
Interface	controle ³	18	40	0,63 (0,04) ⁴	24,6 (2,6)	51,1 (4,5)	16,0 (1,0)	6,5 (2,1)
	Tratado	13,7	36	0,65 (0,01)	24,4 (2,3)	51,2 (2,2)	17,9 (2,6)	6,5 (1,9)
Córtex	controle	20,9	34	0,66 (0,03)	26,1 (2,4)	54,5 (2,6)	14,8 (2,5)	4,6 (0,7)
	Tratado	13,7	82	0,42 (0,03)	47,6 (4,9)	35,5 (1,8)	13,1 (2,5)	3,9 (1,0)
<i>Hibrido 58</i>								
Interface	controle	16	32	0,67 (0,01)	22,3 (1,0)	55,4 (4,1)	17,9 (2,1)	4,5 (1,3)
	Tratado	3,26	34	0,66 (0,05)	34,5 (4,6)	46,0 (6,5)	16,7 (3,1)	2,9 (1,0)
Córtex	controle	19,65	40	0,63 (0,03)	25,9 (1,4)	53,0 (5,0)	17,0 (3,3)	4,1 (1,3)
	Tratado	3,82	54	0,56 (0,04)	50,6 (0,3)	32,2 (0,8)	10,3 (1,1)	4,9 (0,1)
<i>Hibrido 89</i>								
Interface	controle	14,97	44	0,61 (0,02)	31,5 (3,7)	47,1 (0,5)	16,9 (2,6)	4,5 (1,7)
	Tratado	5,18	30	0,68 (0,03)	18,1 (3,0)	60,2 (0,6)	18,7 (1,2)	2,9 (0,5)
Córtex	controle	19,24	52	0,57 (0,04)	29,6 (1,7)	50,9 (4,1)	15,2 (3,6)	4,3 (0,7)
	Tratado	6,28	32	0,67 (0,04)	21,3 (2,9)	59,8 (3,2)	14,9 (3,7)	3,5 (1,7)
<i>Hibrido 146</i>								
Interface	controle	19,1	42	0,62 (0,02)	25,6 (2,1)	49,7 (5,5)	18,4 (4,0)	6,4 (1,6)
	Tratado	4,64	20	0,73 (0,02)	14,4 (1,6)	56,7 (3,5)	23,3 (2,0)	5,6 (1,7)
Córtex	controle	22,9	54	0,56 (0,01)	44,1 (3,7)	41,5 (4,3)	12,0 (2,3)	3,9 (0,4)
	Tratado	8,44	32	0,67 (0,01)	19,1 (1,1)	56,2 (2,6)	21,0 (2,1)	4,1 (1,1)

(1) Teor de lignina; (2) superfície coberta por lignina; (3) amostra sem pré-tratamento; (4) desvio padrão.

As áreas relativas do estado de ligação carbono-carbono C (1s) foram obtidas dos espectros XPS de alta resolução das amostras (Tabela 12). A atribuição de bandas de C foi realizada de acordo com o deslocamento sofrido em relação à banda correspondente a ligação química de carbono não oxidado (C-C e C-H). As demais ligações com átomos de oxigênio apresentam deslocamentos específicos padrão para as análises de materiais lignocelulósicos (LAINE et al., 1994). Os percentuais de sinal de área mostraram um aumento na proporção de carbono alifático (C-C e C-H) em algumas amostras. Isso significa que sobre a superfície destas amostras, algum material rico em carbono foi

formado durante o tratamento, e que não foi retirado durante o procedimento de extração com acetona, utilizado na preparação da amostra.

5.4.3. Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS)

As canas 146 e 89 que apresentaram uma diminuição da lignina na superfície das fibras foram analisadas pelo ToF-SIMS. Informações mais detalhadas sobre a composição química da superfície das amostras foram adquiridas da interface e córtex destas canas. As partes fibrosas apresentaram diferenças na intensidade de sinais dos espectros das amostras controle e pré-tratadas e os resultados estão apresentados na Tabela 13. Em todas as amostras de cana apareceu um sinal típico com $m/z = 115$ Da, atribuído ao fragmento $C_5H_7O_3^+$ de pentoses. Esse sinal identifica a presença de xilana recobrindo a superfície externa das amostras (FARDIM; DURAN, 2003; KANGAS; KLEEN, 2004). Mesmo após o pré-tratamento esse sinal se mantém nas amostras, sugerindo que houve a precipitação de parte da hemicelulose sobre a superfície das fibras no final do pré-tratamento.

As características mais comuns dos espectros presentes nas amostras foram as seguintes: uma região do espectro de baixa massa (m/z de 0-100), construída a partir de um conjunto de pequenos fragmentos de hidrocarbonetos separados, provavelmente originados da clivagem de H_2O ou CH_4 , o que é típico para as amostras de biomassa. Uma região de massa m/z de 100-200 que apresentou picos característicos de xilose e arabinose com m/z de 115 e 133, respectivamente e de hexoses (proveniente de celulose, manana, galactana) com m/z de 127 e 145.

O espectro continha também picos característicos de produtos de degradação da lignina. O pico correspondente a unidade p- hidroxifenil (H) tem m/z 107,121, os picos em m/z 137 e 151 são de referentes à unidade guaiacil (G) e os picos em 167 e 181 são de unidades siringil (S) (Apendice B). Na maioria das análises, um contaminante comum de poli-dimetilsiloxano (PDMS) também estava presente com picos com m/z 147, 207, 221, e 281-283 (BRIGGS, 1998). A região do espectro com m/z acima de 200 Da não continha nenhum sinal forte, provavelmente porque a pré-extração da amostra com acetona tenha sido eficiente o bastante para remover os ácidos graxos, que normalmente dão picos de massa nesta região (KLEEN et al., 2003).

As áreas dos picos de pentoses, hexoses e lignina foram normalizadas dividindo-as pela área total, e dessa forma a relação entre área do pico de carboidratos e a área da lignina pode ser calculada (Tabela 13). As áreas que não são fibrosas (como nos vasos, parênquimas) foram retiradas do cálculo, ficando apenas uma análise da superfície das fibras. Os resultados mostram um aumento na intensidade do sinal dos carboidratos e a diminuição do teor de lignina na superfície depois do tratamento sulfito alcalino. O aumento foi mais evidente no sinal de pentose, atribuído às mudanças estruturais e realocações que ocorreram com as hemiceluloses durante o tratamento.

Tabela13: Intensidades de sinais dos espectro de massa de pentoses, hexoses e lignina normalizados obtidos pelo modo de íons positivo do ToF-SIMS. Desvio padrão entre parenteses.

Amostra	Tratamento	Hexoses	Pentoses	Lignina (H, S, G)	Relação carboidrato/lignina
<i>Híbrido 89</i>					
Interface	controle	0,0018 (0,0004)	0,0031 (0,0003)	0,0063 (0,0002)	0,33 (0,02)
	Tratado	0,0025 (0,0007)	0,0058 (0,0007)	0,0081 (0,0023)	0,55 (0,18)
Córtex	controle	0,0022 (0,0000)	0,0050 (0,0023)	0,0078 (0,0013)	0,48 (0,21)
	Tratado	0,0021 (0,0007)	0,0059 (0,0025)	0,0057 (0,0024)	0,64 (0,09)
<i>Híbrido 146</i>					
Interface	controle	0,0013 (0,0002)	0,0021 (0,0002)	0,0043 (0,0010)	0,35 (0,02)
	Tratado	0,0022 (0,0002)	0,0050 (0,0002)	0,0045 (0,0007)	0,70 (0,08)
Córtex	controle	0,0016 (0,0012)	0,0029 (0,0018)	0,0051 (0,0015)	0,41 (0,11)
	Tratado	0,0022 (0,0003)	0,0053 (0,0002)	0,0095 (0,0012)	0,40 (0,02)

A distribuição superficial dos diferentes componentes orgânicos da parede celular dos híbridos 89 e 146, antes e depois do tratamento foi avaliada por ToF-SIMS (Figuras 44 e 45). Nas imagens, os pixels mais claros representam maior intensidade, ou seja, maior contagem de sinais no local. A intensidade do sinal depende do tipo de composto, facilidade com que é fragmentado para os íons, o teor do composto sobre a superfície, e também da topografia, uma vez que os íons secundários escapam mais facilmente a partir de partes mais elevadas da amostra.

Para mapear a distribuição de lignina, os sinais de pico em m/z de 107, 121, 137, 151, 167 e 181 Da foram fotografados e para carboidratos os picos correspondentes foram

115, 133 e 145 Da. Os picos maiores nas imagens são os íons secundários mais intensos, portanto as regiões mais claras são locais que possuem maior quantidade do componente analisado.

Na imagem do total de íons, em que todo o espectro de massa de cada pixel está incluído na imagem, a topografia da superfície está mais nítida, assim foi possível identificar os feixes de fibras que contrastam com as regiões não-fibrosas (vasos). A distribuição de lignina e carboidratos foi uniforme ao longo das amostras na escala estudada. Após o tratamento, os sinais de lignina diminuíram na superfície das fibras, corroborando com a remoção de lignina. No entanto, mesmo depois do tratamento, observou-se a distribuição uniforme da lignina na superfície das amostras e o sinal mais intenso de carboidratos foi observada nas superfícies das fibras das amostras pré-tratadas. Isto ocorreu devido a maior exposição dos carboidratos com a remoção de lignina ou mesmo por ter havido alguma re-deposição de hemicelulose. Estes dados também corroboram com a relação previamente mostrada O/C, que aumentaram nos híbridos tratados 89 e 146.

Figura 44: Imagens no ToF-SIMS de total de íons, lignina e carboidratos na superfície da interface 146 não tratada e tratada. A barra da escala é 10 μ m.

	Total de íons	Lignina	Carboidratos
Interface 146 não-tratada
Interface 146 tratada
Córtex 146 não-tratado
Córtex 146 tratado

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 45: Imagens no ToF-SIMS de total de íons, lignina e carboidratos na superfície da interface e do córtex 89 não tratada e tratada. A barra da escala é 10µm.

	Total de íons	Lignina	Carboidratos
Interface 89 não-tratada
Interface 89 tratada
Córtex 89 não-tratado
Córtex 89 tratado

Fonte: Arquivo pessoal.

6. CONCLUSÕES

- O pré-tratamento sulfito alcalino foi seletivo para a remoção de lignina e hemicelulose, o que ocasionou uma melhora na eficiência da sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, em condições de alto rendimento de processo.

- A extensão da conversão enzimática do bagaço com o aumento do tempo de pré-tratado, foi atribuída à introdução de íons sulfito nas amostras, uma vez que a remoção de lignina e hemicelulose e o grau de retenção de água permaneceram praticamente constantes após 60 minutos de cozimento, mostrando que as fibras haviam atingido o ponto de saturação.

- As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que a retenção de água no bagaço pré-tratado favoreceu o aumento da espessura das fibras e descompactação dos feixes fibrovasculares.

- A hidrólise da celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar apresentaram o mesmo perfil cinético, porém obtiveram-se menores conversões de hemicelulose, onde se conclui que deveriam ser adicionadas outras hemicelulases ao preparado enzimático para favorecer a hidrólise deste polissacarídeo.

- A avaliação da ação do pré-tratamento sulfito-alcalino nas diferentes regiões da cana de açúcar mostrou uma menor remoção de lignina nas regiões externas da cana, que são mais lignificadas. Esse resultado mostrou que tipos celulares com espessuras de paredes celulares diferentes apresentam diferenças de recalcitrância. Além disso, as diferenças observadas do estudo de híbridos de cana com composição química variada e diferenças anatômicas afetaram o desempenho do pré-tratamento.

- As amostras interface e córtex com menores teores de lignina apresentaram um maior valor de retenção de água em relação à fração externa, o que corrobora com os dados de grupos ácidos, onde a interface e o córtex tiveram maiores valores. As amostras que incorporaram mais grupos ácidos tornaram-se mais hidrofílicas, assim retiveram mais água.

- Os experimentos com as regiões do colmo da cana mostraram que a medula pode ser hidrolisada enzimaticamente sem necessidade de ser pré-tratada, por ter maior abundância de células de parênquima. As demais regiões da cana: fração externa, córtex e

a interface precisaram ser pré-tratadas para reduzir a recalcitrância e serem mais facilmente hidrolisados enzimaticamente.

- Cada região das canas apresentou diferenças nos valores de adsorção de proteína, revelando que as regiões menos recalcitrantes possuem maior capacidade adsorptiva, ou seja, a adsorção decresce no sentido medula-fração externa. Após o tratamento, com a remoção de lignina, a celulose ficou mais exposta o que facilitou a adsorção das enzimas no material, onde se conclui que o pré-tratamento sulfito-alcálico é eficiente no aumento da adsorção de enzimas na superfície das amostras.

- As canas híbridas mostraram espectros de UV com menor intensidade no comprimento de onda característico da lignina quando comparado a espectros UV da cana referência, o que corrobora com os dados da caracterização química.

- Após o tratamento sulfito alcálico houve a diminuição na intensidade de todos os espectros médios nos diferentes tipos celulares (fibras, vasos e parênquima) das canas referência e dos híbridos, devido a remoção de lignina e ácidos hidroxicinâmicos. A remoção destes componentes da parede celular aumentou substancialmente os valores de conversão enzimática da celulose e hemicelulose. As fibras e vasos foram mais resistentes ao tratamento que o parênquima por apresentarem maior espessura de parede celular. A análise dos tipos celulares das regiões interface e córtex pré-tratadas por sulfito-alcálico pela micro-espectrofotometria UV mostrou uma menor absorção em 285 nm e 315 nm das paredes celulares presentes na interface. Nessa região a densidade celular de fibras e vasos é menor e favorece a penetração do licor sulfito.

- A análise por FE-SEM, XPS e ToF-SIMS das canas-de-açúcar tratadas com sulfito-alcálico mostraram diferenças significativas entre as amostras não-tratadas e as pré-tratadas. Imagens obtidas por FE-SEM revelaram que após o pré-tratamento com sulfito alcálico os feixes de fibras mostraram menos compactados e com maior largura.

- Através dos dados obtidos pelas análises de XPS e ToF-SIMS foi possível afirmar dois importantes efeitos do pré-tratamento sulfito alcálico: a remoção de lignina na superfície e a realocização/redeposição da hemicelulose durante o tratamento. Esta remoção na superfície de lignina foi importante por facilitar o acesso das enzimas a celulose e expor a celulose às celulasas, assim a amostra tratada com sulfito alcálico teve uma maior adsorção de celulasas a celulose e consequentemente altos valores de conversão de celulose a glicose. Outro importante efeito do pré-tratamento foi a redeposição/relocalização da hemicelulose, possivelmente devido a retirada da lignina, na

qual a hemicelulose está intimamente ligada, o que ocasionou o aumento das pentoses na superfície e facilitou o acesso das hemicelulases à hemicelulose.

- As técnicas usadas para avaliar a distribuição química na superfície da amostra e a morfologia da fibra foram implementadas com êxito, já que os dados gerados estão de acordo com a literatura. Essas técnicas em conjunto foram importantes para compreender o mecanismo do pré-tratamento sulfito alcalino na cana.

- A hidrólise da celulose e da hemicelulose das regiões do colmo da cana-de-açúcar e do bagaço foi facilitada em função das modificações químicas e estruturais das fibras ocasionadas pelo pré-tratamento sulfito-alcalino. A remoção de lignina, hemicelulose e incorporação de grupos iônicos nas amostras, diminuiu a recalcitrância, facilitando o acesso das enzimas à celulose, melhorando a adsorção de proteínas a celulose e consequentemente ficando mais susceptíveis a sacarificação enzimática.

- A cana 58 apresentou-se a variedade mais adequada ao pré-tratamento sulfito alcalino devido a melhor conversão de celulose e hemicelulose e a maior velocidade inicial de hidrólise enzimática.

- Os resultados revelaram a importância de se utilizar plantas híbridas, com menores teores de lignina, por proporcionarem maior conversão de celulose e hemicelulose e uma maior velocidade inicial de hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

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

ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000, p. 12.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, 3, v. 4, p. 1 - 11, 2010.

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

ATSUSHI, K.; AZUMA, J-I.; TETSUO, K. Lignin-carbohydrate complexes and phenolic acids in bagasse. **Holzforschung**, v. 38, p. 141 - 149, 1984.

BARR, T.L. **Modern ESCA: the principles and practice of X-ray photoelectron spectroscopy**. Boca Raton: CRC Press., 1994.

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

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.

BATTAN, B.; KUHAR, S.; SHARMA, J.; KUHAD, R. C. Biodiversity of hemicellulose degrading microorganisms and their enzymes. In: KUHAD, R. S.; SINGH, A. (Editores). **Lignocellulose biotechnology: future prospects**. New Delhi, India: I. K. International, 2007, p. 121.

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

BEATSON, R.P. Determination of sulfonate groups and total sulfur. In: Lin SY, Dence CW, editor. **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer, 1992, p.473-48.

BIERMANN, C.J. **Essentials of pulping and papermaking**. San Diego: Academic Press, 1993, p. 32-48.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BÖRÅS, L.; GATENHOLM, P. Surface properties of mechanical pulps prepared under various sulfonation conditions and preheating time. **Holzforschung**, v. 53, p. 429 - 434, 1999.

BOTTCHER, A.; CESARINO, I.; DOS SANTOS A. B.; VICENTINI R.; SAMPAIO, J.L.; MAYER, R.; VANHOLME, R.; MORREEL, K.; GOEMINNE, G.; MOURA, J.C.M.S; NOBILE, P.M.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; ANJOS, I.A.; CRESTE, S.; BOERJAN, W.; LANDELL, M.G.A; MAZZAFERA, P. Lignification in Sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. **Plant physiology**, v. 163, n.4, p.1539 - 1557, 2013.

BRIGGS, D. **Surface analysis of polymers by XPS and static SIMS**. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1998, p. 212.

BU, L.; XING, Y.; YU, H.; GAO, Y.; JIANG, J. Comparative study of sulfite pretreatments for robust enzymatic saccharification of corn cob residue. **Biotechnology Biofuels**, v. 5, p.87, 2012.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia para “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p.48-52, 2010.

CAO, Y.; HU, S-L.; HUANG, S-X.; REN P.; LU, X-Q. Molecular cloning, expression pattern, and putative cisacting elements of a 4-coumarate:CoA ligase gene in bamboo (*Neosin ocalamusaffinis*). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1-13, 2012.

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

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell wall in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1- 30, 1993.

CARVALHO, S.A.D.; FURTADO, A.T. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. *Gestão & Conexões = **Management and Connections Journal***, v. 2, n. 1, p. 22-46, 2013.

CASTRO, A. M. ; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CHAPPLE, C. M.; LADISCH, M. R.; MEILAN, R. Loosening lignin's grip on biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, n.7, p.746-748, 2007.

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

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

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU,H.M.C.; ARRUDA.P.; FILHO,J.C.B.; BURNQUIST,W.L.; CRESTE,S.; DI CIERO,L.; FERRO,J.A.; FIGUEIRA,A.V.O.; FILGUEIRAS,T.S.; GROSSI-DE-SÁ,M.F.; GUZZO,E.C.; HOFFMANN,H.P.; LANDELL,M.G.A.; MACEDO,N.; MATSUOKA,S.; REINACH,F.C.; ROMANO,E.; SILVA,W.J.; FILHO,M.C.S.; ULIAN,E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil.**Tropical Plant Biology**, v.4, p.62-89,2011.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. In: **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Terceiro Levantamento, dez 2013**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 16 março 2014.

CONNERS, T.E.; BANERJEE, S. **Surface analysis of paper**. New York: CRC Press, 1995.

COSTA, T. H.F.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T.O.; MILAGRES, A.M.F.; FERRAZ, A. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202-211, 2013.

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

DEL-RIO, L.F.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. The effects of increasing swelling and anionic charges on the enzymatic hydrolysis of organosolv-pretreated softwoods at low enzyme loadings. **Biotechnology Bioengineering**, v.108, p.1-10, 2011.

DORRIS, G.; GRAY, D. The surface analysis of paper and wood fibres by ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis).I: Application to cellulose and lignin. **Cellulose Chemistry Technology**, v.12, p.9-23, 1978.

DRIEMEIER, C.; SANTOS, W.D.; BUCKERIDGE, M.S. Cellulose crystals in fibrovascular bundles of sugarcane culms: orientation, size, distortion, and variability. **Cellulose**, v.19, p.1507-1515, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1976.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technology**. Berlin: Walter de Gruyter, v.1, p.308, 2009.

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

FARDIM,P.; GUSTAFSSON,J.; SCHOULTZ,S.; PELTONEN,J.; HOLMBOM,B. Extractives on fiber surfaces investigated by XPS, ToF-SIMS and AFM, **Colloids and Surface**, v.255, p.91-103, 2005.

FARDIM,P.; DURÁN,N. Modification on fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM,XPS and ToF-SIMS, **Colloids and Surfaces**, v. A223, n.1-3, p.263-276, 2003.

FARDIM, P.; HOLMBOM, B. Origin and surface distribution of anionic groups in different papermaking fibres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 252, p.237–242, 2005.

FARDIM, P.; GUSTAFSSON, J.; VON SCHOULTZ, PELTONEN, J.; HOLMBOM, B. in: 7.Aug.2002. Turku/Abo, Finland: **Proceedings of 7th EWLP**, v.451 p.26-29.

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

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

FERGUS, B.J.; GORING, D.A.I. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. **Holzforschung**, v.24, p.113-117, 1970.

FROMM, J.; ROCKEL, B.; LAUTNER, S.; WINDEISEN, E.; WANNER, G. Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. **Journal of Structural Biology**, v.143, p.77-84, 2003.

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

GOACHER, R.E.; EDWARDS, E.A.; YAKUNIN, A.F.; MIMS, C.A.; MASTER, E.R. Application of Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry for the detection of enzyme activity on solid wood substrates. **Analytical Chemistry**, v. 84, p.4443-4451, 2012.

GOULD, J.M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.46-52, 1984.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and applied chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BARRIERE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Critical Review in Biology**, v. 327, p.455-465,2004.

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? a review of cell wall model studies. **Crop Science** , v.45, p.820-831,2005.

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

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

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; KUSTER, T.; PELL, A. N. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1453-1459, 1996.

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

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

GREGG, D. J.; BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. **Bioresource Technology**, v.63, p.7-12,1998.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 419-425, 2011.

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

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

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III.Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) lignin with respect to the

composition of structural units in different morphological regions. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v.10, p.435–459, 1990.

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

HENRISSAT, B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose**, v.1, p.169-196, 1994.

HEUSER, E. Trends in fundamental research in the cellulose and wood pulp field, **TAPPI**, v. 33, p. 118–124, 1950.

HIGUCHI, T. Degradative pathways of lignin model compounds. In: HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. London: Academic Press, 1984, p.557-577.

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v.52, p. 2-8, 2006.

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

HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 224-229, 2002.

IDREES, M.; ADNAN, A.; QURESHI, F.A. Optimization of sulfide/sulfite pretreatment of lignocellulosic biomass for lactic acid production. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-11, 2013.

JEON, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology Progress**, v. 22, p.270–277, 2008.

JØRGENSEN, H.; VIBE-PEDERSEN, J.; LARSEN, J.; FELBY, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 862–870, 2007.

JØRGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888-Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381–390, 2006.

JUNG, H.G.; CASLER, M.D. Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. **Crop Science**, v. 46, p. 1801-1809, 2006.

JUNG, S.; FOSTON, M.; SULLARDS, M.C.; RAGAUSKAS. Surface characterization of dilute acid pretreated *Populus deltoides* by ToF-SIMS. **Energy Fuels**, v.24, p.1347-1357, 2010.

KANGAS, H.; KLEEN, M. Surface chemical and morphological properties of mechanical pulps fines. **Nordic Pulp Paper Research Journal**, v.19, p.191-199, 2004.

KATO, A.; AZUMA, J.I.; KOSHIJIMA, T. Isolation and identification of a new feruloylated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p.1691-1693, 1987.

KLEEN, M.; KANGAS, H.; LAINE, C. Chemical characterization of mechanical pulp fines and fiber surface layers. **Nordic Pulp Paper Research Journal**, v.18, p.361-368, 2003.

KOCH, G.; SCHMITT, U. Topochemical and Electron Microscopic Analyses on the Lignification of Individual Cell Wall Layers During Wood Formation and Secondary Changes. In: J. Fromm (ed.), Cellular Aspects of Wood Formation, Plant Cell Monographs 20, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

KOCH, G.; KLEIST, G. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. **Holzforschung**, v.55, p.563-567, 2001.

KOCH, G.; ROSE, B.; PATT, R.; KORDSACHIA, O. Topochemical investigations on delignification of *Picea abies* [L.] Karst. during Alkaline Sulfite (ASA) and bisulfite pulping by scanning UV microspectrophotometry. **Holzforschung**, v. 57, p. 611-618, 2003.

KOLJONEN, K.; OSTERBERG, M.; JOHANSSON, L-S; STENIUS, P. Surface chemistry and morphology of different mechanical pulps determined by ESCA and AFM. **Colloids and Surfaces A**, v. 228, p.143-158, 2003.

KONN, J.; PRANOVICH, A.; HOLMBOM, B. Dissolution of fibre material in alkaline pretreatment and refining of spruce CTMP. Holmbom, **Holzforschung**, v. 60, p. 32–39, 2006.

KRISTENSEN, J. B.; THYGESEN, L. G.; FELBY, C.; JORGENSEN, H.; ELDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p.1-9, 2008.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p.411-456, 1999.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

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

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 201-208, 2011.

LAINE, J.; STENIUS, P.; CARLSSON, G.; STRÖM, G. Surface characterization of unbleached kraft pulps by means of ESCA. **Cellulose**, v., n.2, p.145-160, 1994.

LAURITO-FRIEND, D. F. **Pré-tratamento sulfito alcalino e hidrólise enzimática de bagaços de cana-de-açúcar com diferentes composições químicas**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena–SP, 2013.

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

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

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

LEE, D.; YU, A. H. C.; SADDLER, J. N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosics. **Biotechnology Bioengineering.**, v.45, p.328-336,1995.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061-3068, 2007.

LI, X.; WENG, J.K; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **Plant Journal**, v.54, n.4, p. 569-581, 2008.

LI, Z.; QIN,Y.; QIN,M.; NA LIU,N.; XU,Q.; FU,Y.; YUAN, Z. Changes of anionic groups in alkaline peroxide-impregnated aspen chemithermomechanical pulp during subsequent alkaline peroxide bleaching. **Carbohydrate Polymers**, v.88, p.1041-1046, 2012.

LYMAYEN, R.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LIU, H.; ZHU, J.Y. Eliminating inhibition of enzymatic hydrolysis by liginosulfonate in unwashed sulfite-pretreated aspen using metal salts. **Bioresource Technology**, v.101, p.9120-9127, 2010.

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

LOU, H.; ZHU, J.Y.; LAN, T.Q.; LAI, H.; QIU, X. pH-induced lignin surface modification to reduce nonspecific cellulose binding and enhance enzymatic saccharification of lignocellulosics. **Chem Sus Chem**, v. 6, p. 919-927, 2013.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p.641-654, 2002.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.506-577, 2002.

LYBEER, B.; KOCH, G. Lignin distribution in the tropical bamboo species *Gigantochloa levis*. **IAWA J.**, v. 26, p. 443-456, 2005.

MACDONALD, D. G.; BAKHSHI, N. N.; MATHEWS, J. F.; ROYCHOWDHURY, A.; BAJPAI, P.; MOO-YOUNG, M. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 8, p. 2067-2076, 1983.

MCDUGALL, G.J; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n.1, p. 1-20, 1993.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; DE CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n.5, p.1196-1201, 2011.

MAHONEY,C.M.; GILLEN G.;FAHEY,A.J. Characterization of gunpowder samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS).**Forensic Science International**, v.158, p.39-51, 2006.

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

MEEIER, H. On the behavior of wood hemicelluloses under different pulping conditions, Part I, Birch hemicellulose. **Svensk Papper Stidning**, v.65, p.299-305,1962.

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

MENDONÇA, R. ; FERRAZ, A. ; KORDSACHIA, O; KOCH, G. Cellular UV-microspectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda* and *Pinus elliottii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* (Pil-t) Gilbn. &

Ryv. and alkaline sulfite/anthraquinone treatment. **Wood Science and Technology**, v. 38, p. 567-575, 2004.

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

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, p.673-686, 2005.

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

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 25, p. 644-650, 1999.

MOORE, P. H. Physiological basis for varietal improvement in sugarcane. In: **Proceedings of International Symposium on Sugarcane varietal improvement held**, Sugarcane Breeding Institute, Coimbatore, India, p.57-77,1987.

MOU, H.; IMAZAKI, E.; ZHAN, H.; ORBLIN, E.; FARDIM, P. Advanced studies on the topochemistry of softwood fibers in low consistency refining as analyzed by FE-SEM, XPS, and ToF-SIMS. **BioResources**, v.8, n.2, p.2325-2336, 2013.

MOU, H.; HEIKKILÄ, E.; FARDIM, P. Topochemistry of environmentally friendly pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse to fermentable sugar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.16, p.3619-3625, 2014.

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporum*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lisozymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1097-1111, 2001.

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

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; KADLA, J. F.; SADDLER, J. N. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 538-548, 2011a.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. The Influence of lignin on the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass substrates. In: Zhu, J.Y., Zhang, X., Pan, X.J. (Eds.), **Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass**, Washington: ACS Symposium Series, v. 1067. American Chemical Society, 2011b, p. 145–167.

ORBLIN, E.; LINDSTROM, N.; FARDIM, P. Probing the chemical and surface chemical modification of vessel cell walls during bleaching of eucalyptus pulp, **Holzforschung**, v. 66, p. 945-950, 2012.

ORBLIN, E.; FARDIM, P. Surface chemistry of deinked pulps as analysed by XPS and ToF-SIMS. **Surface and interface analysis**, v.42, p.1712-1722, 2010.

O'CONNOR, D. J.; SEXTON, B. A.; SMART, R. S.T. C. **Surface analysis methods in materials science**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

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

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

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v.5, p.53-63, 2002.

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

PU, Y.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B.H.; RAGAUSKAS, A.J. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.15, 2013.

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

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

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

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

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

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on the cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, p.19-25, 1993.

REHBEIN, M.; PEREIRA, M.; KOCH, G.; KORSACHIA, O. Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping. **Wood Science Technology**, v.44, p.435-449, 2010.

REINERT, F.; HÜFNER, S. Photoemission spectroscopy - from early days to recent applications. **New Journal Physics**, v.7, p.97, 2005.

REZENDE, C.A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.54, 2011.

RIPOLLI, C.C.; RIPOLLI, M.L.C. **Biomassa de cana-de-açúcar**: colheita, energia e ambiente. Piracicaba: Barros & Marques, 2004, v. 1-11, p. 57- 61.

RIVERS, D.B.; EMMERT, G.H. Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. **Biotechnology Letters**. v. 9, p. 365-368, 1987.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Ind. Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHA, B.C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. **American Chemical Society**, p. 2-34, 2004.

SAITO, K.; KATO, T.; TSUJI, Y.; FUKUSHIMA, K. Identifying the characteristic secondary ions of lignin polymer using ToF-SIMS. **Biomacromolecules**, v.6, p.678-683, 2005.

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

SANJUAN, 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 wekstoff**, v.59, p.447-450, 2001.

SANNIGRAHI, P.; MILLER, S.J.; RAGAUSKAS, A.J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in *Loblolly pine*. **Carbohydrate Research**, v.345, n.7, p.965-970, 2010.

SERPA, J.; POLIKAPORV, I. Enzymes in Bioenergy. In: **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer; p.199-239, 2011.

SHELL, D.J.; TORGET, R.; POWER, A.; WALTER, P.J.; GROHMANN, K.; HINMAN, N.D. A technical and economic analysis of acid-catalyzed steam explosion and dilute sulfuric acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p.87-97, 1991.

SIMMONS, B.A.; LOQUE, D.; RALPH, J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. **Current Opinion in Plant Biolgy**, v.13, p.313-320, 2010.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, n.16, p. 3000-3011, 2007.

SINGH, A.; KUMAR, P. K. R.; SCHUGERL, K. Adsorption and reuse of cellulases during saccharification of cellulosic materials. **Journal Biotechnology**, v.19, p.205-212, 1991.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

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.

SOTO, M. L.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls, **Bioresource Technology**, v. 49, n.1, p. 53-59, 1994.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. 2.ed.San Diego: Academic press, 1993, p.130.

STRÖM, G.; CARLSSON, G. Wettability of kraft pulps: effect of surface composition and oxygen plasma treatment. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.6, p.745-76,1992.

STARCHER, B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. **Analytical Biochemistry**, v.292, p.125-129, 2001.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal Ultrastructure Research**, v.26, p.31-43, 1969.

STENIUS, P. **Forest products chemistry: Papermaking science and technology**, Finlândia: Gummerus Printing, 2000, p.83.

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

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

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; TAKABE, K. Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. **Holzforschung**, v.40, p.101-105, 1986.

TELEMAN, A. Hemicelluloses and Pectins. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G.(Editores). **Pulp and Paper Chemistry and Technology: wood chemistry and wood biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG., 2009, v. 1, p.101.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trend in Biotechnology**, v.15, p. 160–167, 1997.

TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 398-406, 2007.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, 2014. In: Department of energy bioenergy research Centers, fev. 2014. Disponível em: <http://genomicscience.energy.gov/centers/BRCs2014HR.pdf>. Acesso em: 28 de agosto de 2014.

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

VANHOLME, R.; VAN ACKER, R.; BOERJAN, W. Potential of arabidopsis systems biology to advance the biofuel field. **Trends Biotechnology**, v.28, p.543-547, 2010.

VAN ACKER, R.; VANHOLME, R.; STORME, V.; MORTIMER, J.C.; DUPREE, P.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, p.46, 2013.

VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N.S.; LADISCH, M.R.; CARPITA, N.C. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. **Crop Science**, v.47, p. 145-153, 2007.

VICKERMAN, J. C. Molecular surface mass spectrometry by Sims. In: **Surface analysis – the principal techniques**. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2009, p.113-203.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.301-307, 2008.

WANG, G.S.; PAN, X.J.; ZHU, J.Y.; GLEISNER, R.; ROCKWOOD, D. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnology Progress**, v.25, p.1086-1093, 2009.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Animal cellulases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p.1167-1178, 2001.

WENG, J.K.; LI, X.; BONAWITZ, N.D.; CHAPPLE, C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Current Opinion Biotechnology**, v.19, p.166-172, 2008.

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

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v.96, p. 1959- 1966, 2005.

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

YANG, B.; BOUSSAID, A.; MANSFIELD, S. D.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, p.678-684, 2002.

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

ZENG, M.; XIMENES, E.; LADISCH, M.,R.; MOSIER, N.,S.; VERMERRIS, W.; HUANG, C-P.; SHERMAN, D.,M. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hotwater: Enzymatic hydrolysis (Part 1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 390-397, 2012.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem, **Bioresource Technology**, v. 99, n.9, p. 3729-3736, 2008.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v.6, p.465-482, 2012.

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

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

ZHOU, H.; LOU, H.;YANG,D.;ZHU,J.Y.;QIU,X. Lignosulfonate to enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses: Role of molecular weight and substrate lignin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 8464-8470, 2013.

ZHOU, C.; LI, Q.; CHIANG, V. L.; LUCIA, L. A.; GRIFFIS, D. P. Chemical and spatial differentiation of syringyl and guaiacyl-lignins in Poplar Wood via Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n.18, p.7020-7026, 2011.

ZHONG, L.; FU,S.; LI, F.; ZHAN,H. Chroline dioxide treatment of sisal fibre: surface lignin and its influences on fibre surface characteristics and interfacial behavior of sisal fibre phenolic resin composites. **Bioresources**, v. 5, n.4, p. 2431-2446, 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 n.8, p. 2411-2418, 2009.

ZHU, J.Y.; PAN, X.J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4992- 5002, 2010.

Apêndice A- Espectros ultravioletas de cada tipo celular das regiões córtex, interface e medula das cana-de-açúcar sem tratamento

Figura A1: Espectros médios obtidos a partir de paredes celulares dos três principais tipos de células nas regiões córtex, interface e medula de um entrenó da cana de referência.

Figura A2: Espectros médios obtidos a partir de paredes celulares dos três principais tipos de células nas regiões córtex, interface e medula de um entrenó do híbrido 89.

Figura A3: Espectros médios obtidos a partir de paredes celulares dos três principais tipos de células nas regiões córtex, interface e medula de um entrenó do híbrido 58.

Figura A4: Espectros médios obtidos a partir de paredes celulares dos três principais tipos de células nas regiões córtex, interface e medula de um entrenó do híbrido 140.

APÊNDICE B- Espectro de ToF-SIMS com íons positivos das amostras

Figura B1: Espectro de ToF-SIMS com íons positivos da interface 146 não-tratada, 0-300 Da.

Figura B2: Espectro de ToF-SIMS com íons positivos da interface 146 tratada com sulfito-alcalino, 0-300 Da.