UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JOSEANA ROCHA DO MONTE MARASSI

Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar
pré-tratados com sulfito ácido

Lorena
2013

JOSEANA ROCHA DO MONTE MARASSI

Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar
pré-tratados com sulfito ácido.

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
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

Versão Original

Lorena – SP
2013

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.

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

Monte Marassi, Joseana Rocha do

Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito ácido. / Joseana Rocha do Monte Marassi. - Versão original. - 2013.
145 p.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.

Orientador: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Adsorção de proteínas 2. Bagaço de cana-de-açúcar 3. Hidrólise enzimática
4. Pré-tratamento sulfito ácido. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira,
orient.

664.113 - CDU

Dedico este trabalho à minha amada família,
que sempre acreditou em mim, ainda que
eu mesma tenha perdido, por várias vezes,
a fé, a coragem e a esperança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e me manter sempre firme nos meus propósitos.

À Professora Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela orientação, amizade, confiança e disponibilidade.

À minha mãe, Maria José, *in memoriam*, por todos os ensinamentos e anos dedicados a moldar meu caráter e me encher de amor e carinho.

Ao meu pai, Marcelo Monte, pelo exemplo de sabedoria, força e persistência.

Às minhas filhas, gêmeas, presentes de Deus, Mariana e Cecília, que chegaram para me dar força e ânimo para vencer mais essa etapa e com seus ‘chutinhos’ me incentivaram a terminar a escrita da tese.

Aos meus irmãos Marcelo, Regina, Isabel e Elisa que mesmo à distância sempre me incentivaram, apoiaram e confiaram em mim.

Ao meu marido, Renato, pela paciência, amor e apoio constante.

Aos meus primos Eleonora e Valmir, pela atenção, confiança, incentivo e amor.

Ao Professor Dr. André Ferraz por todas as explicações, ensinamentos e dúvidas sanadas.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica, Luciane, Fernanda, Débora, Mariana, Gabriela Mocelin, Flávio Tominaga, Germano, Felipe, Paula, Celso, Guilherme, Jéssica e Djalma, pela amizade, carinho, ajuda e pelos cafés.

Aos amigos do Laboratório de Ciências da Madeira, José Moreira e Zé Cobrinha, Victor, Thales, Fernanda, Maria Fernanda e Omar pela atenção, auxílio, conversas e incentivo.

Aos amigos e professores do Departamento de Biotecnologia, Professor Dr. Ismael Mancilha, Professor Dr. Arnaldo Prata, Professor Dr. Adilson Gonçalves, Professora Dra. Maria Bernadete de Medeiros, Professora Dra. Inês Roberto, Professora Dra. Rita Rodrigues, Cibele Rosa, Naila Mori, Rafael Garcia, Karen Chagas, Diogo Hendges, Flavio Ferraz, Bruno Guedes, Orerves, Fabrício e Bárbara, pelos cafés, aprendizados, carinho e respeito.

Ao professor Paulo Atsushi Suzuki e ao técnico Bento Ferreira, do Departamento de Materiais pelas análises, atenção, disponibilidade e carinho.

À Professora Dra. Solange Inês Mussato e ao Professor Dr. Giuliano Dragone pela disponibilidade, acolhida, confiança e ensinamentos durante minha estada na Universidade do Minho, em Braga, Portugal.

Ao Professor Dr. José Teixeira da Universidade do Minho, pela acolhida, confiança e respeito.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Mariana Anjos, Eduardo Coelho, Lina Fernanda, Ana Rodrigues, Elizabete, Sara Silvério, além de tantos outros amigos portugueses, colombianos e brasileiros que pude fazer na minha estada em Braga, Portugal.

A todos as pessoas que, de alguma forma, participaram da minha caminhada na vida acadêmica.

À banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MONTE-MARASSI, J. R. **Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito ácido**. 2013. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, para a obtenção de uma alta eficiência de conversão dos polissacarídeos a monossacarídeos, é dependente de fatores relacionados à sua morfologia e composição química. Assim, uma etapa de pré-tratamento é necessária, visando obter um substrato menos recalcitrante. O objetivo principal deste trabalho foi estudar o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes amostras de bagaço de cana, para verificar como as mudanças ocorridas nas fibras poderiam influenciar na conversão enzimática da celulose. A metodologia do pré-tratamento sulfito ácido se baseia na modificação química do substrato, através da remoção de hemicelulose e da sulfonação da lignina, seguida do desfibramento mecânico. O efeito da adição de Na_2SO_3 nas concentrações de 0 a 10% (m/m) com carga fixa de 2,5% (m/m) H_2SO_4 foi avaliado no pré-tratamento da variedade comercial do bagaço (VC), a 121°C. O efeito da variação da temperatura do pré-tratamento (130 °C, 150 °C e 160 °C) foi avaliado na reação com sulfito ácido para os bagaços da VC e dos híbridos H89, H146 e H166. As modificações na composição química dos bagaços foram determinadas, assim como o conteúdo de grupos sulfônicos, o grau de retenção de água e o padrão de difração de raios-X. Métodos como a microscopia eletrônica de varredura, FTIR e análises térmicas (TGA e DSC) completaram a caracterização dos bagaços pré-tratados. O efeito da carga enzimática foi avaliado na hidrólise dos bagaços pré-tratados, mantendo-se fixa a consistência de 2 % (m/v) e variando-se a carga enzimática de celulases de *Trichoderma reesei* misturadas com β -glicosidase de *Aspergillus niger* na proporção de 5:10; 10:20 e 20:40 FPU/UI, respectivamente. Pôde-se observar que o aumento da carga de sulfito, como também o aumento da temperatura do pré-tratamento, resultaram na maior remoção de hemicelulose e lignina. A remoção de hemicelulose atingiu 70 %, nos bagaços pré-tratados a 160 °C. Os valores de retenção de água foram mais baixos nos bagaços com menor teor de hemicelulose e o índice de cristalinidade (IC_{corr}), calculado e corrigido pelo rendimento, aumentou com o aumento da temperatura. O fator de severidade do pré-tratamento não se correlacionou com a conversão enzimática da celulose e da hemicelulose, porém a maior remoção de hemicelulose promoveu uma melhor ação das enzimas nos substratos. O efeito da concentração de enzima na hidrólise dos bagaços pré-tratados não foi proporcional à conversão da celulose, sendo a melhora da conversão mais evidente, quando se aumentou a carga enzimática, na menor temperatura do pré-tratamento. A porcentagem de adsorção enzimática da mistura enzimática foi baixa para os bagaços testados, porém para o Avicel, essa porcentagem aumentou 1,6 vezes. Os testes de ninidrina e o de Bradford para determinação da proteína mostraram resultados semelhantes, nos quais, pôde-se notar uma baixa quantidade de proteínas no bagaço e alta quantidade de proteína nas águas de lavagens, respectivamente.

Palavras-chave: Adsorção de proteínas. Bagaço de cana. Hidrólise Enzimática. Pré-tratamento sulfito ácido.

ABSTRACT

MONTE-MARASSI, J. R. **Enzymatic Saccharification of sugarcane bagasses pretread with acid sulfite**. 2013. 145 p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, to obtain a high efficiency of conversion of polysaccharides in monosaccharides, is dependent on factors related to the morphology and chemical composition. Therefore, a pretreatment step is necessary in order to obtain a less recalcitrant substrate. The main objective of this work was to study acid sulfite pretreatment in different samples of sugarcane bagasse, to verify how the changes in the fibers could influence the enzymatic conversion of cellulose. The methodology of acid sulfite pretreatment is based on the chemical modification of the substrate by removing hemicellulose and lignin sulfonation, followed by mechanical refining. The effect of the addition of Na_2SO_3 at concentrations of 0 to 10 % (w/w) with constant loading of 2.5 % (w/w) H_2SO_4 was evaluated to pretreat commercial variety of bagasse (VC) at 121 °C. The effect on the variation of pretreatment temperature (130 °C, 150 °C and 160 °C) was evaluated to the acid sulfite reaction with the VC and hybrids H89, H146, H166. The changes in the chemical composition of bagasses were determined, as well as the sulfonic acid groups content, the degree of water retention value and the X-rays diffraction pattern. Methods such as scanning electron microscopy, FTIR and thermal analysis (TGA and DSC) completed the characterization of the pretreated bagasse. The effect of enzyme loading was evaluated in the hydrolysis of pretreated bagasse, fixing the consistency at 2 % (w/v) and cellulases derived from *Trichoderma reesei* mixed by β -glucosidase of *Aspergillus niger* in enzyme loadings of 5:10, 10:20 and 20:40 FPU:IU, respectively. It was observed that increasing the sulfite loadings, as well the temperature of pretreatment resulted in high removal of hemicellulose and lignin. The removal of hemicellulose reached 70 % in the pretreated bagasses at 160 °C. The water retention values were lower in bagasses with low hemicellulose content and the crystallinity index (IC_{corr}) calculated and corrected by pretreatment yields increased under high temperature. The severity factor pretreatment did not correlate with the enzymatic conversion of cellulose and hemicellulose, but the highest removal of hemicellulose promoted a better action of enzymes on substrates. The effect of enzyme concentration on the hydrolysis of pretreated bagasses was not proportional to the conversion of cellulose, with an evident improvement of conversion, when the enzyme loading was increased at the lowest pretreatment temperature. The percentage of adsorption of enzyme mixture in pretreated bagasse was low for the bagasses evaluated, but for Avicel, this percentage increased in 1.6 times. Ninhydrin and Bradford tests to protein determination showed similar results, resulting in a low amount of protein in the pulp and high amount of protein in the washings, respectively.

Keywords: Proteins adsorption. Sugarcane Bagasse. Enzymatic Hydrolysis. Acid sulfite pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (MARTINS, 2005).....	27
Figura 2. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose formando a celobiose (SOLOMONS, 1996).....	27
Figura 3. Transformação da celulose nativa em vários alomorfos (LENGOWSKI, 2012). 29	
Figura 4. 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 (PITARELO, 2007).	30
Figura 5. Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico.	30
Figura 6. Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina (lignina tipo G) (CARVALHO et al., 2009).	31
Figura 7. Modo de ação de celulasas sobre a celulose (MARTINS, 2005).	38
Figura 8. Estruturas típicas das celulasas. À esquerda, a representação do sítio ativo em forma de chave de uma endoglucanase da família 6. À direita, o sítio ativo de uma exocelulase em forma de túnel. Enzyme... ..	39
Figura 9. Estrutura representativa da ação de hemicelulasas na cadeia principal e grupos pendentes da hemicelulose.....	40
Figura 10. Aspecto de cor e tamanho das partículas dos bagaços de cana-de-açúcar.	53
Figura 11. Etapas do pré-tratamento químio-mecânico sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.	54
Figura 12. Reator de aço inox (800 mL) usado para o pré-tratamento dos bagaços (A). Os reatores são aquecidos em banho silicone nas temperaturas do processo (B).	55
Figura 13. Fluxograma da caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados.....	57
Figura 14. Fluxograma de determinação dos grupos ácidos presentes nos substratos gerados pelo pré-tratamento sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.	60
Figura 15. Representação esquemática do sistema de volume de retenção de água (SANTI JUNIOR, 2011).	61
Figura 16. Fluxograma da sacarificação enzimática dos substratos gerados pelo pré-tratamento sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.	69

Figura 17. Esquema dos passos realizados para determinação da adsorção enzimática nos substratos.....	71
Figura 18. Representação esquemática do teste de ninidrina.....	72
Figura 19. Remoção de componentes da Variedade Comercial do bagaço de cana-de-açúcar submetida ao pré-tratamento sulfito ácido, em diferentes cargas de Na ₂ SO ₃ a 121 °C.	78
Figura 20. Conversão enzimática da celulose e da hemicelulose dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados a 121°C com H ₂ SO ₄ a pH 1,5 (●) e com Na ₂ SO ₃ 5,0 % a pH 2,1 (●); com 5 FPU de Cellubrix/10 UI de Novozym.....	80
Figura 21. Determinação dos grupos sulfônicos (GS) presentes nas fibras dos bagaços de cana-de-açúcar e da retenção de água (WRV), após o pré-tratamento sulfito ácido.	86
Figura 22. Perfil da cristalinidade dos bagaços de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e após os pré-tratamentos sulfito ácido, em diferentes temperaturas.	88
Figura 23. Perfil da cristalinidade dos bagaços de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e após a melhor condição do pré-tratamento sulfito ácido e sua respectiva hidrólise enzimática.	89
Figura 24. Variação do índice de cristalinidade corrigido (IC _{corrigido}) da Variedade Comercial pela remoção de componentes.	91
Figura 25. Fotomicrografias da Variedade Comercial, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas.	93
Figura 26. Fotomicrografias do Híbrido 89, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas.....	93
Figura 27. Fotomicrografias do Híbrido 146, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas.	94
Figura 28. Fotomicrografias do Híbrido 166, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas.....	94
Figura 29. Determinação do perfil FTIR dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido.	97
Figura 30. Comparação dos espectros de FTIR do híbrido H89 <i>in natura</i> , na melhor condição do pré-tratamento sulfito ácido e após a hidrólise enzimática.	98
Figura 31. Curvas de TGA dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido, em diferentes temperaturas.	99
Figura 32. Determinação do perfil DSC dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas.	101

Figura 33. Conversão enzimática da celulose dos bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas, na menor carga enzimática.....	104
Figura 34. Conversão enzimática da hemicelulose dos bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas na menor carga enzimática.....	105
Figura 35. Conversão enzimática da celulose dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido nas temperaturas de 130 °C, 150 °C e 160 °C durante a hidrólise enzimática com carga alta (curva em vermelho), carga média (curva em verde) e carga baixa (curva em azul) da mistura de celulasas comerciais.....	107
Figura 36. Conversão da celulose dos bagaços de cana pré-tratados com sulfito ácido a 160 °C, em função da carga enzimática, em 48 h de reação.....	109
Figura 37. Conversão enzimática da hemicelulose dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido nas temperaturas de 130 °C, 150 °C e 160 °C durante a hidrólise enzimática com carga alta (curva em vermelho), carga média (curva em verde) e carga baixa (curva em azul) da mistura de celulasas comerciais.	110
Figura 38. Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana a 160 °C, relação entre o fator de severidade e a remoção de hemicelulose.	113
Figura 39. Perfil da adsorção enzimática nos bagaços de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas, medido pelo teste da ninidrina.	115
Figura 40. Perfil da porcentagem de enzima livre nas águas de lavagem dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas, medida pelo teste de Bradford.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar.	74
Tabela 2. Atividades das enzimas hidrolíticas e teor de proteínas presentes nos preparados enzimáticos comerciais.	75
Tabela 3. Composição química da variedade comercial de cana-de-açúcar, após tratamento com sulfito de sódio em meio ácido (H_2SO_4 , 2,5 % m de ácido/m de bagaço), a 121°C. .	76
Tabela 4. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar após tratamento com ácido sulfúrico diluído e com 5 % sulfito/ácido, a 121°C.	78
Tabela 5. Caracterização química de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito ácido (Na_2SO_3 5,0 %; pH 2,1), em diferentes temperaturas.	82
Tabela 6. Remoção de componentes durante o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas.	84
Tabela 7. Índice de cristalinidade corrigido dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com sulfito ácido em diferentes temperaturas.	90
Tabela 8. Quantificação do S, presente nas fibras dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C.	95
Tabela 9. Cálculo do fator de severidade (CSF) do pré-tratamento em diferentes temperaturas.	112

ABREVIATURAS

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

Na_2SO_3 – Sulfito de sódio

SPORL – Pré-tratamento com sulfito para diminuir a recalcitrância de lignocelulósicos

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GS – Grupos Sulfônicos

WRV – Valor de retenção de água

INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

RFA – Renewable Fuels Association

DRX – Difração de Raios-X

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

AFEX – explosão de fibra com amônia

ARP – percolação de amônia com reciclagem

AD – Ácido Diluído

SO_2 – Dióxido de Enxofre

HSO_3^- – Íons Hidrogenossulfito ou Bissulfito

SO_3^{2-} – Íons Sulfito

NaOH – Hidróxido de Sódio

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

IC – Índice de Cristalinidade

IC_{corr} – Índice de Cristalinidade Corrigido

CBD – Domínio de Ligação a Celulose

CBH I – Celobioidrolase I

CBH II – Celobioidrolase II

BSA – Albumina do soro bovino

FPU – Unidade de Papel de Filtro

UI – Unidade Internacional

FAE – Feruloilesterase

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

TGA – Análise Termogravimétrica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS – Sistema de Energia Dispersiva

*p*NP-G – para-nitrofenilglicosídeo

*p*NP-x – para-nitrofenilxipiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR	25
2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	26
2.2.1. Celulose	27
2.2.2. Hemicelulose	29
2.2.3. Lignina	30
2.2.4. Extrativos	32
2.3. PRÉ-TRATAMENTOS	32
2.3.1. Pré-tratamento quimiotermomecânico.....	35
2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE	38
2.4.1. Fatores que limitam a hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos.....	40
2.4.2. Fatores que promovem a hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos	48
3. OBJETIVO	51
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	52
4.2. TRATAMENTO QUIMIO-MECÂNICO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	54
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	56
4.3.1. Determinação do teor de umidade	56
4.3.2. Remoção de extrativos.....	56
4.3.3. Hidrólise ácida	57
4.3.4. Determinação de grupos ácidos	60
4.3.5. Retenção de água (WRV)	61
4.3.6. Difração de raios-X (DRX).....	62
4.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS).....	63
4.3.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	63

4.3.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA).....	64
4.4. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E PROTEÍNAS.....	64
4.4.1. Celulases Totais	64
4.4.2. Endoglucanase	65
4.4.3. Exoglucanase	66
4.4.4. β -Glicosidase.....	66
4.4.5. Xilanase.....	67
4.4.6. β -Xilosidase	67
4.4.7. Proteínas Totais.....	68
4.5. EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS	68
4.5.1. Caracterização da enzima.....	68
4.6. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i>	74
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS COMERCIAIS.....	75
5.3. Efeito da carga de sulfito e ácido sulfúrico no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e hidrólise enzimática da celulose	76
5.4. Efeito da temperatura no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	81
5.4.1. Caracterização química	81
5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM SULFITO ÁCIDO.....	102
5.5.1. Efeito da temperatura de pré-tratamento na hidrólise enzimática da celulose dos bagaços de cana.....	102
5.5.2.Efeito da carga enzimática na hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana.....	106
5.5.3. Efeito da carga enzimática na hidrólise enzimática da hemicelulose do bagaço de cana.....	109
5.5.4. Ensaios de adsorção enzimática nas fibras dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido em diferentes temperaturas.....	114
6. CONCLUSÕES	117

REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO	137
APÊNDICE B – HIDROLISE ENZIMÁTICA DOS BAGAÇOS	139
APÊNDICE C – MEDIDA DE PROTEÍNA SOLÚVEL.....	144

1. INTRODUÇÃO

A economia mundial ainda é altamente dependente de várias fontes de energia fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural, que vêm sendo empregados na produção de combustíveis, eletricidade e diversos outros bens. O consumo excessivo resultou na geração de altos níveis de poluição, além de exaurir as reservas naturais desses combustíveis fósseis. Neste cenário, as fontes renováveis aparecem como uma alternativa, ou seja, o vento, a água, o sol, a biomassa, dentre outras, podem ser as fontes geradoras de energia.

Nos últimos anos despertou-se um grande interesse mundial no desenvolvimento de tecnologias “limpas” que possibilitem a utilização de produtos com menor impacto ambiental. A química “verde”, como um todo, implica no desenvolvimento de processos e produtos que levem a um ambiente mais limpo, saudável e sustentável. Na busca pela sustentabilidade, várias pesquisas na área de bioenergia foram, e estão sendo, realizadas para garantir a preservação ambiental e proporcionar um melhor padrão de vida à sociedade. Dentre as pesquisas nesta área, as que buscam a aplicação de recursos naturais renováveis na produção de combustíveis vêm crescendo, podendo-se destacar o uso de resíduos agroindustriais.

O bagaço de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucroalcooleira, tem sido apontado como matéria-prima lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, dentro do contexto de biorrefinaria, já que este material apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, transporte e armazenagem e, principalmente, pela quantidade de produtos com alto valor agregado que pode ser gerada a partir de seu processamento.

Muitos grupos de pesquisa, no Brasil, estão investindo na busca de novas variedades de cana-de-açúcar visando o aumento da produção de sacarose e/ou a diminuição da quantidade de lignina presente na parede celular. Essas modificações podem ser alcançadas pela manipulação genética das espécies ‘in vitro’, seja pela clonagem de genes responsáveis pela produção de sacarose, seja pela seleção de genes da síntese de lignina, ou ainda, pela biotecnologia tradicional, onde a natureza se encarregaria do

cruzamento. Com essas modificações, os bagaços dessas variedades se tornariam mais atrativos para a produção de biocombustível, uma vez que poderiam requerer condições mais amenas de pré-tratamento, além de melhores rendimentos em açúcares fermentescíveis, na etapa de hidrólise enzimática.

Para que o bagaço de cana-de-açúcar se torne passível de ser hidrolisado por enzimas, é essencial que haja uma desorganização na matriz lignocelulósica, permitindo um maior acesso das enzimas aos seus componentes polissacarídicos. Assim sendo, os materiais lignocelulósicos precisam ser pré-tratados, por métodos biológicos, mecânicos, químicos ou uma combinação destes, para que, principalmente, a lignina seja removida, aumentando a superfície de contato e a porosidade da parede celular, ou modificada, adquirindo cargas, que a torne mais hidrofílica.

É desejável que a tecnologia empregada no pré-tratamento se adapte a diversas matérias-primas, apresente bons rendimentos quantitativos de açúcares fermentescíveis e que sejam gerados inibidores de fermentação em níveis toleráveis. O pré-tratamento químio-mecânico utilizando sulfito em meio ácido tem sido avaliado para diversos materiais lignocelulósicos e tem-se demonstrado que essa tecnologia gera poucos inibidores de crescimento microbiano no hidrolisado hemicelulósico e que a celulose obtida pode ser totalmente convertida a glicose, pela ação das celulasas (WANG et al., 2009). Esse processo, no entanto, emprega temperaturas elevadas, acima de 180 °C e alta concentração de sulfito (9 %). Com vistas a utilizar o processo sulfito ácido no tratamento de bagaço de cana, neste trabalho estamos propondo avaliar o pré-tratamento em condições mais brandas de temperaturas e concentração de reagentes.

Neste contexto, o pré-tratamento sulfito-ácido foi aplicado a uma variedade comercial de bagaço e a três bagaços híbridos com teor de lignina reduzido. A temperatura de pré-tratamento e a carga enzimática foram as variáveis estudadas. O efeito do pré-tratamento foi avaliado através da caracterização físico-química dos bagaços, do rendimento de hidrólise enzimática dos polissacarídeos e da medida da adsorção das enzimas envolvidas na conversão, aplicando uma mistura de enzimas comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil pelos portugueses no período colonial. Trazida de regiões tropicais da Ásia, especialmente da Índia, se adaptou ao solo e clima propícios do país. É uma planta pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas e classe das monocotiledôneas. O Brasil é seu maior produtor mundial, com previsão de que o total de cana moída na safra 2012/13 seja de 597 milhões de toneladas, um aumento de 6,5 % em relação à safra 2011/12, que foi de 560 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

Na usina, os colmos da cana são lavados e levados a moendas para extração do caldo e separação do bagaço (BNDES, 2008). O caldo da cana, rico em sacarose, é concentrado e utilizado para a produção de açúcar. Como nem toda a sacarose disponível na cana é cristalizada, o caldo excedente, que é rico em glicose e frutose (resultantes da hidrólise da sacarose) pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol, designado de primeira geração, pois o substrato é diretamente metabolizado por leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentro do contexto mundial, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol e os Estados Unidos ocupam a primeira posição nesse mercado, com geração de etanol a partir do milho (RFA, 2011). Algumas estratégias podem ser seguidas para o aumento da produção de etanol no Brasil, como o aumento da produtividade da cana-de-açúcar e o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de converter os polissacarídeos das folhas, da palha e do bagaço em etanol, uma vez que representam dois terços da massa da cana-de-açúcar (SOCCOL et al., 2010).

O melhoramento genético é considerado um dos principais fatores agronômicos que podem contribuir com o aumento da produtividade, permitindo desenvolver variedades que se adaptem melhor às condições adversas de solo e clima, à incidência de pragas e

doenças, assim como aos sistemas de colheita (EMBRAPA, 2011). A transformação genética da cana-de-açúcar é de crucial importância para produzir as bases biotecnológicas necessárias para o etanol celulósico. Os genes identificados poderão levar à produção de variedades com maior produtividade e menos recalcitrantes à degradação da parede celular, gerando novas possibilidades de aproveitamento da cana-de-açúcar para a produção de energia. Além disso, o domínio do processo de transformação genética tem o potencial de acelerar fortemente a capacidade de produção de novas variedades, uma vez que a produção de uma variedade por genética clássica, atualmente, leva cerca de doze anos e por transformação genética, poderia levar apenas seis anos (INCT, 2011).

O melhoramento de plantas tem sido uma das ferramentas mais poderosas utilizadas pelo homem para produzir alimentos. Em relação à cana-de-açúcar, o Brasil tem selecionado variedades desde 1532 e a partir da segunda metade do século XX, um grande número de variedades foi desenvolvido pelos programas de melhoramento brasileiros, promovendo um aumento extraordinário na produção de açúcar e álcool (INCT, 2011).

2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Bagaço é o resíduo lignocelulósico fibroso do colmo de cana-de-açúcar produzido após moagem e extração do caldo (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). A quantidade de bagaço produzida depende do teor de fibra da cana processada. Apresenta, em média, 46 % de fibra e 50 % de umidade, o que resulta em, aproximadamente, 280 quilos de bagaço úmido por tonelada de cana processada (EMBRAPA, 2013).

Pela proporção em que é produzido e devido à sua composição, o bagaço constitui um dos mais importantes subprodutos da indústria sucroalcooleira, apresentando baixo custo e fornecendo produtos finais sustentáveis e de alta qualidade (LOH et al., 2013). Suas principais aplicações são: combustível para caldeira, produção de celulose e etanol e na alimentação de gado confinado (EMBRAPA, 2013).

Aproximadamente 50 % da massa seca do bagaço de cana-de-açúcar é celulose. A outra metade é dividida em hemicelulose e lignina, em proporções semelhantes, podendo conter aproximadamente 2,5 % de cinzas (PANDEY et al., 2000).

2.2.1. Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular, sendo um homopolímero linear de alta massa molar, formado por moléculas de anidroglicose (D-glicose) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ (Figura 1). Em sua estrutura, duas unidades de glicose adjacentes são ligadas pela eliminação de uma molécula de H_2O entre seus grupos hidroxílicos dos carbonos um e quatro, dando origem à molécula de celobiose, a qual é a unidade repetitiva da celulose como se mostra na figura 2.

Figura 1. Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (MARTINS, 2005).

Figura 2. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose formando a celobiose (SOLOMONS, 1996).

A presença dos grupos hidroxila (OH) é responsável pelo comportamento químico e físico da celulose, formando dois tipos de ligações de hidrogênio, em função de seu posicionamento na unidade glicosídica. Há ligações de hidrogênio entre grupos OH da mesma cadeia de celulose, ligações intramoleculares, responsáveis pela sua rigidez. Também acontecem ligações entre grupos OH de cadeias adjacentes de celulose, ligações intermoleculares, responsáveis pela formação das estruturas supramoleculares (D'ALMEIDA, 1981).

A estrutura supramolecular da celulose é representada por áreas altamente ordenadas (cristalina) e menos ordenadas (amorfa), muito influenciadas pelas ligações de hidrogênio presentes em suas estruturas. Além dessas regiões, existe uma porção paracristalina que tem características intermediárias das demais regiões, tanto de mobilidade, quanto de organização.

A diferença entre as ligações de hidrogênio formadas é uma das principais influências no grau de polimerização e promove a geração de diversos alomorfos de celulose, com diferentes estruturas cristalinas, microcristalinas e até mesmo amorfas (LENGOWSKI, 2012). Quatro alomorfos cristalinos foram identificados pelos seus padrões característicos de difração de raios-X (DRX) e espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C em estado sólido (RMN): celulosas I, II, III e IV. A Celulose I é a forma nativa mais abundante encontrada na natureza. Já a celulose II pode ser preparada por mercerização, por um tratamento com solução de hidróxido de sódio. As celulosas III₁ e III₂ podem ser formadas a partir de celulosas I e II, respectivamente, por tratamento com amônia líquida. As celulosas IV₁ e IV₂ podem ser obtidas por aquecimento celulosas III₁ e III₂, respectivamente (PARK et al., 2010).

Nos anos 70, estudos com raios-X apontaram que a celulose I era formada por cadeias paralelas de microfibrilas e a celulose II por cadeias antiparalelas. As cadeias paralelas têm os grupos redutor e não-redutor da cadeia de celulose na mesma posição e as cadeias antiparalelas apresentam estes grupos localizados de forma alternada (LENGOWSKI, 2012). Desde então as estruturas paralela e antiparalela da celulose I e celulose II já foram muito estudadas por diversas técnicas e confirmou-se a veracidade desta teoria (NISHIKAWA, 2000).

As características da celulose nativa (celulose I) estão sendo intensamente estudadas devido ao potencial de utilização deste polímero para a produção de bioenergia (PARK et al., 2010). Por outro lado, Lengowski (2012) cita que a formação de celulose II é interessante na produção de etanol a partir da madeira, já que os açúcares desse tipo de celulose estão mais acessíveis para aumentar a taxa da hidrólise enzimática (digestibilidade) e os rendimentos de açúcares fermentáveis, a partir da celulose ou da hemicelulose.

A figura 3 sumariza as informações descritas por Park et al. (2010).

Figura 3. Transformação da celulose nativa em vários alomorfos (LENGOWSKI, 2012).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura ramificada. São depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, ao oferecerem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (RODRIGUES, 2007). As hemiceluloses de gramíneas, por exemplo, são geralmente caracterizadas pela presença de arabinoglucuronoxilanas (Figura 4). As paredes celulares de gramíneas também contêm grandes quantidades de ácidos hidroxicinâmicos, ferúlico e cumárico (BEUKES et al., 2008; JEFFRIES, 1990; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; SASKA; OZER, 1995). No bagaço de cana-de-açúcar, as hemiceluloses aparecem na proporção de 25 % a 27 % e, quando são hidrolisadas por ácido, podem gerar xilose, arabinose, ácido urônico, ácido acético e furfural. O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (RODRIGUES, 2007).

Figura 4. 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 (PITARELO, 2007).

2.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula altamente complexa e ramificada, gerada pela polimerização desidrogenativa de três alcoóis hidroxicinâmicos: *p*-cumarílico, coniferílico e álcool sinapílico (Figura 5).

Figura 5. Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool *p*-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico.

A lignina é principalmente constituída de unidades de fenilpropano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes β -O-4 e α -O-4 (40–60 %), β -5 (10 %), β -1 (5–10 %), 5-5 (10 %), β - β (5 %) e 4-O-5 (5 %) (Figura 6) (ADLER, 1977). Sua composição varia entre os diversos grupos de plantas. Em gimnospermas predomina o tipo G (guaiacila), em angiospermas, G-S (guaiacila-siringila)

e em gramíneas, destaca-se a lignina tipo G-S-H (guaiacila-siringila-*p*-hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006). Em gramíneas, a lignina incorpora níveis similares de G e S e possuem mais resíduos H, que em dicotiledôneas (BAUCHER et al., 2003).

Figura 6. Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina (lignina tipo G) (CARVALHO et al., 2009).

A função da lignina é dar à planta apoio estrutural, impermeabilidade, resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo. É uma macromolécula amorfa insolúvel em água e opticamente inativa, o que faz com que sua degradação seja difícil (FENGEL; WEGENER, 1989).

No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos e na indústria de papel e celulose, a lignina é um componente indesejável e, geralmente, é necessário removê-la por meio de pré-tratamentos. Além de ser a barreira física para as enzimas, as mesmas podem se adsorver irreversivelmente à lignina, resultando em menor hidrólise enzimática e maior dificuldade de recuperação da enzima (LU et al., 2002).

2.2.4. Extrativos

Os extrativos são compostos orgânicos formados por resinas, ácidos graxos, ceras, terpenos e compostos fenólicos que podem ser extraídos com água ou solventes orgânicos neutros (FUENTES, 2009). Existem outros materiais que também não são comumente extraíveis com os solventes mencionados e também não se encontram na parede celular, tais como os compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas (RAMOS, 2003).

2.3. PRÉ-TRATAMENTOS

A tarefa de hidrolisar a fração polissacarídica dos resíduos lignocelulósicos é ainda tecnicamente problemática. A anatomia, organização da parede celular e as características estruturais são fatores que dificultam o acesso das enzimas. O pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção de açúcares potencialmente fermentescíveis na etapa de hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é modificar a estrutura dos constituintes da parede celular ou removê-los e, ainda, romper a estrutura cristalina de celulose (MOSIER et al., 2005).

Os estudos dos pré-tratamentos estão focados em identificar, avaliar, desenvolver e demonstrar abordagens promissoras apoiadas principalmente na hidrólise enzimática da biomassa com menores dosagens de enzimas e menores tempos de bioconversão (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Além de ser considerada uma etapa crucial na conversão

biológica ao etanol, o pré-tratamento da biomassa representa cerca de 20 % do custo do processo (ALVIRA et al., 2010).

A escolha dos pré-tratamentos tem um grande impacto em todas as etapas subsequentes de produção de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos, por isso um pré-tratamento ideal deve gerar altos rendimentos para diferentes matérias primas e causar baixa degradação de açúcares. A celulose recuperada deve ser facilmente hidrolisada, com rendimentos superiores a 90 %, de preferência, em menos de três dias, utilizando uma carga enzimática inferior a 10 FPU/g de celulose (YANG; WYMAN, 2008).

As características dos substratos para produção eficiente de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica incluem a acessibilidade da enzima, grau de cristalinidade e polimerização da celulose, assim como a distribuição de lignina (NAKAGAME et al., 2011a). A lignina limita o acesso das enzimas às cadeias de celulose por ser um invólucro de proteção, por isso causa um impedimento estérico às celulasas. Além disso, as celulasas podem ligar-se improdutivamente à lignina (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Para aumentar a disponibilidade da celulose no substrato, os componentes não celulósicos, principalmente lignina, precisam ser diminuídos pelos pré-tratamentos (LÓPEZ-ARENAS et al., 2010).

Vários pré-tratamentos têm se mostrado mais adequados para certas matérias-primas. Por exemplo, os pré-tratamentos alcalinos, explosão de fibra com amônia (AFEX) e percolação de amônia com reciclagem (ARP) podem efetivamente reduzir o teor de lignina dos resíduos agrícolas, mas são menos satisfatórios para madeiras resinosas, pois o teor de lignina é maior neste material (CHANDRA et al., 2007).

Os pré-tratamentos alcalinos são capazes de remover a lignina e a hemicelulose da parede celular. 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 também promove a clivagem de ligações éster de ácidos hidroxicinâmicos ligados à lignina ou hemicelulose (CAO et al., 2012; MENDES et al., 2011; MASARIN et al., 2011).

Processos de pré-tratamento ácidos foram os que demonstraram maior eficácia em uma ampla gama de substratos lignocelulósicos, mas são relativamente caros (MOSIER et al., 2005). Normalmente pré-tratamentos com ácido diluído, explosão a vapor catalisada por ácido e auto-hidrólise removem a maior parte da hemicelulose e uma pequena porção de lignina, porém podem gerar compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que podem prejudicar a hidrólise enzimática ou a fermentação para a obtenção de etanol (PERSSON et al., 2009).

Um parâmetro operacional importante para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica refere-se à impregnação adequada com o reagente químico. A elevada capacidade de absorção de líquido e a alta umidade do bagaço proveniente da moenda (cerca de 50 %) são características da biomassa que facilitam a impregnação com soluções ácidas. O tratamento com soluções ácidas, visando elevada eficiência, necessita de quantidades adequadas de água, na qual o ácido se dissocia formando o íon hidroxônio (H_3O^+) e também promove o transporte desse íon para o interior da biomassa (PIETROBON, 2008).

Entre os diversos métodos de pré-tratamento, é necessário estar atento ao grau de severidade do procedimento. Os mesmos devem ser conduzidos sob condições moderadas visando promover elevada reatividade das fibras celulósicas, elevada recuperação de hemiceluloses, mínima perda de glicose no hidrolisado e mínima geração de compostos inibidores às etapas posteriores de hidrólise e fermentação (PIETROBON, 2008).

O pré-tratamento com ácido diluído (AD) é muito favorável para aplicações industriais e têm sido estudado para um amplo leque de biomassa lignocelulósica. Ele pode ser realizado em altas temperaturas (180 – 200 °C) durante um curto período de tempo, ou em temperaturas mais baixas (120 °C) para tempos maiores de retenção (ALVIRA et al., 2010).

AD melhora a digestibilidade dos lignocelulósicos, principalmente pela dissolução da hemicelulose e parcial hidrólise da celulose. O baixo valor de pH do processo provoca problemas graves de corrosão de equipamentos. Além disso, altas temperaturas e baixos valores de pH levam à formação de uma quantidade significativa de inibidores, compostos de degradação de açúcares – furfural e hidroximetilfurfural – e degradação de compostos aromáticos da lignina, que afetam o processo fermentativo. O

pré-tratamento com ácido diluído provoca a condensação da lignina, que diminui seu valor comercial para o desenvolvimento de coprodutos (SHUAI et al., 2010). De qualquer forma, este pré-tratamento gera menos produtos de degradação que pré-tratamentos com ácido concentrado (ALVIRA et al., 2010).

2.3.1. Pré-tratamento quimiotermomecânico

Os processos quimiotermomecânicos resultam da combinação de tratamentos químicos, normalmente com sulfito de sódio a altas temperaturas e tratamentos mecânicos, responsáveis pelo desfibramento. Durante o cozimento, a lignina é parcialmente sulfonada havendo a introdução do grupamento sulfônico SO_3^{2-} , transformando essa lignina, que é de natureza hidrofóbica, em uma substância mais hidrofílica, tornando-a mais solúvel em água. Essas reações enfraquecem a lamela média da parede celular, ajudando a separação das fibras. As polpas obtidas deste tratamento contêm de 10 a 20 % de lignina solúvel em ácido, dependendo da temperatura, tempo e concentração de reagentes que são empregados no processo. Esta lignina está localizada, em grande parte, na superfície das fibras (JU; ENGELHARD; ZHANG, 2013).

O conteúdo de espécies sulfúricas no processo sulfito está representado pelo dióxido de enxofre (SO_2), íons bissulfito (HSO_3^-) e íons sulfito (SO_3^{2-}), em proporções que dependem do pH do licor de cozimento (ALÉN et al., 2000). Pelo equilíbrio químico, em condições ácidas ($\text{pH} \leq 4$), observa-se maior concentração de HSO_3^- , enquanto que em pH neutro e alcalino ($\text{pH} > 4$), há maior predominância de íons SO_3^{2-} (GELLERSTEDT et al., 2009).

Mendes et al. (2011) estudaram a deslignificação de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pelo processo sulfito alcalino e determinaram a influência do tempo nas propriedades de retenção de água, sulfonação e digestibilidade enzimática. Foram produzidas polpas variando o tempo de 30 a 120 min. A digestibilidade da polpa aumentou com tempos de cozimento mais longos. Mesmo polpas pouco deslignificadas mostraram boa capacidade de retenção de água (MENDES, 2010).

Laurito-Friend (2013) obteve polpas de bagaço de cana-de-açúcar usando diferentes concentrações de reagentes químicos (sulfito e NaOH). O objetivo deste estudo era comparar a digestibilidade de bagaços com diferentes teores de lignina. Os rendimentos da polpação variaram de 60 % e 78 %, para diferentes amostras de bagaço. Os valores mais baixos de rendimento foram apresentados pelos híbridos 89 e 140 e o maior rendimento de hidrólise enzimática da celulose, pelo híbrido 146. A autora também observou que as conversões enzimáticas da celulose e hemicelulose tinham uma tendência a melhorar com o aumento da carga de produtos químicos. Dos resultados obtidos, concluiu-se que as amostras de bagaço respondem diferentemente ao processo sulfito alcalino.

2.3.1.1 Pré-tratamento sulfito ácido

O processo sulfito ácido tem sido descrito como um dos mais eficazes para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para a obtenção de etanol. A tecnologia foi recentemente patenteada e denominada SPORL (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose). O tratamento utiliza bissulfito de sódio (de cálcio, de magnésio ou outros) variando a temperatura (160 – 190 °C), o pH (2 – 5) e o tempo (10 – 30 min) (ZHU et al., 2009; WANG et al., 2009), com subsequente refinamento dos materiais, para gerar substratos fibrosos de tamanho reduzido.

O processo SPORL foi testado para diversos materiais lignocelulósicos (madeiras de folhosas, coníferas e diversas gramíneas) (WANG et al., 2009). A proporção de licor no pré-tratamento é baixo, o que garante uma alta concentração da fração hemicelulósica e um menor consumo de energia. A lignina dissolvida (lignossulfonato) pode ser recuperada e comercializada diretamente como um coproduto. Os reagentes utilizados podem ser fácil e eficientemente recuperados por técnicas de baixo custo, comuns nas indústrias químicas. A lignina remanescente do processo pode ainda ser queimada, para a geração de energia (ZHU; PAN, 2010).

O desenvolvimento do processo SPORL baseia-se em conceitos fundamentais da polpação sulfito. Há remoção e degradação de uma quantidade considerável de hemicelulose, fato evidenciado pela predominância de xilose no licor da polpação. Os graus de polimerização da xilana e da celulose são reduzidos (ZHU et al., 2009).

A técnica SPORL pode ser integrada ao pré-tratamento com explosão a vapor, usando sulfito e ácido como catalisador. A redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica é alcançada pelos efeitos combinados de dissolução da hemicelulose, despolimerização da celulose, deslignificação parcial, sulfonação parcial da lignina e o aumento da superfície da fibra, através do refinador (SHUAI et al., 2010). A sulfonação da lignina é capaz de aumentar a hidrofiliabilidade dos substratos pré-tratados com SPORL e reduzir a adsorção improdutiva das enzimas sobre a lignina. O processo SPORL produz menores quantidades de inibidores de fermentação, como o ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural que o processo com ácido diluído, devido aos valores mais altos de pH (ZHU; PAN, 2010).

O grau de dissolução da hemicelulose, a degradação da celulose e a sulfonação e a condensação da lignina aumentam com o aumento da temperatura e do tempo de reação e com a diminuição do pH do processo. Zhu et al. (2009) avaliaram a variação na carga de bissulfito durante o pré-tratamento SPORL de 0 a 12 % por massa seca de madeira. A 180 °C e pH 2,4, a carga ideal de bissulfito foi cerca de 9 %. Nestas condições, a conversão enzimática da celulose atingiu 90 % em 48 h de hidrólise. Por outro lado, quando a carga de bissulfito foi reduzida para zero (somente adição de ácido sulfúrico), a conversão enzimática da celulose foi mais baixa, alcançou menos de 40 %, indicando que a digestibilidade enzimática da madeira pré-tratada com SPORL é muito maior que a de um substrato pré-tratado com ácido diluído. A deslignificação parcial e a sulfonação da lignina podem contribuir significativamente para o aumento da digestibilidade da madeira, no entanto, aumentando-se a carga de bissulfito para mais de 9 %, a conversão enzimática da celulose diminuiu. Isso ocorre porque o aumento na carga de bissulfito aumenta o pH do licor do pré-tratamento, diminuindo a dissolução da hemicelulose, a despolimerização da celulose e, até mesmo, a taxa de sulfonação da lignina.

O controle da variável temperatura é muito importante a fim de se evitar a condensação da lignina durante o pré-tratamento. Em pH 1,5 frequentemente se emprega temperaturas em torno de 130 °C, por várias horas. Em pH 3 – 5, a temperatura máxima deve ser controlada entre 160 – 166 °C e o tempo de pré-tratamento pode ser mais curto (WANG et al., 2009).

2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE

A degradação enzimática da celulose ocorre pela ação coordenada de três classes principais de enzimas que atuam sinergicamente (Figura 7) (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Estas classes de enzimas hidrolíticas compreendem as endo-1,4-β-glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4-β-glucanases ou celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4-β-glicosidases (EC 3.2.1.21) (BHAT; BHAT, 1997; SINSABAUGH; LIPTAK, 1997).

Figura 7. Modo de ação de celulases sobre a celulose (MARTINS, 2005).

As celulasas possuem um ou mais domínios de ligação à celulose (CBD) que se associam às regiões hidrofóbicas do substrato, uma ou mais alças e o domínio catalítico (GAO et al., 2011). As endoglucanases hidrolisam a celulose amorfa aleatoriamente, criando novas extremidades de cadeia (SÁNCHEZ, 2009). O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave (Figura 8), possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo seu grau de polimerização (MARTINS, 2005).

As celobioidrolases principais são a CBH I e CBH II, que hidrolisam a cadeia de celulose a partir das extremidades redutora e não-redutora, respectivamente. As exoglucanases têm seu sítio ativo em forma de túnel (Figura 8), pelo qual a cadeia de celulose passa, sofrendo hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando celobiose (HUI; WHITE; THIBAUT, 2002). O domínio catalítico das exoglucanases (celobioidrolases) desliza sobre a superfície da celulose, até encontrar uma extremidade livre (BECKHAM et al., 2010).

As β -glicosidases hidrolisam a celobiose gerada em glicose, completando a hidrólise da celulose. As β -glicosidases são muito importantes para a eficiência da hidrólise da celulose, uma vez que removem a celobiose do meio reacional, dímero que é um potente inibidor competitivo das celobioidrolases (MEDVE, 1997; MUÑOZ et al., 2001).

Figura 8. Estruturas típicas das celulasas. À esquerda, a representação do sítio ativo em forma de chave de uma endoglucanase da família 6. À direita, o sítio ativo de uma exocelulase em forma de túnel. Enzyme...¹

¹ Figura retirada de <www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/enzymes> Acesso em: 24 outubro 2013.

A hidrólise das hemiceluloses ocorre pela ação de enzimas que clivam no interior da cadeia principal e aquelas que atuam nas extremidades da cadeia e nas ramificações (Figura 9). Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para a sua modificação e degradação. Um sistema incluindo xilanases, mananases, β -xilosidades, α -glucuronidasas e α -arabinofuranosidas torna-se necessário para a hidrólise completa desses polissacarídeos (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997; BIELY, 1985).

Figura 9. Estrutura representativa da ação de hemicelulases na cadeia principal e grupos pendentes da hemicelulose, Xil: Xilopirranose; Arab: L-arabinofuranose; MeGIA: ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac: grupo acetil.

2.4.1. Fatores que limitam a hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos

A hidrólise enzimática da celulose representa uma alternativa importante para a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais, por se tratar de um processo limpo e específico. Ainda assim, embora alvos de várias pesquisas, as características que atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose ainda não estão totalmente compreendidas. Entre as mais importantes estão o grau de cristalinidade e o grau de

polimerização da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007; RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009; ZHAO; LU; WANG, 2009). Entretanto, não se pode esquecer que o conteúdo e a distribuição da lignina e hemicelulose diminuem a acessibilidade das celulases, uma vez que estes componentes encobrem as microfibrilas de celulose, impedindo o ataque enzimático (HAN; CHEN, 2007; KUO; LEE, 2009; KUMAR et al., 2009; PALONEN et al., 2004; RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009; WANG et al., 2006).

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, como o tipo de pré-tratamento, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, concentração do substrato, adsorção das enzimas, tempo de hidrólise, pH do meio e taxa de agitação. Assim, é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir uma sacarificação satisfatória (RUEDA, 2010).

2.4.1.1. Cristalinidade

A estrutura cristalina da celulose foi estabelecida pela primeira vez por Carl von Nägeli, em 1858. Um parâmetro denominado índice de cristalinidade (IC) tem sido usado para descrever a quantidade relativa de material cristalino na celulose.

É sabido que a estrutura cristalina da celulose é uma mistura de duas formas cristalinas distintas: celulose I_{α} (triclínica) e I_{β} (monoclínica). As quantidades relativas de celulose I_{α} e I_{β} variam com a fonte de celulose e a forma I_{β} é dominante em plantas superiores (PARK et al., 2010). De acordo com o tratamento a que a celulose nativa for submetida, químico e/ou térmico, há diferentes alterações nas dimensões da cela unitária e, conseqüentemente, na sua estrutura cristalina, o que resulta em diferentes polimorfos da celulose.

A estrutura cristalina da celulose tem sido caracterizada por análise de difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de alta resolução para sólidos e análise de difração de nêutrons, espectroscopia de Raman e por métodos baseados na absorção de luz infravermelha polarizada (FTIR).

Diferentes métodos têm sido utilizados para o cálculo do IC a partir dos dados espectrográficos, particularmente para DRX. O método desenvolvido por Segal et al. (1959) tem sido largamente utilizado para fibras naturais. O método baseia-se nas medidas de difração de raios-X de intensidade do mínimo de difração, relacionada à parte amorfa (I_1) ($2\theta = 18,8^\circ$) e a intensidade do máximo de difração, relacionada à parte cristalina (I_2) ($2\theta = 22,4^\circ$). O índice de cristalinidade da celulose é calculado através de equação 1 (MARTIN et al., 2009):

$$IC = 1 - \frac{I_1}{I_2} \quad (1)$$

Este método segundo Park et al. (2010) é útil para comparar diferenças relativas entre amostras, contudo não é apropriado para estimar a quantidade de material cristalino e amorfo em uma amostra de celulose considerando que há no mínimo quatro picos diferentes relativos à região cristalina, mas apenas o pico mais alto é usado no cálculo. Além disso, o método negligencia a largura do pico, que também pode ser afetado pela cristalinidade.

Para obter um método mais quantitativo, todo o espectro XRD precisa ser utilizado para minimizar perdas de informação. O espectro normalizado de uma amostra é expresso como uma combinação linear do espectro normalizado dos componentes do material lignocelulósico. A celulose cristalina é padronizada com Avicel, a celulose amorfa é padronizada com celulose pré-tratada com ácido fosfórico-PASC, hemiceluloses comerciais e lignina são usadas como padrões (KANG et al., 2013).

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) associada à calibração multivariada pode ser usada para prever a cristalinidade da celulose. As principais regiões do espectro no infravermelho que correspondem à região cristalina da celulose são 2900 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} . Quanto maior a cristalinidade, maior a intensidade da banda 2900 cm^{-1} e menor a 1430 cm^{-1} . A absorção da banda 900 cm^{-1} é atribuída a C–O–C, alongamento da ligação glicosídica $\beta(1-4)$, concebida como banda amorfa (LENGOWSKI, 2012). A determinação do IC usando FTIR fornece somente valores relativos, porque o espectro sempre contém contribuições das regiões cristalinas e amorfas.

A celulose I, celulose nativa, é parcialmente cristalina e o grau de cristalinidade medido por difração de raios-X varia de 50 a 70 %. A cada 600 Å de celulose cristalina, a estrutura apresenta regiões amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

O IC de celulose vem sendo usado por mais de cinco décadas para interpretar as alterações na estrutura da celulose depois de tratamentos físico-químicos e biológicos. No entanto, verificou-se que a IC varia significativamente, dependendo da escolha do método de medição. Pesquisadores compararam quatro técnicas de análise diferentes envolvendo DRX e propuseram que o IC de Avicel celulose variou significativamente de 39 % a 67 %, dependendo da técnica utilizada (PARK et al., 2010).

A reatividade da celulose é governada pela sua estrutura química e física. Em qualquer reação química, a acessibilidade das moléculas de celulose para o reagente é extremamente importante para que ocorra a modificação da estrutura. A maioria dos reagentes, enzimas, água e demais substâncias reativas penetra inicialmente nas regiões amorfas e na superfície das regiões cristalinas, deixando as regiões intracristalinas intactas. O grau de cristalinidade e a orientação dos domínios cristalino e amorfo nas fibras de celulose, tanto sintéticas ou naturais, afetam as propriedades mecânicas (LENGOWSKI, 2012). O alto grau de cristalinidade da celulose confere proteção à célula e é de difícil dissolução. Isto não acontece com a celulose amorfa, que é mais reativa (RODRIGUES, 2007).

Durante o pré-tratamento hidrotérmico ou com ácido diluído de materiais lignocelulósicos, ocorre hidrólise da celulose amorfa e subsequente solubilização de glicose, causando um aumento no índice de cristalinidade. Tem sido proposto que a celulose Ia é primariamente convertida em celulose para-cristalina, seguida da conversão à celulose Ib (PU et al., 2013). A severidade do pré-tratamento tem grande influência na degradação de celulose amorfa e cristalina. Yu e Wu (2010) observaram que a temperatura mínima necessária para romper as ligações glicosídicas da porção amorfa da celulose é de 150 °C, enquanto, para a porção cristalina, a temperatura tem que ser de, no mínimo, 180 °C.

É também consenso geral que a celulose amorfa apresenta menor resistência à despolimerização enzimática, que a celulose cristalina. Entretanto, a interpretação de dados publicados na literatura relativos à cristalinidade não fornece uma clara indicação da

digestibilidade da biomassa. O que ocorre é que a proporção de lignina e hemicelulose, a porosidade e o tamanho de partícula influenciam na medida do índice de cristalinidade de amostras tão complexas, como os materiais lignocelulósicos. Consequentemente, o índice de cristalinidade não pode ser considerado isoladamente de outros parâmetros, para se prever a hidrolisabilidade da biomassa lignocelulósica. Uma comparação de pré-tratamentos com ácido diluído, hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino geralmente resultam em um aumento relativo no índice de cristalinidade se comparados à amostra controle ou à pré-tratada com amônia, tanto por processo de percolação (ARP), quanto explosão (AFEX) (CHUNDAWAT et al., 2011).

2.4.1.2. Adsorção

A sacarificação enzimática de celulose consiste em três etapas: adsorção das celulasas sobre a superfície da celulose, a hidrólise e a dessorção. Na fase inicial de hidrólise, é necessário que as celulasas adsorvam na superfície do material, o que resulta na baixa concentração de enzimas livres na fase líquida. Geralmente, quando a celulose já foi totalmente hidrolisada, as enzimas retornam ao meio (BECKHAM et al., 2011).

A adsorção de enzimas sobre o substrato, durante a hidrólise, é um fenômeno desejado, uma vez que a conversão é extremamente dependente da ligação produtiva da enzima ao substrato, principalmente quando estas possuem o domínio de ligação a carboidratos (CBD) (PALONEN et al., 2004). A ligação das enzimas hidrolíticas ao substrato envolve a fixação de aminoácidos aromáticos, principalmente os resíduos de tirosina, na face dos anéis dos açúcares. Há também ligações de hidrogênio entre resíduos de glutamina e as hidroxilas da celulose (LINDER et al., 1995).

T. reesei Cel7A com CBD se liga mais rapidamente a um filme, preparado com deposição de lignina, do que na ausência de CBD (RAHIKAINEN et al., 2013). O CBD possui três tirosinas alinhadas (Y5, Y31 e Y32) as quais, como dito anteriormente, são importantes para as interações enzima-substrato. Todas essas interações, no entanto, não são específicas e, com isso, as enzimas podem ligar-se em outras superfícies aromáticas. No caso de substratos lignocelulósicos, as enzimas podem ligar à lignina, reduzindo a

quantidade de enzimas disponíveis para ligação à celulose. Este efeito é chamado “ligação improdutivo” e tem sido observado para várias biomassas (CHERNOGLAZOV et al., 1988; PALONEN et al., 2004; BERLIN et al., 2005a; NAKAGAME et al., 2010; RAHIKAINEN et al., 2011).

As enzimas também podem perder sua eficiência por ficarem bloqueadas nas extremidades da cadeia da celulose, diminuindo a taxa de hidrólise dos polissacarídeos (VÁRNAI et al., 2011). A intensidade de adsorção de uma enzima em um substrato depende da temperatura e da natureza das substâncias presentes no meio. Experimentalmente, as medidas são feitas em termos de quantidade de substância adsorvida por grama do sólido, com a finalidade de se obter as chamadas isotermas de adsorção. As enzimas são incubadas com concentrações variáveis do substrato e depois de um tempo são determinadas as atividades enzimáticas ou massa de proteína (mg enzima/ml) no sobrenadante (P) e a quantidade de enzima adsorvida (mg enzima/mg de sólido) (P_{ads}). A concentração de enzimas adsorvidas é dada pela equação:

$$P_{ads} = \frac{K_p P_{ads,m}}{1 + K_p P} P \quad (2)$$

Linearizando, vem:

$$\frac{1}{P_{ads}} = \frac{1}{K_p P_{ads,m} P} + \frac{1}{P_{ads,m}} \quad (3)$$

ou

$$\frac{P}{P_{ads}} = \frac{1}{K_p P_{ads,m}} + \frac{P}{P_{ads,m}} \quad (4)$$

Em que $P_{ads,m}$ é a quantidade máxima de enzima adsorvida e K_p é a constante de equilíbrio de adsorção (ml/mg de enzima). O gráfico de P_{ads} versus P apresenta uma cinética de

saturação e que K_p e $P_{ads,m}$ podem ser determinados graficamente. A força de adsorção da enzima é representado por $K_p \cdot P_{ads,m}$ (RYU; KIM, 1998).

A adsorção de enzimas comerciais e enzimas purificadas em substratos lignocelulósicos têm sido estudadas em função de vários parâmetros físicos, tais como tempo, temperatura, pH e força iônica. A maioria dos estudos concorda que o equilíbrio de adsorção já ocorre nos primeiros 10 – 20 min de incubação em pH 4,8 – 5,6, independentemente da temperatura (4 °C ou 40 – 50 °C), da dosagem da enzima, da pureza das preparações comerciais ou do teor de lignina do substrato. O aumento da temperatura de 4 – 5 °C para 40 – 50 °C pode resultar em um aumento da adsorção, tanto sobre a celulose, quanto sobre a lignina. Ao aumentar ainda mais a temperatura, a adsorção improdutiva pode aumentar devido à desnaturação pelo calor (VÁRNAI et al., 2011).

Pré-tratamentos que aumentam a hidrofiliabilidade da lignina, como exemplo o processo sulfito, que gera grupos ácidos, são muito efetivos em reduzir a ligação improdutiva à lignina (NAKAGAME et al., 2011a; LOU et al., 2013). Como o ponto isoelétrico de celulasas varia de 3,6 a 8,5, algumas delas ficam carregadas negativamente no pH 4,8, normalmente usado nos ensaios de hidrólise. As enzimas, então, sofrem uma repulsão eletrostática com a superfície da lignina também carregada negativamente. O aumento do pH leva à diminuição da adsorção devido a alterações na distribuição da carga do enzima. A alteração na força iônica não parece afetar significativamente a adsorção global de celulasas comerciais sobre a lignina residual (LOU et al., 2013; NAKAGAME et al., 2011b). Por isso alguns autores sugerem o uso de valores mais altos de pH para a hidrólise enzimática. Além disso, lignina de diferentes biomassas tem diferentes propriedades de interação com a enzima. Nakagame et al. (2010) mostraram que a ligninas de madeiras se ligam mais a celulasas, do que as de resíduos agrícolas.

Durante o pré-tratamento, a lignina pode migrar para a superfície da fibra e ser redistribuída no substrato lignocelulósico. As características topográficas dos materiais têm um efeito dominante sobre a taxa de hidrólise (JU; ENGELHARD; ZHANG, 2013). Dois dos mecanismos prováveis pelos quais a presença de lignina diminui o rendimento da hidrólise da celulose são o impedimento estérico (ZHU et al., 2009; NAKAGAME et al., 2011a) e a adsorção irreversível de celulasas (PALONEN et al., 2004). As celulasas podem adsorver na superfície da lignina por interações hidrofóbicas, ligações iônicas e pontes de hidrogênio (NAKAGAME et al., 2011a).

A adsorção improdutiva é considerada parcialmente irreversível sendo que, somente 50 % da enzima adicionada podem ser recuperadas, depois da hidrólise completa da fração celulósica (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007). A presença de lignina reduz significativamente o desempenho da hidrólise enzimática (JØRGENSEN; OLSSON, 2006; MUSSATTO et al., 2008) e sua retirada tende a favorecer a ação das enzimas hidrolíticas. Siqueira (2011) determinou que a conversão enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em 72 h, com a preparação comercial Celluclast, era de aproximadamente 30 %, porém com a retirada de 59 % de lignina, a conversão atinge 70 %, no mesmo período.

Estudos conduzidos com enzimas comerciais brutas (Spezyme CP – uma mistura de enzimas de *Trichoderma reesei*) mostraram que 90 % das enzimas estavam no sobrenadante de hidrólise de Avicel, após 48 h de reação e, quando uma lignina isolada foi adicionada na mistura, o valor caiu para 70 %, comprovando a interação irreversível entre a enzima e a lignina (NAKAGAME et al., 2010).

A quantidade de proteínas ligadas à lignina pode variar dependendo da biomassa, pré-tratamento e também do tipo de lignina. Comparando as principais enzimas envolvidas na quebra da celulose, a celobioidrolase Cel7A de *T. reesei* se liga mais fortemente à lignina do que a endoglucanase Cel5A. A afinidade de Cel7A à lignina foi três vezes maior que Cel5B, independente do tipo de lignina avaliada, mas a lignina extraída por processo alcalino apresentou propriedades de adsorção mais forte que a extraída por método enzimático (PALONEN et al., 2004).

Adsorção é um fenômeno dependente da concentração, ou seja, a superfície disponível para hidrólise torna-se saturada com o aumento da concentração de proteínas. Por isso, a adsorção improdutiva pode ser minimizada se for empregada uma carga enzimática elevada (NAKAGAME et al., 2010; KUMAR et al., 2012).

Outra forma de evitar a adsorção improdutiva é tornar a celulose mais acessível, pois as enzimas se ligam mais rapidamente à celulose do que à lignina. Se a superfície do material está disponível para as celulasas se ligarem, as enzimas irão se adsorver à celulose, apesar da presença da lignina, especialmente em altas concentrações de proteína (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007; KUMAR et al., 2012).

Como a adsorção não é uma ligação específica, a adição de outras proteínas, antes da celulase, pode reduzir a quantidade de celulases que poderiam se ligar à lignina. Yang e Wyman (2006) avaliaram o uso de soroalbumina bovina (BSA) antes da adição de celulases em substrato pré-tratado com ácido diluído. Os autores acompanharam a atividade de celulases no sobrenadante durante o curso da hidrólise. Após 72 h, a atividade de celulase no sobrenadante era de 20 % do inicial na ausência de BSA. Contudo, a adição de BSA, 1,5 h depois que a hidrólise já havia sido iniciada, mostrou um resultado diferente, no qual, 50 % da atividade inicial permaneceram no sobrenadante, após 72 h de reação.

Outra forma de diminuir a adsorção improdutiva pode ser pela adição de surfactantes ao meio de reação. É provável que os surfactantes ajudem na dessorção da celulase, reduzindo a quantidade de lignina ligada às enzimas. Eriksson, Börjesson e Tjerneld (2002) mediram a adsorção de Cel7A em madeira de *spruce* pré-tratada com vapor, na presença e ausência de Tween 20. Na presença do surfactante, 60 % da Cel7A haviam sido adsorvidas, e na ausência deste, o valor aumentou para 80 %. Para confirmar se o efeito foi pela adsorção improdutiva, os autores deslignificaram o material e repetiram o ensaio de adsorção. Foi relatado que neste ensaio não houve diferenças entre os valores de adsorção, com ou sem surfactante, sugerindo indiretamente que o surfactante possa diminuir a ligação improdutiva da enzima à lignina.

2.4.2. Fatores que promovem a hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos

Muitos estudos vêm sendo realizados na procura por enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, pela combinação de enzimas para obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes (IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004; JØRGENSEN et al., 2005; KANG et al., 2004).

Zhou et al. (2009) determinaram que a relação ideal do complexo multi-enzimático é de 19,8 % de Cel7A, 37,5 % de Cel6A e 4,7 % de Cel6B (celobioidrolases), 17,7 % de Cel7B, 15,2 % de Cel12A e 2,3 % de Cel61A (endoglucanases) e 2,8 % de β -glicosidase, enzimas purificadas do extrato enzimático produzido pela cepa de

Trichoderma viride T 100-14. A mistura otimizada pôde melhorar a eficiência hidrolítica de glicose em 2,1 vezes em relação à preparação bruta. O aumento da dosagem de celulases no processo pode elevar a produtividade da hidrólise enzimática. A dosagem de 10 FPU de celulase/g celulose é frequentemente usada e fornece um perfil de hidrólise com altos níveis de rendimento de glicose em um tempo razoável, de 48 a 72 h de hidrólise. As cargas de celulase podem variar de 7 – 33 FPU/g de celulose na hidrólise, dependendo do tipo e da concentração dos substratos (HAN; CHEN, 2007).

Um fator importante que se deve considerar é a concentração de sólidos na etapa inicial de hidrólise. A hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos é caracterizada pela baixa quantidade de água livre no sistema e maior concentração de produtos. Entretanto, também há desvantagens para o aumento da concentração de substrato. As concentrações de celobiose, glicose e inibidores aumentam, fazendo com que as enzimas sejam inibidas. Além disso, altas concentrações de substrato, sem um processo de agitação eficiente, causam queda nos valores de rendimento da conversão (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009).

Jørgensen et al. (2007) trabalharam com diferentes concentrações de sólidos (10 – 40 %) e constataram que o percentual teórico da conversão enzimática diminuiu linearmente com o aumento da concentração de sólidos (de 80 % para 20 %), quando se utilizou uma carga constante de enzima em relação ao substrato (83 FPU/g de substrato, da mistura das celulases comerciais Celluclast/Novozym). O sistema de batelada alimentado tem sido utilizado para hidrolisar materiais com concentrações de sólidos de até 17 % e altas doses de celulases de 18 a 25 FPU/g de substrato. Durante a fase inicial da hidrólise, o material é liquefeito e a viscosidade cai significativamente. Essa alteração na viscosidade é provavelmente devido ao efeito combinado da separação da parede celular, redução gradual da matriz e do comprimento médio da cadeia da celulose e da hemicelulose por enzimas (JØRGENSEN et al., 2007).

Por outro lado, há alguns trabalhos mostrando que a ação conjunta de celulases e hemicelulases pode resultar em uma maior produção de glicose, quando comparada às celulases sozinhas, em função da retirada da hemicelulose que recobre as fibrilas de celulose melhorando o acesso das celulases (BERLIN et al., 2005b). Tabka et al. (2006) estudaram a otimização do tratamento enzimático da palha de trigo e observaram que a utilização de enzimas acessórias, como xilanases e feruloilesterases (FAE), aumentaram a

concentração de glicose. Quando se utilizou 10 U/g de celulase de *Trichoderma reesei* CL 847 a conversão de celulose foi 1,4 %, mas a adição de 3 UI/g de xilanase de *Trichoderma reesei* CL 847 e 30 UI/g de FAE de *Aspergillus niger* BRFM 451 aumentou a conversão de celulose para 49 %.

Zhang et al. (2009) investigaram a adição das enzimas β -glicosidase e xilanase à celulase comercial (Spezyme CP) para aumentar a conversão da celulose do sabugo de milho pré-tratado com amônia. O rendimento inicial de glicose com a celulase comercial (9,1 mg de proteína/g de glucana) foi de 57,1 %. Com a suplementação da celulase comercial com β -glicosidase (1,45 mg de proteína/g de glucana) e xilanase (1,35 mg de proteína/g de glucana), o rendimento de glicose passou para 88 %.

3. OBJETIVO

Avaliar condições de pré-tratamento sulfito ácido em amostras de bagaço de cana-de-açúcar, com diferentes teores de lignina e verificar, se as mudanças ocorridas nas fibras, após o pré-tratamento, favorecem a hidrólise enzimática da celulose remanescente nos substratos gerados.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito da carga de reagentes e da temperatura do pré-tratamento na remoção de hemicelulose e lignina do bagaço de cana-de-açúcar;
- Caracterizar os bagaços, antes e após os pré-tratamentos, para determinar as modificações na composição química, na carga superficial e na estrutura da fibra;
- Avaliar a hidrólise enzimática de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados em diferentes concentrações de enzima;
- Avaliar a adsorção das enzimas presentes na mistura Cellubrix/Novozym nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Três híbridos de cana de açúcar experimentais, H89, H146 e H166 foram selecionados em um programa desenvolvido pela RIDESA em associação com a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (LOUREIRO et al., 2011). As sementes, obtidas após a hibridização, foram plantadas em bandejas e mantidas em uma câmara de germinação por 30 dias. As sementes germinadas foram transferidas para tubos e depois para o campo, para gerar plantas iniciais para subsequente propagação vegetativa. Os híbridos foram plantados em maio de 2007, usando fileiras de 5 m de comprimento, em um campo experimental em Oratórios, MG, Brasil (20°25'50'' latitude sul, 42°48'20'' longitude oeste).

A primeira safra dos híbridos foi obtida em julho de 2008. Após a primeira colheita dos híbridos as canas de açúcar voltaram a crescer o que gerou uma segunda safra (clones dos híbridos obtidos na primeira safra) que foi colhida em julho de 2009 (plantas de 12 meses de idade) que foram utilizadas para avaliação neste trabalho.

Adicionados aos três híbridos experimentais, uma variedade comercial do bagaço de cana-de-açúcar (VC) foi obtida da Companhia Açucareira Vale do Rosário, Orlândia, SP, e foi utilizada como controle dos experimentos (Figura 10).

Figura 10. Aspecto de cor e tamanho das partículas dos bagaços de cana-de-açúcar. (A) Variedade comercial, (B) Híbrido 89, (C) Híbrido 146 e (D) Híbrido 166.

Após o corte da cana, o material foi processado em picador industrial. Ao chegar à Escola de Engenharia de Lorena, os bagaços picados foram lavados em colunas de PVC, de 1 m de comprimento e 150 mm de diâmetro, com uma tela de retenção de 200 mesh no fundo da coluna, a fim de reter o material mais fino ($< 0,05$ mm de comprimento). Partículas que passaram pela tela foram bombeadas novamente ao topo da coluna. A recirculação do filtrado permitiu a formação de um emaranhado de fibras na base da coluna que reteve essas partículas. A recirculação de água foi interrompida quando a água não continha mais turbidez. Depois disso, biomassa adicional foi adicionada na coluna, e passou-se água destilada pela coluna até que a lavagem produzisse um resultado de coloração negativa no teste de fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1976). O material foi coletado, centrifugado (centrífuga Arno) e armazenada a -18°C até seu uso.

4.2. TRATAMENTO QUIMIO-MECÂNICO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Amostras de bagaços de cana-de-açúcar foram processadas em duas etapas, visando simular o processo industrial de refino na polpação quimio-mecânica (KOKTA, 1990; VICENTIM; FERRAZ, 2008) (Figura 11).

Figura 11. Etapas do pré-tratamento quimio-mecânico sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.

Vinte gramas de bagaço foram colocados em um kitassato de 500 mL e mantidos sob vácuo por 30 min. O pré-tratamento foi iniciado pela impregnação dos bagaços com uma solução de sulfito ácido, sob vácuo por 15 min. Foram avaliadas as concentrações de sulfito de sódio de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % (m/m), adicionada de uma concentração fixa de ácido sulfúrico (2,5 % m/m). A proporção de bagaço para líquido foi de 1:10 (p/v) e a reação foi conduzida por 2 h a 121 °C em autoclave. Em cada condição de pré-tratamento foi feita a medida do pH do licor antes e depois do pré-tratamento.

Após esta etapa, o material foi filtrado em funil de Büchner sobre papel filtro, recirculando a água para retenção dos finos, até que a água de lavagem apresentasse um valor de pH próximo de 7,0 e absorvância constante, a 600 nm. Ao material lavado foi adicionado 700 mL de água (2,4 % de consistência) e desfibrado em um liquidificador industrial.

O bagaço pré-tratado foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min (Centrífuga Rotanta 460R – Hettich Zentrifugen), deixado à temperatura ambiente, até que não apresentasse água livre e congelado a -20 °C, em sacos plásticos fechados. O rendimento do processo foi calculado com base na massa seca da amostra.

A temperatura de reação do tratamento foi avaliada com amostras de bagaço da variedade comercial e dos três clones de cana. A reação foi conduzida com uma concentração fixa de sulfito de sódio (5 % m/m) e ácido sulfúrico suficiente para reduzir o pH para 2,1. As temperaturas avaliadas foram: 130, 150 e 160 °C, em reatores de aço inox aquecidos em banho de silicone (Figura 12).

Figura 12. Reator de aço inox (800 mL) usado para o pré-tratamento dos bagaços (A). Os reatores são aquecidos em banho silicone nas temperaturas do processo (B).

O fator de severidade combinada (CSF) foi calculado de acordo com a equação 5 proposto por Schell et al. (2003).

$$CSF = \log_{10} \left[t \times \exp \frac{T - 100}{14,75} \right] - pH \quad (5)$$

Onde: t é o tempo de residência (min), T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH refere-se ao pH do respectivo hidrolisado hemicelulósico.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.3.1. Determinação do teor de umidade

Amostras de aproximadamente 1 g de bagaço de cana foram deixadas a temperatura de 105°C , em balança de infravermelho, até a obtenção de massa constante. O teor de umidade foi determinado pela diferença da massa obtida antes e após o aquecimento.

4.3.2. Remoção de extrativos

A composição química das amostras de material lignocelulósico foi determinada após a remoção de extrativos com etanol. Aproximadamente 3 g de amostra cominuída a 25 mesh foram extraídas com etanol 95 %, por um período de 6 h, em um equipamento Soxhlet. Após a remoção dos extrativos, as amostras extraídas foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72 %, para posterior caracterização dos seus componentes.

4.3.3. Hidrólise ácida

A caracterização química das amostras de bagaço foi realizada através de hidrólise ácida, na qual 300 mg de amostra livre de extrativos, seca e moída (25 mesh) foram pesadas em tubos de ensaio adicionadas de 3 mL de H_2SO_4 72 % (p/p). Os experimentos foram conduzidos em banho-maria a 30 °C, por 1 h, homogeneizando com bastão de vidro a cada 5 min, aproximadamente. A seguir, o material hidrolisado foi transferido quantitativamente para frascos de 250 mL, com acréscimo de 79 mL de água destilada, de modo que o ácido fosse diluído a uma concentração final de 3 %. Os frascos foram levados à autoclave a 121 °C, por 1 h. O material resultante foi resfriado, filtrado em filtro de vidro de placa porosa (número 3) para posterior análise de lignina insolúvel. O volume do líquido filtrado foi ajustado para 100 mL com água destilada (Figura 13).

Figura 13. Fluxograma da caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados.

4.3.3.1. Análise de lignina insolúvel

A lignina, retida em filtro de vidro de placa porosa (número 3), foi lavada com aproximadamente 100 mL de água destilada e seca em estufa a 105 °C, até atingir massa

constante. A porcentagem de lignina insolúvel presente nos materiais *in natura* ou pré-tratados foi obtida de acordo com a equação 6.

$$\% \text{ de Lignina insolúvel} = \frac{FL - F}{AI} \times 100 \quad (6)$$

onde: FL = peso do filtro contendo lignina insolúvel (g); F = peso do filtro (g); AI = peso seco da amostra inicial (g).

4.3.3.2. Análise de lignina solúvel

Uma alíquota do sobrenadante obtido da hidrólise ácida do bagaço foi utilizada para análise de lignina solúvel. A quantidade de lignina solúvel na amostra foi obtida de 100 µL da amostra, diluídos (1:10) com ácido sulfúrico 3 % e a solução foi analisada em espectrofotômetro a 205 nm. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações 7 e 8.

$$LS = Abs \times \frac{1}{\epsilon \times a} \quad (7)$$

$$\% \text{ Lignina Solúvel} = \left(\frac{LS \times v_c \times V}{1000 \times v_a} \right) \times 100 \quad (8)$$

onde: LS = concentração de lignina solúvel (g/L); Abs = absorvância da amostra a 205 nm; ϵ = absorvidade molar da lignina (105 L/g.cm); a = passo óptico da cubeta (1 cm); v_c = volume da cubeta (1 mL); V = volume do balão volumétrico utilizado (100 mL); v_a = volume da amostra (0,1 mL).

4.3.3.3. Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina

Uma alíquota da fração líquida obtida da hidrólise ácida do bagaço foi filtrada em Sep Pak C18 e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para obtenção das concentrações de glicose, xilose e arabinose, além de ácido acético, as quais foram utilizadas no cálculo da porcentagem de celulose e hemicelulose presentes na amostra.

Para isso, utilizou-se uma coluna BIORAD HPX-87H a 45 °C, eluída a 0,6 mL/min com ácido sulfúrico 0,005 mol/L, acoplada a um detector do tipo índice de refração, com temperatura controlada de 35 °C, para a determinação dos monômeros (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 9 e 10).

O cálculo para correção da composição química do bagaço foi feito através da multiplicação do rendimento do processo pela composição química final do material.

$$\% \text{ Celulose} = \left(\frac{\text{Gli} \times 0,9}{m} \right) \times 100 \quad (9)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \left(\frac{\text{Xil} \times 0,88 + \text{Ara} \times 0,88 + \text{Aa} \times 0,72}{m} \right) \times 100 \quad (10)$$

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).

4.3.4. Determinação de grupos ácidos

A determinação dos grupos ácidos foi realizada de acordo com Beatson (1992) (Figura 14).

Figura 14. Fluxograma de determinação dos grupos ácidos presentes nos substratos gerados pelo pré-tratamento sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.

Ao bagaço tratado com sulfito ácido (1,5 g – base seca) foram adicionados 50 mL de ácido clorídrico (0,1 M) sob agitação magnética, por 45 min. O bagaço foi lavado com água deionizada sob filtração até condutividade constante de aproximadamente 8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (condutividade da água deionizada). Ao bagaço lavado foram adicionados 225 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,001 M e 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M. A mistura foi homogeneizada e a condutividade inicial foi medida.

A suspensão de bagaço foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, com adição de volumes de 0,5 mL, até que a condutividade alcançasse o valor inicial. Com os valores da condutividade e dos respectivos volumes de hidróxido de sódio foi construído um gráfico para determinação de viragem (ponto de mínimo).

O conteúdo de grupos ácidos pôde ser expresso pela equação 11:

$$\text{Conteúdo de Grupos ácidos} = \frac{AM1 - VM2}{W} \quad (11)$$

Onde: A é o primeiro ponto final da titulação de grupos sulfônicos ácidos (em mL); M_1 é a molaridade do NaOH; V é o volume de HCl adicionado; M_2 é a molaridade do HCl e W é o peso seco do bagaço ou da lignina (em kg).

4.3.5. Retenção de água (WRV)

O valor de retenção de água foi determinado de acordo com Guo et al. (2011). As amostras de bagaço (1 % m/m) foram imersas em água destilada por 24 h. Após este período, as amostras foram transferidas para um aparato de centrifugação composto por módulo de ultrafiltração, tubo de 50 mL e malha de aço com abertura de 200 mesh (Figura 15). 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 12.

$$\text{WRV (\%)} = \frac{(\text{Massa úmida} - \text{Massa seca})}{\text{Massa seca}} \times 100 \quad (12)$$

Figura 15. Representação esquemática do sistema de volume de retenção de água (SANTI JUNIOR, 2011).

4.3.6. Difração de raios-X (DRX)

A cristalinidade da celulose de amostras de bagaço de cana-de-açúcar, antes e depois do pré-tratamento com sulfito ácido, foi determinada no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal. O equipamento utilizado foi o difratômetro D8 Discover da BRUKER, com tubo de cobre gerador de raios-X com filamento de tungstênio ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite, no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg – 2θ), passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1s. O índice de cristalinidade foi obtido pelo método de Segal et al. (1959) e calculado pela equação 13 (CAO; TAN, 2002).

$$IC = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (13)$$

onde: IC: Índice de cristalinidade (%); I_{002} : Intensidade do pico no plano cristalino 002 ($2\theta = 22,6^\circ$); I_{am} : Intensidade do pico na fase amorfa ($2\theta = 19,0^\circ$).

O índice de cristalinidade corrigido foi obtido multiplicando-se o IC pelo rendimento do pré-tratamento, em cada temperatura, de acordo com a equação 14.

$$IC_{corr} = \frac{IC \times \text{Rendimento}}{100} \quad (14)$$

4.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)

A caracterização através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio FEG-SEM, NOVA 200 Nano SEM, FEI Company, a uma potência do feixe de elétrons de 5 kV. Para que fossem realizadas as microscopias eletrônicas de varredura, amostras de bagaços de cana-de-açúcar, moídas e secas à temperatura ambiente, foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento com uma película muito fina de ouro (Au-Pd - 80-20 % em peso), em um revestidor de alta resolução, Cressington Company 208HR, acoplado a um Controlador de Espessura de Alta Resolução, Cressington Company MTM-20.

Foram realizadas análises qualitativas empregando uma tensão de 5 kV e aumentos de 5000 vezes. As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras dos bagaços de cana-de-açúcar, antes e depois do pré-tratamento com sulfito ácido, como também após a hidrólise enzimática.

As análises químicas das amostras foram realizadas com a técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), utilizando um detector Si(Li) – EDAX, com uma tensão de aceleração de 15 kV.

Os equipamentos acima mencionados foram disponibilizados pelo Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal.

4.3.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram coletados para todas as amostras utilizando o espectrofotômetro Perkin-Elmer 16 PC spectrometer, Boston, USA (equipamento disponível no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal), que tem por base a interferometria de Fourier, em modo de absorbância com 64 varreduras (scans) e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros em

infravermelho médio (FTIR) foram obtidos na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , diretamente dos materiais produzidos.

4.3.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas e as análises por calorimetria exploratória diferencial foram realizadas nos equipamentos Shimadzu TGA –50 e Shimadzu DSC – 50 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), respectivamente. Os equipamentos foram disponibilizados pelo Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal.

As amostras foram pesadas (aproximadamente 5 – 10 mg de material seco) em cápsulas de alumínio seladas (DSC pans - Al crimp Pan C.201-52943), usando uma cápsula vazia como referência. As análises foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio, num fluxo de 20 ml/min. As amostras foram submetidas à seguinte programação de temperatura: aquecimento da temperatura de 20 °C até 580 °C (taxa de aquecimento de 10 °C/min). A seguir, a amostra foi resfriada até temperatura ambiente.

4.4. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E PROTEÍNAS

4.4.1. Celulases Totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo Ghose (1987). Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). A curva padrão de glicose foi preparada a partir uma solução-mãe de glicose na concentração de 10 mg/mL. Foi adicionado a tubos de ensaio 1 mL da solução-mãe e 4; 2; 1 e 0,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), a fim de obter concentrações de glicose correspondentes a 2; 3,3; 5 e 6,7 mg/mL. A curva padrão de

glicose foi construída através da relação entre massa de glicose em 0,5 mL (1; 1,65; 2,5 e 3,35 mg) e sua absorbância a 540 nm.

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 6 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático (Cellubrix) nas diluições de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400. Os tubos de ensaios foram mantidos em banho-maria a 50 °C por 60 min. Após o período de reação, adicionou-se 3 mL de reagente DNS e manteve-se a mistura a 100 °C por 5 min (MILLER, 1959). Adicionou-se 20 mL de água destilada, homogeneizou-se bem e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm (Espectrofotômetro U-2001 - Hitachi) em todos os tubos. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva padrão e usados para construir um gráfico que relaciona as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2 mg de glicose.

A atividade de celulasas totais foi estimada através da equação 15:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que libera 2,0 mg de glicose}} \left(\frac{U}{mL} \right) \quad (15)$$

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

4.4.2. Endoglucanase

A atividade de endo-1,4-β-glucanase foi determinada segundo técnica descrita por Tanaka et al. (1981). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Foram adicionados 0,9 mL de carboximetilcelulose 0,44 % (Sigma C5013) e 0,1 mL de extrato enzimático em tubos de ensaio e a reação foi mantida a 50 °C por 5 min.

Adicionou-se 1,5 mL de DNS em cada tubo de ensaio e esses foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 min. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 $\mu\text{mol/mL}$.

4.4.3. Exoglucanase

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Wood e Bhat (1988). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de Avicel 1 % foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por 60 min. As reações foram interrompidas com 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 min, após isso a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15 min para retirada dos sólidos insolúveis. Realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante a 540 nm. A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose previamente construída. A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 $\mu\text{mol/mL}$.

4.4.4. β -Glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), com *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG).

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 50 °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. 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 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidade corresponde a formação de 1 μmol de *p*NP por min.

4.4.5. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada de acordo com o método de Bailey, Biely e Poutanen (1992). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Foi adicionado 0,9 mL de xilana 1 % e 0,1 mL de solução enzimática em tubo de ensaio que foi incubado a 50 °C por 5min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi fervido a 100 °C em banho-maria, por 5 min. Após o resfriamento, realizou-se leitura da absorbância a 540 nm. A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 16 e 20 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 μmol de açúcar por min, expresso em xilose.

4.4.6. β -Xilosidase

A atividade de β -xilosidade foi determinada segundo a metodologia de Tan, Mayers e Saddler (1987).

Uma alíquota de 0,8 mL de solução de *p*-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX) 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de solução enzimática em um tubo que foi incubado a 50 °C por 30 min. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % ao tubo de ensaio e foi feita a leitura da absorbância a 410 nm. 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 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -xilosidade corresponde a formação de 1 μmol de *p*NP por min.

4.4.7. Proteínas Totais

O teor de proteínas foi determinado como descrito por Bradford (1976). A reação foi iniciada adicionando 0,1 mL da amostra a 1 mL do reagente. Após 5 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão foi construída com soluções de albumina do soro bovino (BSA) 20, 40, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$.

4.5. EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS

4.5.1. Caracterização da enzima

Nos experimentos de hidrólise enzimática foram utilizadas celulasas de *Trichoderma reesei* ATCC26921 (Cellubrix) e β -glicosidases de *Aspergillus niger* (Novozym 188). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em tampão acetato 50 mM, pH 4,8. Uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática corresponde a 1 micromol de equivalentes de glicose por unidade de volume e minuto de reação. A atividade celulásica total foi determinada com papel de filtro Whatman nº1, usando o método de DNS e CLAE para quantificar açúcares redutores totais e mono e dissacarídeos, respectivamente. Foi realizada a caracterização dos extratos enzimáticos brutos, obtendo-se 68,5 FPU de celulase (Cellubrix) e 856,6 U de β -glicosidase (Novozym).

A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada na consistência de 2 % (p/v). As reações foram conduzidas em tubos de centrífuga de 50 mL fechados com tampa, inclinados no banho a 45 °C, sob agitação de 120 rpm contendo 0,2 g de substrato em 10

ml de meio reacional (enzimas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com 0,01% de azida sódica).

Foram avaliadas soluções mistas de Cellubrix/Novozym com atividade para obter 5, 10 e 20 FPU de celulasas e 10, 20 e 40 UI de β -glicosidasas por grama de substrato, respectivamente.

Nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h foram retiradas alíquotas de 750 μ L, que em seguida foram fervidas por 5 min. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, por 15 min e os sobrenadantes foram separados e usados para a quantificação de glicose e xilose (Figura 16).

A liberação de açúcares foi monitorada durante o processo hidrolítico por cromatografia líquida, utilizando uma coluna HPX-87H.

Figura 16. Fluxograma da sacarificação enzimática dos substratos gerados pelo pré-tratamento sulfito ácido dos bagaços de cana-de-açúcar.

A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada como a soma dos rendimentos de glicose, calculados de acordo com as Equações 16 e 17:

$$\text{CEC (\%)} = \left(\frac{[\text{Glicose}]}{[\text{Glicose potencial}]} \right) \times 100 \quad (16)$$

$$[\text{Glicose potencial}] = \left(\frac{\% \text{ de celulose} \times \text{massa seca da amostra}}{\text{Fc}_1} \right) \quad (17)$$

A conversão enzimática da hemicelulose (CEH) foi estimada pelo rendimento de xilose calculado de acordo com as Equações 18 e 19:

$$\text{CEH (\%)} = \left(\frac{[\text{Xilose}]}{[\text{Xilose potencial}]} \right) \times 100 \quad (18)$$

$$[\text{Xilose potencial}] = \left(\frac{\% \text{ de xilana} \times \text{massa seca da amostra}}{\text{Fc}_2} \right) \quad (19)$$

Onde: Fc_1 = fator de conversão da celulose em glicose: 0,9 e Fc_2 = fator de conversão da hemicelulose em xilose: 0,88.

4.6. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

O teste de adsorção das proteínas presentes no extrato das enzimas Cellubrix e Novozym foi feita em Avicel ou bagaço de cana-de-açúcar. A concentração final de proteínas utilizada foi de 0,15 mg/mL ou 0,35 mg/mL, para o bagaço e o Avicel, respectivamente. O ensaio foi realizado em um volume total de 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 15,0 mg de bagaço de cana-de-açúcar ou 1,5 mg de Avicel a 4 °C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 5 min e lavadas com 200 µL de água destilada, por 4 vezes. A figura 17 mostra os passos utilizados para o teste de adsorção. Ao final, foram adicionados 100 µL de água destilada e realizado o teste de ninidrina na suspensão de Avicel ou bagaço (ZHU; SATHITSUKSANOH; ZHANG, 2009).

Figura 17. Esquema dos passos realizados para determinação da adsorção enzimática nos substratos.

A reação da ninidrina é usada na detecção de aminoácidos por ser característica da função amina primária. A ninidrina é um poderoso agente oxidante que reage com α -aminoácidos, entre pH 4 e 8, originando um composto de cor púrpura, que não apresenta sempre a mesma intensidade de coloração (STARCHER, 2001).

Para o teste de ninidrina foram preparadas as soluções tampão acetato de sódio 4 N, solução de cloreto de estanho (SnCl_2) e o reagente de ninidrina 2 %, conforme descrito a seguir.

a) Tampão acetato de sódio 4 N

Dissolveram-se 544 g de acetato de sódio em aproximadamente 200 mL de água destilada. Adicionaram-se, lentamente e sob agitação, 100 mL de ácido acético e o volume final ajustado para 500 mL em balão volumétrico.

b) Solução de cloreto de estanho (SnCl_2)

Dissolveram-se 50 mg de cloreto de estanho em 500 μL de etilenoglicol. A solução produzida ficou turva e devendo-se misturar bem antes de pipetar.

c) Reagente de ninidrina 2 %

Dissolveram-se 200 mg de ninidrina em uma mistura contendo 7,5 mL de etilenoglicol e 2,5 mL de tampão acetato de sódio 4N. Ao final, foram adicionados 250 μ L de solução de cloreto estano. O reagente apresentou uma coloração vermelho pálida e foi acondicionado em frasco âmbar, bem fechado.

O teste de ninidrina pode ser descrito como na figura 18, em que 300 μ L de NaOH 13,5 M foram misturadas com 100 μ L de uma mistura contendo água e bagaço de cana ou Avicel em um frasco eppendorf. Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 20 min para a hidrólise completa das proteínas. Depois de resfriar, à temperatura ambiente, a solução foi neutralizada pela adição de 500 μ L de ácido acético 100 % (glacial), seguido da adição de 500 μ L de ninidrina 2 %, sob agitação constante. Após ebulição por 10 min e resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas, para remoção dos sólidos e a absorbância do sobrenadante colorido foi medida a 570 nm. Para quantificar as interferências no método, o teste foi realizado utilizando somente os bagaços ou o Avicel. A curva padrão foi construída com soluções de albumina do soro bovino (BSA) 100, 150, 300, 500, 750 μ g/mL.

Figura 18. Representação esquemática do teste de ninidrina.

Para a determinação da porcentagem de proteína adsorvida na fibra, foram utilizados os valores obtidos no teste de ninidrina, referentes à quantidade de proteína adicionada no início e a obtida após as lavagens, de acordo com a equação 21.

$$\% \text{ adsorção de proteína} = \frac{[PTN]}{[P_i]} \times 100 \quad (20)$$

Onde: [PTN] = concentração de proteína quantificada pelo teste de ninidrina (mg/mL) e [P_i] = concentração de proteína adicionada no início do teste de adsorção (mg/mL).

A quantidade de proteína adsorvida na fibra foi calculada através da relação entre o teor de proteína após o teste adsorção, o volume reacional e massa de bagaço ou Avicel adicionada no início do teste, conforme a equação 21.

$$P_{ads} = \frac{[PTN] \times Vr}{m} \quad (21)$$

Onde: [PTN] = concentração de proteína quantificada pelo teste de ninidrina (mg/mL); Vr = volume reacional e m = massa de bagaço ou Avicel proteína adicionada no início do teste de adsorção (g).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

A caracterização química dos bagaços estudados se encontra na tabela 1.

Tabela 1. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar.

Bagaços	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Total (%)
VC	43,70 ± 0,73	27,30 ± 0,78	24,40 ± 0,19	95,40
H89	43,64 ± 0,11	29,50 ± 0,28	18,22 ± 0,02	91,36
H146	41,93 ± 0,34	32,43 ± 0,83	19,01 ± 0,10	93,37
H166	44,04 ± 0,42	32,07 ± 0,01	20,03 ± 0,48	96,14

Todos dados reportados são valores médios seguidos pelos seus respectivos desvios padrões.

Três bagaços obtidos de canas-de-açúcar híbridas foram avaliados de acordo com suas composições químicas. Um bagaço proveniente de usina, denominado de “variedade comercial”, também foi incluso nesse estudo. O conteúdo de lignina, hemicelulose e celulose dos bagaços livres de extrativos variou de 18,22 % a 24,40 %, 27,30 % a 32,43 %, 41,93 a 44,04 %, respectivamente. O teor de extrativos destas amostras foi determinado por Masarin et al. (2011) e variou de 2,6 %, para a variedade comercial, a 7,5 %, para o híbrido 89. As somatórias dos dados variaram de 91,36 % a 96,14 %. O ácido 4-O-metil-glucurônico, que é frequentemente encontrado em cadeias de hemicelulose de bagaço de cana (SUN et al., 2004), não foi quantificado nessas amostras e poderia pertencer aos componentes não determinados (SLUITER et al., 2010). Cinzas solúveis em meio ácido e a formação de produtos de degradação de açúcares também poderiam pertencer aos componentes não determinados (SLUITER et al., 2010).

O híbrido H89 foi escolhido, por apresentar menor teor de lignina e os híbridos H146 e H166 foram propostos, por apresentarem maiores teores de hemicelulose, dentre os 11 genótipos disponíveis. Estas diferenças podem ser importantes quando se avalia um pré-tratamento, principalmente, quando este visa à retirada de componentes específicos, como é o caso do pré-tratamento ácido, utilizado neste trabalho.

O melhoramento das variedades de cana-de-açúcar tem desempenhado um papel vital no desenvolvimento das indústrias de açúcar e álcool. Os principais objetivos dos programas de melhoramento da cana geralmente incluem melhoria dos rendimentos, aumento do teor de açúcar, maior capacidade de safra, melhoria na resistência a doenças e manutenção dos níveis de fibra aceitáveis para moagem (JACKSON, 2005). O melhoramento das variedades pode, ainda, visar à diminuição do conteúdo de lignina na cana-de-açúcar. Esse efeito pode ser interessante, quando se pensa na utilização do bagaço dessas variedades para a produção de etanol. Um menor conteúdo de lignina poderia facilitar as etapas de pré-tratamento e/ou hidrólise enzimática.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS COMERCIAIS

As preparações enzimáticas utilizadas nesse trabalho foram obtidas da empresa Novozymes. Por se tratarem de preparações comerciais brutas, as atividades das enzimas de interesse e o teor de proteínas foram determinados e estão compilados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividades das enzimas hidrolíticas e teor de proteínas presentes nos preparados enzimáticos comerciais.

Enzimas	Cellubrix	Novozym 188
β -glicosidases (UI/mL)	32,3	711,4
Endoglucanases (UI/mL)	1509,2	25,0
Exoglucanases (UI/mL)	209,4	3,0
Celulases totais (FPU/mL)	49,3	n.d.
β -D-xilanases (UI/mL)	482,9	50,7
β -xilosidases (UI/mL)	39,6	3,9
Teor de proteínas (mg/mL)	216,7	164,0

O extrato enzimático Cellubrix, obtido de *Trichoderma reesei*, apresentou elevada atividade de endoglucanases (1509,2 UI/mL). Essas enzimas são importantes na conversão do bagaço de cana, pois são responsáveis pela quebra da cadeia da celulose, gerando moléculas com menor grau de polimerização (LYND et al., 2002). Essa despolimerização cria novos sítios de ação para as exoglucanases, também presentes nesse extrato. No

entanto, para uma alta conversão da celulose em glicose, a presença de celobiasas também é importante, uma vez que é através da ação desse grupo de enzimas que oligossacarídeos serão hidrolisados, liberando glicose. A atividade de celobiasas na Cellubrix é considerada baixa (32,3 UI/mL), quando comparada com as atividades de endo e exoglucanases. Dessa forma, a suplementação do extrato com β -glicosidases de *Aspergillus niger* (Novozym) (711,4 UI/mL) pode resultar em maiores valores de conversão da celulose a glicose.

No extrato Cellubrix foi detectada uma alta atividade de xilanases (482,9 UI/mL), isso faz com que sua utilização também seja importante para a hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana. A presença da hemicelulose dificulta a ação das celulasas, já que esse polissacarídeo recobre as fibrilas de celulose na parede celular (HIMMEL et al., 2007). Uma das formas de melhorar a conversão de celulose em glicose é combinar as enzimas em um único preparado enzimático (TABKA et al., 2006).

5.3. EFEITO DA CARGA DE SULFITO E ÁCIDO SULFÚRICO NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Com o intuito de se avaliar o efeito da adição de sulfito no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, foram realizados experimentos variando a carga de Na_2SO_3 , mantendo-se fixa a carga de H_2SO_4 (2,5 % m de ácido/m de bagaço), conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química da variedade comercial de cana-de-açúcar, após tratamento com sulfito de sódio em meio ácido (H_2SO_4 , 2,5 % m de ácido/m de bagaço), a 121 °C.

Amostras		Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Rendimento (%)	C g/100g de bagaço	H g/100g de bagaço	L g/100g de bagaço
pH	Na_2SO_3 (%)							
-	0,0	43,70 $\pm$ 0,73	27,30 $\pm$ 0,78	24,40 $\pm$ 0,19	100,00	-	-	-
1,51	0,0	52,34 $\pm$ 1,02	15,37 $\pm$ 0,31	24,57 $\pm$ 0,29	76,97	40,29	11,83	18,91
1,87	2,5	43,27 $\pm$ 0,37	26,22 $\pm$ 0,23	21,80 $\pm$ 0,37	97,27	42,09	25,51	21,20
2,13	5,0	45,01 $\pm$ 0,97	28,70 $\pm$ 0,64	21,20 $\pm$ 0,31	84,43	38,01	24,23	17,90
2,41	7,5	43,09 $\pm$ 0,39	28,01 $\pm$ 0,13	21,43 $\pm$ 0,04	83,41	36,12	23,48	17,96
2,74	10,0	43,45 $\pm$ 0,74	28,55 $\pm$ 0,39	21,86 $\pm$ 0,24	84,46	36,70	24,11	18,46

Nota-se que o aumento na carga de sulfito de sódio aumenta o pH da solução, porque o ânion sulfito reage com o ácido formando o bissulfito. O pH da solução varia de 1,51 (0,0 % de sulfito) a 2,74 (10,0 % de sulfito). Essa variação pode ser considerada pequena, mas produz efeitos diferentes nas fibras dos bagaços testados. Os rendimentos de polpa, ao término da reação, foram determinados e estão apresentados na tabela 3. Quando se utiliza somente H_2SO_4 , observa-se o menor rendimento do processo (76,97 %). Aumentos na dosagem de sulfito não resultaram em decréscimos acentuados no rendimento. Com a adição da menor carga de sulfito (2,5 %), o rendimento do processo é de 97,27 % e, quando se aumenta a carga para 5,0 %, o rendimento atinge 84 %, praticamente não variando mais, para as cargas de 7,5 % e 10,0 % de sulfito.

As polpas obtidas foram caracterizadas quimicamente e os teores de celulose, hemicelulose e lignina estão apresentados na tabela 3. Verificou-se que o tratamento ácido foi capaz de remover 56,7 % de hemicelulose da variedade comercial de bagaço (Figura 19), mesmo em uma temperatura relativamente baixa, como 121 °C. O tratamento também foi capaz de solubilizar uma alta parcela da lignina (22,5 %), com pouca remoção da celulose (7,8 %). Rodrigues et al. (2010) pré-trataram o bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído, em reator de 350 L a 121 °C, por 10 min e carga de 100 mg de ácido sulfúrico/g de substrato. Depois do pré-tratamento, o bagaço apresentou 54,5 % de celulose, 32,0 % de lignina e 11,5 % de hemicelulose. Ácido sulfúrico diluído (abaixo de 0,3 % m/m) foi utilizado no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em temperaturas mais altas, entre 190 – 220 °C, e os resultados mostraram rendimentos de glicose próximos a 70 %, porém a decomposição da glicose aumentou com a drasticidade do pré-tratamento (GURGEL et al., 2012).

Comparando apenas os tratamentos com sulfito, observa-se um aumento na remoção de componentes do bagaço até a adição de 5 % de sulfito, após o que permanece constante. Quando se adicionou 7,5 % de sulfito, além dos outros componentes, verificou-se um aumento de 30,8 % na degradação da celulose, o que não é viável, uma vez que o objetivo do pré-tratamento é produzir um substrato rico neste polissacarídeo, o qual deverá ser hidrolisado pelas celulasas, para a geração de glicose. Ao se adicionar 10,0 % de sulfito, observou-se praticamente a mesma remoção de componentes, que nas reações com 5 % e 7,5 % de sulfito.

Figura 19. Remoção de componentes da Variedade Comercial do bagaço de cana-de-açúcar submetida ao pré-tratamento sulfito ácido, em diferentes cargas de Na₂SO₃ a 121 °C. ■ Celulose; ■ Hemicelulose; ■ Lignina.

A remoção de lignina no bagaço foi de 13,1 %; 26,6 %; 26,4 % e 24,3 %, com concentrações de 2,5 %; 5,0 %; 7,5 % e 10,0 % de Na₂SO₃, respectivamente (Figura 19). A remoção de hemicelulose foi um pouco inferior à da lignina, com valores correspondentes a 6,6 %; 11,2 %; 14,0 % e 11,7 %, para as concentrações de sulfito avaliadas. Houve também remoção de 3,7 %; 13,0 %; 17,4 % e 16,0 % de celulose.

Tabela 4. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar após tratamento com ácido sulfúrico diluído e com 5 % sulfito ácido, a 121°C.

Amostra	H ₂ SO ₄ (%)	Na ₂ SO ₃ (%)	Rend. (%)	Composição (%)			Composição (g/100g bagaço)			Remoção (%)		
				C	H	L	C	H	L	C	H	L
VC	0,0	0,0	100,0	43,7	27,3	24,4	-	-	-	-	-	-
	2,5	0,0	77,0	51,5	15,0	24,6	40,3	11,8	18,9	7,8	56,7	22,5
	2,5	5,0	84,4	45,0	28,7	21,1	38,0	24,2	17,9	13,0	11,2	26,6
H89	0,0	0,0	100,0	43,6	29,5	18,2	-	-	-	-	-	-
	2,5	0,0	62,0	55,9	14,5	24,9	34,6	9,0	15,4	20,7	69,5	15,5
	2,5	5,0	88,8	41,7	26,2	20,7	37,0	23,3	18,4	15,2	21,0	0,00
H146	0,0	0,0	100,0	41,9	32,4	19,0	-	-	-	-	-	-
	2,5	0,0	75,9	47,3	21,0	23,0	35,9	15,9	17,4	14,4	50,9	8,3
	2,5	5,0	84,8	38,7	26,7	20,2	32,9	22,6	17,2	21,7	30,2	9,8

Rend.:rendimento; C: celulose; H: hemicelulose e L: lignina.

A 121 °C, o pré-tratamento sulfito ácido foi mais efetivo para a remoção de lignina do que o processo só com ácido, entretanto a remoção de hemicelulose foi muito menor. Quando os bagaços de cana foram pré-tratados com 5 % de sulfito em meio ácido, a lignina da variedade comercial e do H146 foram um pouco mais despolimerizadas do que no processo só com ácido (Tabela 4). O pré-tratamento com sulfito ácido proporcionou um rendimento na ordem de 80 %. A caracterização de H89, após o pré-tratamento não evidenciou redução no teor de lignina (Tabela 4).

A hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados foi feita com a mistura de celulasas comerciais. A figura 20 mostra a conversão de celulose em função do tempo de hidrólise para as polpas obtidas dos diferentes bagaços. A variedade comercial e o híbrido 89 tratados somente com ácido mostraram uma conversão de celulose na ordem de 42 %, após 72 h de hidrólise enzimática, o que está de acordo com a baixa digestibilidade de paredes celulares ainda lignificadas (SANTOS et al., 2011). O tratamento com 5 % de sulfito apresentou um menor nível de conversão de celulose (22 %), após 72 h de hidrólise enzimática. O híbrido 146 apresentou o maior nível de conversão de celulose (31 %), após 72 h de hidrólise enzimática, seguido pelo H89 (27,8 %) (Figura 20).

O rendimento de hidrólise enzimática da hemicelulose da variedade comercial pré-tratada com ácido foi de 96 % e no bagaço pré-tratado com sulfito ácido obteve-se 53 %. Nesse sentido, o menor conteúdo de hemicelulose do bagaço pré-tratado com ácido favoreceu a ação do preparado enzimático comercial. Entretanto, a eficiência do processo de hidrólise enzimática ainda foi baixa (30 %), após 72h de hidrólise enzimática, para a polpa com o menor conteúdo de lignina (17,2 %).

Sendo assim, o pré-tratamento com sulfito ácido a 121 °C foi abandonado e foram iniciados testes em temperaturas mais elevadas. Esse tipo de tratamento é frequentemente utilizado para a produção de polpa de celulose e foi denominado SPORL (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose) (ZHU et al., 2009).

Estudos realizados por Shuai et al. (2010) utilizando cavacos de madeira mole, demonstraram que a recuperação de monossacarídeos (hexoses e pentoses) é maior para o pré-tratamento com sulfito ácido (87,9 %) do que para o processo com ácido diluído (56,7 %), evidenciando a eficiência do método SPORL. Os autores determinaram que neste pré-tratamento as condições de carga de sulfito entre 8 – 10 % e ácido sulfúrico de 1,8 – 3,7 % em relação à madeira não-tratada (base seca) são ideais para a dissolução de hemicelulose

e lignina. Nestas condições a remoção de celulose foi cerca de três vezes menor que a desse trabalho, provavelmente pelo emprego de menor tempo, apesar de uma maior temperatura de reação (180 °C/30 min).

Figura 20. Conversão enzimática da celulose e da hemicelulose dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados a 121°C com H₂SO₄ a pH 1,5 (●) e com Na₂SO₃ 5,0 % a pH 2,1 (●); com 5 FPU de Cellubrix/10 UI de Novozym.

Uma temperatura mais alta de cozimento poderia favorecer a dissolução dos componentes, em especial da hemicelulose. Sendo assim, considerando que os substratos escolhidos têm menores teores de lignina que a madeira mole (spruce – 28,31 %) utilizada por Zhu et al. (2009), a concentração de 5,0 % de sulfito foi escolhida para dar continuidade aos experimentos de avaliação do efeito da temperatura no processo sulfito ácido, na tentativa de aumentar a remoção de hemicelulose e lignina, preservando a celulose.

5.4. EFEITO DA TEMPERATURA NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

5.4.1. Caracterização química

A composição química dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito ácido, em diferentes temperaturas, está mostrada na Tabela 5. As canas-de-açúcar híbridas apresentadas mostraram uma variação significativa no teor de lignina e hemicelulose em relação à variedade comercial, refletindo no rendimento da polpa obtida e na sua composição final. A composição química do bagaço pré-tratado é um fator que desempenha grande influência no rendimento da hidrólise enzimática dos polissacarídeos, principalmente da celulose.

O tratamento sulfito ácido da variedade comercial proporcionou um rendimento entre 70 e 78 %. A caracterização de lignina após o pré-tratamento mostrou uma redução no teor de lignina de 24,4 % para 15,24 %. A hemicelulose foi o componente que sofreu maior redução com a temperatura, indo de 27,3 % para 6,35 %. O sulfito de sódio em meio ácido em temperaturas controladas solubiliza a lignina e hemicelulose, mantendo a celulose praticamente intacta (ZHU et al., 2009). A degradação da celulose foi maior nas temperaturas mais baixas, mostrando uma maior seletividade do pré-tratamento a 160 °C (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização química de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito ácido (Na_2SO_3 5,0 %; pH 2,1), em diferentes temperaturas.

Bagaços e temperaturas do pré-tratamento	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	$L_{\text{insolúvel}}$ (%)	$L_{\text{solúvel}}$ (%)	Lignina (%)	Rendimento (%)	C g/100g de bagaço	H g/100g de bagaço	L g/100g de bagaço
VC	43,7 $\pm$ 0,73	27,30 $\pm$ 0,78			24,40 $\pm$ 0,19	100,00	43,70	27,30	24,40
130°C	43,06 $\pm$ 1,69	22,61 $\pm$ 2,35	23,67	1,64	25,31 $\pm$ 3,06	73,18	31,51	16,54	18,52
150°C	50,41 $\pm$ 0,44	16,13 $\pm$ 0,22	22,38	1,14	23,51 $\pm$ 0,15	78,09	39,36	12,60	18,36
160°C	57,00 $\pm$ 2,39	8,99 $\pm$ 0,21	20,82	0,75	21,57 $\pm$ 0,29	70,65	40,27	6,35	15,24
Híbrido 89	43,64 $\pm$ 0,11	29,50 $\pm$ 0,28			18,22 $\pm$ 0,02	100,00	43,64	29,50	18,22
130°C	39,30 $\pm$ 1,51	25,07 $\pm$ 1,03	18,00	1,89	19,89 $\pm$ 0,75	85,35	33,54	21,39	16,97
150°C	50,87 $\pm$ 0,87	17,86 $\pm$ 0,24	16,91	1,29	18,20 $\pm$ 0,44	65,66	33,40	11,73	11,95
160°C	57,64 $\pm$ 0,22	12,29 $\pm$ 0,14	18,22	0,85	19,07 $\pm$ 0,21	65,03	37,48	7,99	12,40
Híbrido 146	41,93 $\pm$ 0,34	32,43 $\pm$ 0,83			19,01 $\pm$ 0,10	100,00	41,93	32,43	19,01
130°C	40,10 $\pm$ 0,27	26,83 $\pm$ 0,09	19,88	1,94	21,82 $\pm$ 0,53	78,02	31,29	20,93	17,02
150°C	38,19 $\pm$ 0,51	23,50 $\pm$ 2,82	18,92	1,72	20,64 $\pm$ 0,07	82,21	31,39	19,32	16,97
160°C	57,47 $\pm$ 0,99	11,21 $\pm$ 0,52	19,97	0,95	20,92 $\pm$ 0,04	64,93	37,31	7,28	13,58
Híbrido 166	44,04 $\pm$ 0,42	32,07 $\pm$ 0,01			20,03 $\pm$ 0,48	100,00	44,04	32,07	20,03
130°C	38,49 $\pm$ 0,30	26,55 $\pm$ 0,45	22,06	1,49	23,55 $\pm$ 0,45	87,11	33,53	23,13	20,51
150°C	55,78 $\pm$ 0,39	13,24 $\pm$ 0,06	19,92	1,15	21,07 $\pm$ 0,18	79,07	44,11	10,47	16,66
160°C	53,57 $\pm$ 0,19	13,19 $\pm$ 0,03	20,27	1,09	21,32 $\pm$ 0,21	71,32	38,20	9,40	15,21

Todos dados reportados são valores médios seguidos pelos seus respectivos desvios padrões.

Os testes com sulfito de sódio indicaram que a etapa de cozimento dos bagaços das canas-de-açúcar com o licor (sulfito de sódio + ácido sulfúrico) comportou-se diferente dependendo das amostras tratadas. O cozimento foi menos eficiente principalmente para o híbrido 166. O híbrido 89 apresentou um baixo rendimento nas temperaturas de 150 °C e 160 °C. O rendimento do híbrido 146 foi semelhante ao do híbrido 89 apenas a 160 °C, enquanto que o híbrido 166 e a VC mostraram rendimentos de polpa iguais nas temperaturas avaliadas. Esses resultados foram similares aos obtidos por Laurito-Friend (2013) utilizando o pré-tratamento alcalino. Esse autor atribui a diminuição do rendimento às diferenças na composição química dessas amostras, em especial o conteúdo de lignina e extrativos.

As polpas obtidas foram caracterizadas quimicamente e os teores de celulose, hemicelulose e lignina estão apresentados na tabela 5. A variedade comercial apresentou o menor teor de hemicelulose (6,35 %) após o tratamento com sulfito ácido a 160 °C. Entre os híbridos, o H89 mostrou os menores teores de lignina, tanto inicial, quanto após o pré-tratamento, porém a remoção de celulose também foi a maior. A caracterização de lignina após o tratamento com sulfito ácido na maior temperatura mostrou uma redução no teor de lignina de 31,9 %. A variedade comercial apresentou o maior teor de lignina inicial (24,4 %), entretanto, após reagir com sulfito de sódio a 160 °C, mostrou a maior remoção de lignina (37,5 %). Esse dado sugere que, apesar dos híbridos possuírem um menor conteúdo de lignina inicial, a lignina destes híbridos deve ser mais recalcitrante ao meio reacional ácido.

Todas as amostras apresentaram teores de lignina maiores que 12 %, indicando que o tratamento com sulfito de sódio, nas condições avaliadas, não foi muito efetivo para remover a lignina. Siqueira et al. (2011) mostraram que bagaços de cana-de-açúcar submetidos a um processo de deslignificação seletivo com uma mistura de clorito de sódio/ácido acético precisam ter uma redução de 60 % da lignina para alcançar uma eficiente hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose.

O perfil de remoção de celulose, hemicelulose e lignina, durante o pré-tratamento com sulfito ácido, a 130 °C, 150 °C e 160 °C, está mostrado na tabela 6.

Tabela 6. Remoção de componentes durante o pré-tratamento sulfito ácido, em diferentes temperaturas

Bagaços	Temperatura (°C)	Remoção de Componentes (%)		
		Celulose	Hemicelulose	Lignina
VC	130	27,90	39,40	24,09
	150	9,92	53,85	24,75
	160	7,85	76,73	37,54
BH 89	130	23,13	27,48	6,84
	150	23,46	60,24	34,42
	160	14,11	72,91	31,94
BH 146	130	25,39	35,45	10,46
	150	25,13	40,43	10,74
	160	11,01	77,56	28,56
BH 166	130	23,87	27,88	0,00
	150	0,00	67,36	16,83
	160	13,25	70,67	24,09

A remoção de hemicelulose é gradativa e aumenta com o aumento da temperatura do pré-tratamento, ultrapassando 70 %, para todos os bagaços avaliados. Um aumento de 30 °C na temperatura do pré-tratamento é capaz de aumentar a remoção de hemicelulose em 94,75 %; 165,32 %; 118,78 % e 153,48 %, para VC, H89, H146 e H166, respectivamente. Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar grande parte de uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel e mais fácil de ser degradada do que a celulose. Nos materiais lignocelulósicos, está intimamente ligada à celulose e à lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material (SILVA, 2009). A remoção de hemicelulose pode aumentar a porosidade do material, favorecendo a hidrólise enzimática da celulose remanescente na fibra pré-tratada.

A remoção de lignina aumenta com o aumento da temperatura. A 160 °C, 37,54 %; 28,56 %; 24,09 % da lignina foram removidos de VC, H146 e H166, respectivamente. Já para H89, o maior valor de remoção de lignina é alcançado na temperatura de 150 °C. Muitos trabalhos citados na revisão da literatura assinalam a necessidade de remover a lignina das amostras, também é relatado que a remoção de lignina quase sempre é acompanhada da remoção dos polissacarídeos devido à interação física e química entre eles. Portanto, um processamento prévio e adequado destes materiais torna-se necessário para romper a parede celular (barreira física), bem como diminuir a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina para que as enzimas hidrolíticas possam acessar a

macroestrutura da biomassa a fim de aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005; HIMMEL et al., 2007).

A remoção de celulose diminui com o aumento da temperatura. Esse fato sugere que a celulose fica preservada, apesar do aumento da temperatura, em meio sulfito ácido. Isto pode indicar uma seletividade do pré-tratamento em temperaturas mais altas, que favorece a remoção de lignina e hemicelulose, por estarem mais expostas, além de apresentarem uma natureza mais amorfa. Vários resíduos agrícolas têm apresentado comportamentos diferentes quanto ao aumento da susceptibilidade da hidrólise da fração celulósica, alcançando até 50 % de degradação da celulose em experimentos realizados a temperaturas na faixa de aplicação para o pré-tratamento hidrotérmico, variando entre 150 – 230 °C aproximadamente (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999). Porém, fatores como a relação sólido/líquido e o tempo de reação empregado são importantes para o controle da degradação da fração celulósica evitando a perda de rendimento no processo de conversão enzimática da fração celulósica em glicose para a obtenção de etanol.

5.4.1.1. Grupos sulfônicos e retenção e água

Os bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados foram avaliados quanto ao teor de grupos sulfônicos (GS) e à capacidade de retenção de água na fibra (WRV). Os grupos ácidos, que podem ser introduzidos na lignina presente nos lignocelulósicos, a tornam mais hidrofílica e, conseqüentemente, fazem com que a fibra absorva mais água (SJOSTROM, 1993; MENDES, 2010). Porém, não se deve esquecer que, a presença da hemicelulose, com suas pontes de hidrogênio, também faz com que a fibra absorva mais água (BERRY; RODERICK, 2005).

O teor grupos sulfônicos e o valor de retenção de água foram determinados para cada temperatura usada no pré-tratamento (Figura 21; Tabela A.1).

Figura 21. Determinação dos grupos sulfônicos (GS) presentes nas fibras dos bagaços de cana-de-açúcar e da retenção de água (WRV), após o pré-tratamento sulfito ácido.

Não foi possível estabelecer um padrão para conteúdo de grupos sulfônicos, porém pode-se notar que o pré-tratamento a 130 °C fornece os maiores valores, sendo 201,07 mmol/kg de lignina; 139, 85 mmol/kg de lignina e 103,67 mmol/kg de lignina, para VC, H89 e H146, respectivamente. Entretanto, o conteúdo de grupos sulfônicos no híbrido 146 pré-tratado aumenta com o aumento da temperatura, alcançando 69,46 mmol/kg de lignina; 90,41 mmol/kg de lignina e 106,70 mmol/kg de lignina, para 130 °C, 150 °C e 160 °C. Este bagaço também apresenta os menores valores de remoção de lignina. O aumento da temperatura poderia aumentar a sulfonação da lignina, aumentando sua hidrofiliicidade e, como o tempo do pré-tratamento foi de 2 h, isso pode ter contribuído para diminuir o conteúdo de grupos sulfônicos na fibra, pois a lignina sulfonada seria removida. Uma saída para confirmar essa hipótese, seria realizar o pré-tratamento com tempos menores, para se verificar se há maior sulfonação antes da remoção da lignina.

Os valores de retenção de água diminuem com o aumento da temperatura, para todos os bagaços testados. Sendo a capacidade de retenção de água uma característica física relacionada com os grupos hidroxila expostos no interior da parede celular da fibra (SANTI JÚNIOR, 2011), isso já era esperado, uma vez que o aumento da temperatura é responsável pelo aumento da remoção da hemicelulose, diminuindo a quantidade de hidroxilas que estaria acessível para a adsorção de moléculas de água.

5.4.1.2. Cristalinidade

O conhecimento da microestrutura dos bagaços pré-tratados permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. Em se tratando de cristalinidade, a celulose é parcialmente cristalina, mas dependendo do tipo de pré-tratamento a qual foi submetida podem ocorrer alterações nesta propriedade. A composição das fases cristalina e amorfa pode ser estudada por meio de várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são análises por raios-X, destacando a difração ou espalhamento de raios-X. Neste método, um feixe de raios-X incidente em um material é parcialmente absorvido, outra parte é espalhada e o restante é transmitido, sem qualquer modificação. O espalhamento dos raios-X ocorre como resultado da interação do feixe com os elétrons do material. Os raios-X espalhados sofrem interferência entre si e produzem um padrão de difração, que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo dá informações sobre a distribuição de densidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material.

A análise por meio de difração de raios-X dos bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas foi realizada com o objetivo de avaliar a cristalinidade, antes e após o pré-tratamento. Os difratogramas revelaram que bagaços tratados com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C apresentam picos característicos da fase cristalina (a aproximadamente $2\theta = 22,6^\circ$) e da fase amorfa ($2\theta = 19,0^\circ$). Pode-se perceber que há uma variação na intensidade desses picos, mas que não há um padrão definido (Figuras 22 e 23). Em alguns bagaços há um aumento na intensidade do pico referente à fase amorfa, em outros há diminuição. O mesmo acontece para o pico referente à fase cristalina.

Figura 22. Perfil da cristalinidade dos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e após os pré-tratamentos sulfito ácido, em diferentes temperaturas. (--- *in natura*; --- 130 °C, --- 150 °C e --- 160 °C).

Figura 23. Perfil da cristalinidade dos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e após a melhor condição do pré-tratamento sulfito ácido e sua respectiva hidrólise enzimática. (--- *in natura*; --- 150 °C, --- 160 °C e --- após a hidrólise enzimática).

A figura 23 mostra os perfis da cristalinidade dos bagaços testados *in natura*, após a melhor condição de hidrólise enzimática e seu respectivo pré-tratamento. Pode-se notar que a intensidade do pico referente à fase cristalina aumenta, depois da hidrólise enzimática, em relação ao material *in natura*, comprovando que a porção amorfa da celulose é mais facilmente hidrolisada.

O índice de cristalinidade de um material lignocelulósico, o qual mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total, deve ser corrigido pelo rendimento da etapa de pré-tratamento pelo qual o material lignocelulósico é submetido. Analisando a tabela 7 e também a Tabela A.2, observa-se que o índice de cristalinidade (IC), corrigido pelos rendimentos das etapas de pré-tratamento, aumenta com o aumento da temperatura do pré-tratamento. Isso pode estar relacionado ao fato de que o pré-tratamento remove lignina, hemicelulose e a celulose amorfa, preservando a porção cristalina, fazendo com que o índice de cristalinidade aumente. Muitos estudos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumenta após as etapas de pré-tratamento e/ou deslignificação, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO; TAN, 2002; ZHAO; WANG; LIU, 2008).

Tabela 7. Índice de cristalinidade corrigido dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com sulfito ácido em diferentes temperaturas.

Pré-tratamento	IC corrigido			
	VC	H89	H146	H166
<i>in natura</i>	58,74	39,68	36,65	53,52
130 °C	35,47	15,01	35,38	29,97
150 °C	39,30	32,35	27,40	36,33
160 °C	41,89	37,39	34,35	47,92

Comparando o pico I_{002} (representado pela seta em vermelho) pode-se notar que este diminui para tratamento a 130 °C no qual há maior remoção de celulose (Figura 22; Tabela A.2). Analisando o pico I_{am} (representado pela seta em roxo) dos bagaços pré-tratados nota-se que este diminui com o aumento da temperatura, em comparação com os bagaços *in natura*, isso poderia ser justificado pela remoção de lignina e hemicelulose. Para a variedade comercial essas relações são bem definidas. Pela figura 24 pode-se notar que o IC corrigido, aumenta com a remoção de lignina e hemicelulose e com a diminuição da remoção de celulose.

Figura 24. Variação do índice de cristalinidade corrigido ($IC_{\text{corrigido}}$) da Variedade Comercial pela remoção de componentes: ■ Celulose; ■ Hemicelulose e ■ Lignina.

Como a cristalinidade pode influenciar na hidrólise enzimática da celulose ainda é um assunto divergente entre os trabalhos publicados (SANTI JÚNIOR, 2011). Ainda que muitos autores sugiram que a digestibilidade se correlaciona inversamente com a cristalinidade, outros afirmam que outras características físicas como grau de polimerização, volume de poros e tamanho de partícula podem desempenhar um papel mais significativo na sacarificação (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; GREGG; SADDLER, 1996).

O que se sabe é que a cristalinidade exerce maior influência nas taxas iniciais de conversão de celulose, ou seja, nas primeiras horas de reação. Isto ocorre, uma vez que em um substrato altamente cristalino, as pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose diminuem o acesso às celulasas, porém após um período inicial de reação transformam estas cadeias, com alto grau de empacotamento, em um material amorfo bem menos organizado, muito mais susceptível à hidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; PURI, 1984).

5.4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura e EDS

A microscopia eletrônica de varredura associada ao sistema de energia dispersiva (MEV – EDS) foi realizada nas amostras dos bagaços *in natura* e após o pré-tratamento com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C. Esta técnica permite uma determinação visual do tamanho, da forma, além da distribuição de tamanho das partículas. As imagens de MEV estão apresentadas nas figuras 25 a 28 e os dados referentes ao EDS estão apresentados na tabela 8.

Fazendo uma análise comparativa das fotomicrografias, observa-se uma mudança significativa da estrutura morfológica dos bagaços de cana-de-açúcar quando submetidos às diferentes temperaturas do pré-tratamento, mas não foi possível associar as alterações com a severidade do pré-tratamento. Pela análise das micrografias, pode-se observar que o tratamento sulfito ácido ocasionou algumas alterações estruturais nas amostras de bagaço de cana, como colapso do material (Figuras 25-D, 26-C, 27-B, 27-D, 28-B e 28-D), ocorrendo danificações nos vasos e na parede celular das fibras; maior exposição das fibras (25-C), pela retirada de hemicelulose e lignina; separação das fibras (25-C e 26-C) e inchamento das fibras (26-C e 28-C), por apresentarem fibras mais espessas, que as não tratadas da mesma amostra.

Figura 25. Fotomicrografias da Variedade Comercial, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas. A: VC *in natura*; B: 130 °C; C: 150 °C e D: 160 °C (Ampliação de 5000x).

Figura 26. Fotomicrografias do Híbrido 89, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas. A: H89 *in natura*; B: 130 °C; C: 150 °C e D: 160 °C (Ampliação de 5000x).

Figura 27. Fotomicrografias do Híbrido 146, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas. A: H146 *in natura*; B: 130 °C; C: 150 °C e D: 160 °C (Ampliação de 5000x)

Figura 28. Fotomicrografias do Híbrido 166, antes e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas. A: H166 *in natura*; B: 130 °C; C: 150 °C e D: 160 °C (Ampliação de 5000x).

Considerando que o processo sulfito ácido solubiliza parte da lignina do bagaço, deixando a lignina residual parcialmente sulfonada, e que esta mudança de composição da modifica sua polaridade e, conseqüentemente, a sua recalcitrância, considerou-se necessário investigar a presença de enxofre no bagaço, utilizando-se espectrometria de raios-X de energia dispersiva.

Esta técnica, também conhecida como microanálise de raios-X, baseia-se na identificação dos raios-X emitidos pela amostra, quando da interação da mesma com o feixe eletrônico. Assim, é possível determinar a composição de regiões com até 1 nm de diâmetro. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que permite determinar quantidades relativas de até 0,3 % dos elementos presentes na amostra (FARDIM; DURÁN, 2003).

No sistema de energia dispersiva, os raios-X são distribuídos no espectro por ordem de energia, sendo esta distribuição distinta e específica para cada elemento que compõe a amostra. A partir das informações contidas no espectro é possível obter informações quali e quantitativas acerca da composição da amostra em escala microscópica.

Tabela 8. Quantificação do S, presente nas fibras dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C.

Amostra	Temperatura (°C)	Conteúdo de S (% em massa)
VC	<i>in natura</i>	0,00
	130	0,22
	150	0,21
	160	0,24
H89	<i>in natura</i>	0,10
	130	0,15
	150	0,23
	160	0,31
H146	<i>in natura</i>	0,09
	130	0,21
	150	0,22
	160	0,28
H166	<i>in natura</i>	0,04
	130	0,34
	150	0,19
	160	0,28

As análises foram realizadas abrangendo a área total das amostras, visando identificar o conteúdo de enxofre. Os resultados (Tabela 8) demonstram a presença de baixa concentração de enxofre perfazendo menos de 0,5 % da massa das amostras analisadas. Esses dados corroboram os resultados obtidos na quantificação dos grupos sulfônicos, apresentados no item 5.4.1.1.

5.4.1.4. FTIR

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) tem emergido como uma técnica analítica versátil para diferenciar materiais submetidos a diferentes processos, através da análise espectroscópica de seus constituintes, de modo a caracterizar, classificar e quantificar espécies químicas. Isto é atribuído, principalmente, aos avanços tecnológicos recentes nas instrumentações do FTIR (ABIDI; CABRALES; HAIGLER, 2014).

A determinação quantitativa de grupos acetil, conteúdo de hidroxilas fenólicas e lignina total ou outras características dos materiais lignocelulósicos podem ser obtidas dos espectros de FTIR. Apesar de muito conhecidos, os espectros de infravermelho dos bagaços de cana-de-açúcar são bem complexos, considerando que são uma mistura dos espectros da celulose, hemicelulose e lignina. A região mais característica compreende a faixa de 800 a 1800 cm^{-1} e apresenta bandas de estiramento e deformação, principalmente de grupos C-H, C-O, O-C-O, C=O dos componentes e de anéis aromáticos da lignina. Cada espectro consiste em uma amostra independente.

Observando os gráficos da figura 29, verificou-se uma forte contribuição da região próxima a 1600 cm^{-1} , de frequência relacionada a grupos aromáticos, comumente atribuídos à lignina residual. Além desse evento, observa-se absorção em 3350 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação -OH e em 2900 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-H (representadas pelas setas em verde).

Figura 29. Determinação do perfil FTIR dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido. (--- *in natura*, --- 130 °C, --- 150 °C e --- 160 °C).

Podem-se observar mudanças entre o espectro dos bagaços de cana *in natura* e os espectros dos bagaços pré-tratados, primeiramente, nas bandas de região de absorção entre $1900\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ (representada pelas setas em vermelho), região característica de estruturas químicas do tipo C=O, relacionada a ácidos carboxílicos e anéis aromáticos, respectivamente (ZHAO; WANG; LIU, 2008).

O espectro de FTIR dos bagaços de cana pré-tratados apresentou decréscimo da banda referente ao pico 1728 cm^{-1} em relação aos bagaços *in natura*, principalmente para H 89 e H166, o que provavelmente pode estar relacionado com a remoção da hemicelulose

provocada pelo pré-tratamento desses bagaços. A remoção de lignina é acompanhada pela redução das bandas características de anéis aromáticos a 1513 cm^{-1} (MEIRELES, 2007).

Assim, pode-se dizer que o pré-tratamento utilizado é eficiente para gerar um substrato rico em celulose, uma vez que reduz o teor de lignina e hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar. Isso pode ser melhor observado na figura 30, na qual nota-se a diminuição das bandas características da remoção de hemicelulose e lignina, além de notar a diminuição da banda 3350 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , relativas a celulose que é degradada após a hidrólise enzimática.

Figura 30. Comparação dos espectros de FTIR do híbrido H89 *in natura*, na melhor condição do pré-tratamento sulfito ácido e após a hidrólise enzimática. (--- *in natura*, --- 160 °C e --- após a hidrólise).

5.4.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

Os bagaços *in natura* e pré-tratados com sulfito ácido em diferentes temperaturas foram submetidos a uma programação de temperatura controlada para interpretação da microestrutura dos materiais.

A termogravimetria é uma técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida, em uma termobalança, e a estabilidade térmica da amostra é avaliada já que,

com o aumento da temperatura, ocorre a decomposição da amostra, com diminuição da massa inicial. A estabilidade térmica dos bagaços utilizados neste trabalho foi determinada por análise termogravimétrica e pode ser relacionada com a flexibilidade da cadeia polimérica da seguinte forma: à medida que a temperatura aumenta, as moléculas adquirem energia suficiente para romper as ligações intermoleculares. Os resultados da análise termogravimétrica dos bagaços de cana pré-tratados com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C são apresentados na figura 31.

Figura 31. Curvas de TGA dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido, em diferentes temperaturas. (● Variedade Comercial, ● Híbrido 89, ● Híbrido 146 e ● Híbrido 166).

Três estágios diferentes puderam ser identificados durante as análises de TGA. A análise termogravimétrica se refere à perda de massa. O primeiro estágio foi basicamente associado à perda de umidade, devido à desidratação, que ocorreu a uma temperatura de aproximadamente 55 °C. As reações de pirólise da amostra iniciaram-se a 120 °C. O segundo estágio começou em 200 °C e consistiu na perda de massa de hemicelulose e lignina ocorrendo principalmente entre 300 °C e 390 °C. Finalmente, o terceiro estágio

começou perto de 500 °C e foi mantida até 600 °C, que é a carbonização da amostra. A massa remanescente no final deste processo corresponde ao teor de cinzas da amostra, que é constituído basicamente por minerais (RODRIGUEZ-JASSO et al., 2011).

Para melhor comparação da estabilidade térmica entre as amostras de bagaço, os termogramas foram colocados sobrepostos, conforme mostrado na Figura 31. Os bagaços H146 e H166 retiveram menos água, por isso esta volatilizou com mais facilidade. Além disso, o bagaço H89 mostrou-se mais estável termicamente, com uma menor porcentagem de perda de massa em 300 °C e uma perda de massa mais significativa na temperatura superior (450 °C). Este resultado evidencia as diferenças obtidas nos bagaços após o pré-tratamento, como já mostrado pelas análises químicas na tabela 5, do item 5.4.1.

5.4.1.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise térmica diferencial é uma técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma mesma programação de aquecimento/resfriamento. Ao longo do programa de aquecimento, a temperatura da amostra e da referência se mantém iguais até que ocorra alguma alteração física ou química na amostra.

Se a reação for exotérmica, a amostra irá liberar calor, ficando por um curto período de tempo, com uma temperatura maior que a referência. Do mesmo modo, se a reação for endotérmica a temperatura da amostra será temporariamente menor que a referência. Mudanças na amostra, tais como a quantidade de água retida, são registradas sob a forma de picos e essas diferenças, nos bagaços pré-tratados pelo processo sulfito, podem ser atribuídas à menor quantidade de lignina e também ao maior grau de sulfonação das amostras. Ambas as características exercem influência na retenção de água pela amostra.

Os termogramas de DSC mostraram uma endotermia abaixo de 100 °C que corresponde à evaporação da água presente nas fibras. Houve ainda outra endotermia, a aproximadamente 350 °C, que pode ser atribuída à degradação da hemicelulose e celulose (Figura 32).

Figura 32. Determinação do perfil DSC dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas. (● Variedade Comercial, ● Híbrido 89, ● Híbrido 146 e ● Híbrido 166).

Em um estudo realizado com quatro diferentes variedades de cana-de-açúcar, Hoi e Martincigh (2013) obtiveram resultados bem parecidos, onde todos os componentes dos bagaços avaliados foram termicamente estáveis até uma temperatura de 200 °C. Depois disso, ocorreu a pirólise a aproximadamente 300 °C e 350 °C, correspondendo à decomposição de hemicelulose e de celulose, respectivamente. Como o ambiente, neste ensaio era o ar, pôde-se notar que duas exotermas eram aparentes nas curvas DSC, uma a 350 °C e outra entre 440 °C e 500 °C, referentes à degradação dos polissacarídeos e à oxidação da matéria volátil.

As amostras apresentaram picos endotérmicos a uma mesma temperatura, porém observa-se que o termograma do bagaço H89 *in natura* está localizado em valor inferior ao observado para os outros bagaços, sinalizando uma maior dificuldade de decomposição pelo aquecimento. Após o pré-tratamento em diferentes temperaturas o comportamento dos bagaços foi variável, especialmente porque grande parte da lignina e também da hemicelulose havia sido removida diferentemente entre as amostras.

5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM SULFITO ÁCIDO

Os substratos empregados nos estudos de hidrólise enzimática foram preparados pelo processo sulfito ácido, em diferentes temperaturas. Nesses pré-tratamentos, a remoção de hemicelulose foi alta (~ 70 %), especialmente na condição de maior temperatura. A remoção de lignina foi menor que 40 %, com valores que variaram entre 24 e 37 % (tabela 6), deixando os substratos bastante recalcitrantes.

A conversão de celulose e xilana desses substratos foram avaliadas empregando celulasas comerciais complementadas com β -glicosidases (tabela 2) e os ensaios foram realizados em três cargas enzimáticas:

- baixa: 5 FPU de celulase e 10 UI de β -glicosidases por grama de substrato;
- média: 10 FPU de celulase e 20 UI de β -glicosidases por grama de substrato;
- alta: 20 FPU de celulase e 40 UI de β -glicosidases por grama de substrato.

5.5.1. Efeito da temperatura de pré-tratamento na hidrólise enzimática da celulose dos bagaços de cana

O estudo do efeito do pré-tratamento do bagaço na conversão de celulose e hemicelulose foi realizado tomando como base a menor carga de enzima. A figura 33 (Tabela B.1) apresenta a conversão de celulose dos bagaços pré-tratados a 130 °C, 150 °C e 160 °C.

A análise da conversão de celulose dos bagaços pré-tratado a 130 °C mostrou valores baixos e semelhantes, independente da composição inicial do bagaço.

Os dados de hidrólise dos bagaços pré-tratados a 150 °C mostraram porcentagens de conversão ligeiramente superiores aos obtidos a 130 °C. Exemplo disso pode ser visualizado nos resultados de hidrólise da VC, que aumentou 1,7 vezes no bagaço pré-

tratado a 150 °C e 2,5 vezes, quando se utilizou o bagaço pré-tratado a 160 °C. Esse aumento na eficiência de sacarificação pode ser explicado pela maior remoção de hemicelulose e lignina dos bagaços.

De uma maneira geral, o aumento da temperatura do pré-tratamento favoreceu a conversão enzimática da celulose nos bagaços. Na temperatura de 160 °C, obtiveram-se os maiores valores de conversão para a variedade comercial (VC), híbrido 89 e híbrido 146. Para o híbrido 166, a máxima conversão de celulose foi obtida no bagaço pré-tratado na temperatura de 150 °C.

Outro fator importante neste estudo é a comparação das velocidades iniciais de hidrólise, calculada pelo valor de conversão exibido nas primeiras seis horas de reação enzimática. A velocidade inicial de hidrólise da celulose para a variedade comercial de bagaço foi menor que a dos híbridos dos bagaços pré-tratados a 130 e 150 °C (tabela B.3). Todos os bagaços pré-tratados a temperatura mais alta (160 °C) apresentaram uma taxa inicial de hidrólise similar, mas a partir de 12 h de reação a conversão da celulose de cada bagaço progrediu com velocidades diferentes, conforme mostrado na figura 32. A máxima conversão de celulose obtida pelas variedades comercial e H146 foi influenciada pela maior remoção de xilana (Figura 33).

A conversão enzimática de xilana variou com a composição inicial do bagaço e com a condição do pré-tratamento. A mistura de enzimas empregadas na reação de hidrólise dos bagaços produziu uma maior conversão de xilana do que de celulose. Esse resultado pode ser atribuído às altas atividades de xilanases e β -xilosidases no preparado enzimático e, possivelmente, à maior acessibilidade à xilana que à celulose.

A velocidade inicial de hidrólise da hemicelulose foi baixa para os bagaços pré-tratados a 130 °C, entretanto observou-se um aumento acentuado nas taxas de conversão dos bagaços que foram pré-tratados em temperaturas mais altas. Considerando o bagaço pré-tratado a 160 °C, a conversão enzimática da hemicelulose alcançou 70 %, antes de 24 h de hidrólise (Figura 34).

A conversão enzimática da hemicelulose da variedade comercial e do híbrido 146 atingiu 100 %, para os bagaços pré-tratados na maior temperatura. As hemiceluloses dos bagaços H89 e H166 também foram, em grande parte, hidrolisadas pelo preparado enzimático comercial, alcançando 77 % de conversão, para 150 °C e 160 °C.

Figura 33. Conversão enzimática da celulose dos bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas, na menor carga enzimática.

Figura 34. Conversão enzimática da hemicelulose dos bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas na menor carga enzimática.

5.5.2. Efeito da carga enzimática na hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana

O efeito da concentração de enzima na hidrólise dos bagaços pré-tratados foi avaliado em intervalos de tempo pré-definidos, no intuito de determinar se haveria um aumento na conversão da celulose (Figura 34). Observa-se que a velocidade inicial de hidrólise foi maior, quando se empregou uma maior carga enzimática (Tabela B.3) e essa tendência se manteve durante toda a reação. Entretanto, os aumentos na conversão da celulose não foram proporcionais à carga enzimática empregada, para todos os bagaços pré-tratados em diferentes temperaturas.

Quando se analisa a conversão enzimática da celulose na menor temperatura (Figura 34-A), pode-se observar melhor o efeito do aumento da carga enzimática. A VC pré-tratada a 130 °C mostrou um aumento de 73 % na conversão da celulose, quando se utilizou a maior carga enzimática. Para os bagaços processados a 150 °C e 160 °C, o aumento da conversão enzimática foi de 10 % e 4,4 %, respectivamente. Esse resultado mostra que no substrato mais recalcitrante, uma maior carga de enzima melhora a eficiência de conversão da celulose, pois aumenta a probabilidade que essas enzimas se adsorvam à celulose e promovam a sua hidrólise. No material pré-tratado, como a acessibilidade é maior, o substrato se modifica rapidamente e outros fatores, como a proporção dos componentes da mistura enzimática, podem ter mais efeito nos níveis de conversão, do que o simples aumento da carga enzimática.

A velocidade inicial de hidrólise da celulose da VC pré-tratada a 130 °C aumenta com a carga enzimática e dobra na carga mais alta, passando de 2,3 (%/h) para 4,9 (%/h) (Tabela B.3).

A análise dos gráficos referentes à hidrólise enzimática do bagaço H89 evidenciou um aumento na hidrólise da celulose, principalmente relacionado com a temperatura de processamento (Figura 34-B). Comparando primeiramente os valores da velocidade inicial (V_o) (Tabela B.3) observa-se que o aumento da carga enzimática não influenciou muito esse parâmetro, mostrando uma maior relevância quando se utiliza o bagaço pré-tratado na maior temperatura. Nessa condição, quadruplicando-se a carga enzimática a V_o passou de 3,28 (%/h) para 4,96 (%/h).

Figura 35. Conversão enzimática da celulose dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido nas temperaturas de 130 °C, 150 °C e 160 °C durante a hidrólise enzimática com carga alta (curva em vermelho), carga média (curva em verde) e carga baixa (curva em azul) da mistura de celulases comerciais. A: VC; B: H89; C: H146 e D: H166.

A variação na carga enzimática praticamente não mudou os patamares de hidrólise enzimática, quando se analisa uma mesma temperatura de pré-tratamento. O aumento da CEC foi notável quando se comparou os resultados da hidrólise dos bagaços pré-tratados a 130 °C e 150 °C. Variando a carga enzimática obteve-se um aumento de 76,61 %, 76,44 % e 84,11 %; utilizando a menor, a média e a maior carga enzimática, respectivamente. Esse resultado reforça o que já havia sido mostrado para a VC, ou seja, substratos insolúveis e, em especial, substratos lignocelulósicos que passam por um pré-tratamento para remover efetivamente a lignina e hemicelulose não apresentam um aumento da conversão enzimática proporcional à carga enzimática.

O aumento da temperatura de pré-tratamento do H146 favoreceu a hidrólise da celulose que atingiu 72 % na menor carga enzimática testada. A variação de carga não foi muito significativa. Os maiores valores de CEC da H146, aproximadamente 60 %, são atingidos antes de 48 h, na maior temperatura, em todas as cargas enzimáticas testadas.

Diferentemente das outras variedades avaliadas, a hidrólise enzimática da celulose do bagaço H166 atingiu seus maiores valores para o pré-tratamento a 150 °C, nas três cargas enzimáticas testadas. Elevando-se a temperatura do pré-tratamento de 130 °C para 150 °C, houve um aumento de 121 %; 142 % e 106 %, para a menor, média e maior carga enzimática utilizada no trabalho, respectivamente.

Considerando a conversão de celulose dos bagaços processadas a 160 °C, observa-se que para se atingir o valor de 50 %, foram necessárias 50 h para as VC e H89, 35 h para o H146 e 72 h para o H166, quando se utilizou a menor carga enzimática. Com a maior carga enzimática os tempos para obter 50 % de conversão da celulose diminuíram para 23 h, 18 h, 18 h e 44 h para a VC, H89, H146 e H166, respectivamente.

A figura 35 mostra os resultados da hidrólise enzimática da celulose após 48 h de reação, com dados extraídos dos gráficos de hidrólise dos bagaços pré-tratados a 160 °C, mostrados na figura anterior. Nesta figura fica evidente o pequeno ganho na conversão da celulose obtido pelo aumento da carga enzimática.

Figura 36. Conversão da celulose dos bagaços de cana pré-tratados com sulfito ácido a 160 °C, em função da carga enzimática, em 48 h de reação.

5.5.3. Efeito da carga enzimática na hidrólise enzimática da hemicelulose do bagaço de cana

A conversão enzimática da hemicelulose (CEH) da variedade comercial e do híbrido 146 pré-tratados a 160 °C atingiu 100 % em 48 h de reação, independente da carga enzimática testada (figura 36 A). Considerando a obtenção de uma conversão de 70 % , o tempo de reação enzimática pode ser reduzido para menos de 12h.

Para o bagaço H89, a conversão enzimática da hemicelulose do bagaço pré-tratado a 150 °C foi de 75 %, nas três cargas enzimáticas testadas. Quando se utilizou o bagaço pré-tratado a 160 °C, a conversão da celulose foi de 80 %, para as cargas média e alta. Porém, esse valor pode ser atingido em 48h, quando se trabalha com a maior carga enzimática.

Figura 37. Conversão enzimática da hemicelulose dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido nas temperaturas de 130 °C, 150 °C e 160 °C durante a hidrólise enzimática com carga alta (curva em vermelho), carga média (curva em verde) e carga baixa (curva em azul) da mistura de celulases comerciais. A: VC; B: H89; C: H146 e D: H166.

O valor máximo de conversão enzimática da hemicelulose do híbrido H166 foi de 85 %, quando se trabalhou com a maior carga enzimática para o material pré-tratado a 150 °C.

Os dados acima apresentados ratificam que um dos papéis mais importante de um pré-tratamento é ampliar a área de acesso das celulasas à celulose, para que o rendimento de glicose seja maior ao final da hidrólise enzimática (ROLLIN et al., 2011). De acordo com os autores citados, altos níveis de deslignificação, sem um aumento significativo da acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose, não permitem altas conversões dos materiais lignocelulósicos.

Considerando que os maiores valores de CEC também se deram quando houve os maiores valores de CEH, pode-se afirmar que dentre os fatores já mencionados, a presença de hemicelulose na biomassa significa um entrave à hidrólise enzimática da celulose (HIMMEL et al., 2007). A presença de lignina também foi problemática. Estudos mostraram que após a deslignificação de lignocelulósicos com clorito de sódio, a taxa de conversão enzimática da celulose aumentou, promovendo maiores rendimentos de monossacarídeos (YOSHIDA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2011). Desses resultados é possível inferir que, a deslignificação diminuiu a recalcitrância do substrato e aumentou a acessibilidade das enzimas, provavelmente, devido ao aumento da porosidade do material lignocelulósico. Além disso, com a adição de hemicelulasas, observou-se aumento na hidrólise enzimática da celulose, indicando que a hemicelulose impede o acesso das celulasas, mesmo após a deslignificação (YOSHIDA et al., 2008).

Öhgren et al. (2007), adicionaram celulasas e xilanases aos materiais lignocelulósicos pré-tratados termicamente, sob diferentes temperaturas (170 °C e 190°C), tempos de cozimento (9 min e 5 min) e com ou sem adição de SO₂. De acordo com os resultados reportados, os rendimentos de glicose e xilose aumentaram, para todos os pré-tratamentos, quando foram adicionadas xilanases ao coquetel enzimático. Nas condições ótimas de pré-tratamento; 190 °C, 5 min e 3 % de SO₂; as conversões de glicose e xilose aumentaram de 88 para 100 % e de 73 para 93%, respectivamente. Logo, pode-se concluir que a suplementação com xilanases, na etapa de sacarificação enzimática da biomassa, possibilita a hidrólise da hemicelulose residual na amostra que, por conseguinte, favorece o acesso das celulasas às fibras de celulose (ÖHGREN et al., 2007).

A partir dos resultados de hidrólise enzimática obtidos neste trabalho pode-se verificar o efeito marcante da severidade do pré-tratamento neste parâmetro. A tabela 9 mostra os valores dos fatores de severidade (CFS), bem como os valores de pH do hidrolisado, após o pré-tratamento. Uma vez que CFS depende da temperatura, do tempo e do pH do processo, este fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis em um dado tratamento. Analisando as frações solubilizadas, após as condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, observa-se que quanto maior a temperatura, maior é o fator de severidade do pré-tratamento e maior é a quantidade de hemicelulose e lignina removida.

A tabela 9 mostra que o fator de severidade aumentou acentuadamente comparando o bagaço pré-tratado a 130 °C e a 150 °C, e praticamente não mais se altera quando a temperatura do pré-tratamento foi de 160 °C.

Tabela 9. Cálculo do fator de severidade (CSF) do pré-tratamento em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Ph				CSF			
	VC	H89	H146	H166	VC	H89	H146	H166
130	2,16	2,22	2,24	2,05	0,80	0,75	0,72	0,91
150	1,73	1,76	1,72	1,66	1,82	1,79	1,83	1,89
160	1,93	1,94	1,91	1,97	1,92	1,91	1,94	1,88

Esse fator quando relacionado à perda de hemicelulose mostra que os bagaços H89 e H166 são modificados em condições mais brandas de pré-tratamento, se comparados aos bagaços VC e H146 (Figura 37).

Os resultados de hidrólise enzimática reportados neste trabalho, mostraram que a taxa e a extensão da sacarificação da celulose são influenciadas por propriedades físicas e/ou químicas dos substratos. Estas podem estar relacionadas com a própria fibrila elementar de celulose, como a cristalinidade e o grau de polimerização, ou com a biomassa como um todo, como o conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose, tamanho de partícula e tamanho e distribuição de poros. Todavia, nenhum destes fatores sozinho poderia explicar o declínio gradual na taxa de hidrólise após uma rápida conversão inicial (LAURITO-FRIEND, 2013).

Figura 38. Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana a 160 °C, relação entre o fator de severidade e a remoção de hemicelulose.

Zhu et al. (2007) avaliaram o efeito de características estruturais da biomassa, como o conteúdo de grupos acetil, a presença de lignina e a cristalinidade da celulose e notaram que os dois últimos efeitos foram os que tiveram maiores efeitos negativos na digestibilidade enzimática. Avaliando-se apenas a remoção de lignina (55 %), o autor e seus colaboradores observaram que, independente do conteúdo de grupos acetil e da cristalinidade das amostras de madeira (poplar), cerca de 90 % de conversão foram atingidos após 72 horas de hidrólise, aplicando uma carga relativamente baixa de celulasas (5 FPU/g de biomassa seca). Contudo, em amostras com menor cristalinidade, porém em condições de alto teor de lignina e grupo acetil, constatou-se que boas conversões eram obtidas ainda nas primeiras 6 h de reação, aproximadamente 60 %. Esses autores usaram nesse estudo o pré-tratamento sulfito ácido, mas alcançaram resultados de hidrólise enzimática mais altos que os nossos, porque empregaram uma carga de sulfito mais alta (9 %) e temperatura também mais altas 190 (°C). Portanto, pode-se concluir que a redução no teor de lignina foi mais positiva para a hidrólise, devido à menor recalcitrância do substrato.

5.5.4. Ensaios de adsorção enzimática nas fibras dos bagaços pré-tratados com sulfito ácido em diferentes temperaturas

Embora a massa de proteínas solúveis possa ser determinada por vários métodos, muitos deles não podem ser aplicados para a medida de proteínas adsorvida em partículas, especialmente para biomassa pré-tratada contendo hemicelulose e lignina, devido à interferência desses componentes. O método da ninidrina analisa aminoácidos livres após a hidrólise alcalina das proteínas adsorvidas a um material sólido, e neste trabalho foi utilizada para determinação de proteínas adsorvidas nos bagaços de cana *in natura* e após o pré-tratamento em diferentes temperaturas.

A adsorção das enzimas Cellubrix e Novozym foi feita em Avicel ou bagaço de cana-de-açúcar. A concentração final de proteínas utilizada foi de 0,15 mg/mL para o bagaço e 0,35 mg/mL para o Avicel. Essa diferença na concentração de proteínas em cada substrato deveu-se a instabilidade da reação de ninidrina quando se utiliza maiores concentrações de bagaço.

A mistura de enzimas Cellubrix e Novozym contém uma alta atividade de β -glicosidase e por consequência sua determinação contribui no valor final das proteínas, os resultados reportados referem-se à adsorção de celulasas, tendo em vista a ausência do domínio de ligação a carboidrato (CBD) na estrutura das β -glicosidasas. O total de celulase na hidrólise enzimática inclui celulase livre, reversivelmente ligada e adsorvida. O total de celulase irreversivelmente ligada pode ser determinado pela diferença do obtido na adsorção em Avicel e no substrato lignocelulósico. Os dados referentes à adsorção enzimática medidos pelo método da ninidrina estão apresentados na figura 38.

A porcentagem de adsorção enzimática a 4 °C para os bagaços pré-tratados foi menor que 27 %, porém para o Avicel, essa porcentagem correspondeu a 43 %. Esse resultado mostra que mais enzima foi ligada ao Avicel do que aos bagaços pré-tratados.

Não foi possível estabelecer um padrão de adsorção enzimática, exceto para o híbrido 146, no qual se observa um perfil de diminuição da adsorção enzimática à medida que se aumenta a temperatura do pré-tratamento. A diminuição da adsorção pode ser atribuída à remoção de hemicelulose e lignina, que foi gradual e progressiva para o H146.

Öhgren et al. (2007) deslignificaram parcialmente materiais pré-tratados e observaram melhorias nos rendimentos dos açúcares, visto que na condição ótima, as conversões de glicose e xilose aumentaram. Portanto, pode-se concluir que devido ao menor teor de lignina, provavelmente, a adsorção improdutiva entre as celulasas e a lignina foi reduzida, contribuindo para o aumento na conversão de açúcares. A natureza da lignina pode ter uma influência significativa na adsorção de enzimas, tornando difícil a comparação de diferentes estudos. Porém, deve-se realizar estudos de adsorção usando ligninas isoladas, por ser impossível distinguir a adsorção à cada fração em um substrato tão heterogêneo, quanto os materiais lignocelulósicos (PALONEN et al., 2004).

Há que se ressaltar que a adsorção enzimática durante a hidrólise na temperatura de 50 °C, pode ser diferente da apresentada a 4 °C. Uma sugestão para verificar essa observação, seria realizar os ensaios durante a hidrólise enzimática (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012), retirando-se os tubos em tempos pré-definidos e realizando nestes os dois testes, ninidrina e Bradford. Dessa maneira, ter-se-ia um melhor entendimento da adsorção enzimática, durante a sacarificação.

Figura 39. Perfil da adsorção enzimática nos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas, medido pelo teste da ninidrina.

Quando se compara os resultados obtidos com o teste de ninidrina (bagaços) e o teste de Bradford (águas de lavagens), pode-se notar que quantidade de proteína livre nas águas de lavagens é muito alta (Figura 36), corroborando os resultados obtidos com o teste de ninidrina. Há que se ressaltar que o teste de Bradford sofre influência, quando na presença de grupamentos fenólicos, superestimando a quantidade de proteína encontrada. Por isso, os valores obtidos na figura 36, se somados, passam de 100 %. Já o teste de ninidrina não sofre influência da presença de compostos fenólicos, podendo ser utilizado na quantificação das proteínas adsorvidas nas fibras pré-tratadas de materiais lignocelulósicos (ZHU; SATHITSUKSANO; ZHANG, 2009).

Figura 40. Perfil da porcentagem de enzima livre nas águas de lavagem dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas, medida pelo teste de Bradford. (■ 1ª lavagem; ■ 2ª lavagem e ■ 3ª lavagem).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou a mistura de celulasas comerciais derivadas dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado variando a carga de sulfito e a temperatura do pré-tratamento.

A caracterização química dos bagaços de cana de açúcar mostrou diferenças nos conteúdos de lignina e hemicelulose, que influenciaram a etapa de pré-tratamento. Os bagaços pré-tratados com ácido sulfúrico diluído a 121 °C mostraram-se mais eficientes na remoção de hemicelulose que os tratamentos com sulfito ácido, em diferentes concentrações.

A variável temperatura, utilizada durante o pré-tratamento, influenciou na composição da fração sólida do bagaço pré-tratado. De uma maneira geral, o rendimento do processo diminui com o aumento da temperatura. Porém não se pode estabelecer um padrão de remoção para todos os componentes. A remoção de hemicelulose é gradativa e aumenta com o aumento da temperatura do pré-tratamento, ultrapassando 70 %, para todos os bagaços avaliados. A remoção de lignina também aumenta, com o aumento da temperatura.

Os melhores resultados do pré-tratamento sulfito ácido foram obtidos quando o processo foi conduzido a uma temperatura de 160 °C durante 120 minutos, com uma concentração de sulfito de 5 %.

O pré-tratamento altera a estrutura morfológica dos bagaços, desorganizando-a colapsando o material, além da exposição, separação e inchamento das fibras.

Não foi possível estabelecer um padrão para conteúdo de grupos sulfônicos nos bagaços pré-tratados, porém o menor grau de sulfonação foi obtido para os bagaços com menos lignina residual, devido à solubilização deste componente, quando sulfonada.

Os valores de retenção de água diminuíram com o aumento da temperatura, para todos os bagaços testados, fato já esperado, uma vez que o aumento da temperatura é responsável pelo aumento da remoção da hemicelulose, diminuindo a quantidade de hidroxilas que estaria acessível para a absorção de moléculas de água.

Avaliando os resultados do índice de cristalinidade dos bagaços *in natura* é possível afirmar que a variedade comercial de bagaço possui uma estrutura mais cristalina que os híbridos e, conseqüentemente, apresentam uma diminuição de cristalinidade menos expressivas após os tratamentos. As medidas de cristalinidade foram importantes para confirmar que parte da celulose cristalina tornou-se amorfa após o pré-tratamento.

Considerando a temperatura do pré-tratamento, o índice de cristalinidade corrigido (IC_{corr}) dos bagaços aumentou, por remover lignina, hemicelulose e a celulose amorfa, preservando a porção cristalina da celulose em todos os bagaços analisados.

As análises de FTIR mostram mudanças entre o espectro dos bagaços de cana *in natura* e os espectros dos bagaços pré-tratados, principalmente na diminuição das bandas de absorção referentes à hemicelulose e à lignina.

O preparado enzimático de *Trichoderma reesei* apresentou uma alta atividade de celulasas e xilanases e mostrou-se importante para aumentar o rendimento de hidrólise dos polissacarídeos do bagaço de cana, uma vez que a presença da hemicelulose oferece resistência à hidrólise da celulose.

A hidrólise enzimática foi maior para os bagaços pré-tratados a 121 °C com ácido sulfúrico diluído, sugerindo que a remoção da hemicelulose deve ser considerada como fator determinante para o aumento da sacarificação dos bagaços.

Na temperatura de 160 °C, houve os maiores valores de conversão para os bagaços da Variedade comercial (VC), híbrido 89 (H89) e híbrido 146 (H146). Já para o híbrido 166 (H166), o maior valor de conversão se deu na temperatura de 150 °C, tanto para a celulose, quanto para a hemicelulose.

O efeito da concentração de enzima na hidrólise dos bagaços pré-tratados não foi proporcional à conversão da celulose. A melhora da conversão enzimática foi mais evidente, quando se aumentou a carga da enzima para a menor temperatura do pré-tratamento.

A adsorção de proteínas da mistura enzimática no Avicel foi maior que nos bagaços pré-tratados, sugerindo que o pré-tratamento sulfito ácido não apresentou uma influência significativa na adsorção improdutiva das celulasas.

REFERÊNCIAS

ABIDI, N.; CABRALES, L.; HAIGLER, C. H. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 9–16, 2014.

ADLER, E. Lignin - past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169–218, 1977.

ALÉN, R. Basic chemistry of wood delignification. In STENIUS, P. (Editor). **Forest products chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000. p. 59.

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.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.

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.

BEATSON, R. P. **Methods in lignin chemistry**. Heidelberg: S.Y. Lin, C.W. Dence, 1992. p. 473–483.

BECKHAM, G. T.; BOMBLE, Y. J.; BAYER, E. A.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 231–238, 2011.

BECKHAM, G. T.; MATTHEWS, J. F.; BOMBLE, Y. J.; BU, L.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; NIMLOS, M. R.; CROWLEY, M. F. Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 1447–1453, 2010.

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, 2005a.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 175–184, 2005b.

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

BEUKES, N.; CHAN, H.; DOI, R. H.; PLETSCHE, B. I. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 492–498, 2008.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.

BIELY, P. Microbial xylanolytic enzymes. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286–290, 1985.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

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.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291–1296, 2002.

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

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

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 67–93, 2007.

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

CHERNOGLAZOV, V.M.; ERMOLOVA, O.V.; KLYOSOV, A.A. Adsorption of high-purity endo-1,4-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 503–507, 1988.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, n. 2, p. 121–145, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2012. In: CANA DE AÇÚCAR - 2º Levantamento da Safra – 2012/2013 – Agosto/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf>. Acesso em: 16 junho 2013.

D’ALMEIDA, M. L. O. Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica. 2 ed. São Paulo: IPT-SENAI, 1981.

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.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 04 maio 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html> Acesso em 25 julho 2013.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism on surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353–64, 2002.

FARDIM, P.; DURÁN, N. Modification on fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 223, p. 263–276, 2003.

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

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.

FUENTES, L. L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade Engenharia Química, Campinas–SP, 2009.

GAO, D.; SHISHIR, P. S. C.; UPPUGUNDLA, N.; BALAN, V.; DALE, B. E. Binding Characteristics of *Trichoderma reesei* Cellulases on Untreated, Ammonia Fiber Expansion (AFEX), and Dilute-Acid Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n.8, p. 1788–1800, 2011.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 57, p. 191–202, 1999.

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.

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

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

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.

GURGEL, L. V. A.; MARABEZEI, K.; ZANBOM, M. D.; CURVELO, A. A. S. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at high temperatures: a kinetic study of cellulose saccharification and glucose decomposition. Part I: Sulfuric Acid as the Catalyst. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 1173–1185, 2012.

HAN, Y.; CHEN, H. Synergism between corn stover protein and cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 638–645, 2007.

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

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.; 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.

HOI, L.W.S.; MARTINCIGH, B. S. Sugar cane plant fibres: separation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 1–12, 2013.

HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v. 12, p. 837–849, 2002.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, p. 79–83, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL. Pesquisas. Disponível em: <<http://www.inctdobioetanol.com.br/pesquisa.php>>. Acesso em 05 maio 2011.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163–176, 1990.

KRISTENSEN, J .B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Determining Yields in High Solids Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, p. 557–562, 2009.

JACKSON, P. A. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research**, v. 92, p. 277–290, 2005.

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.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 42–48, 2005.

JU, X.; ENGELHARD, M.; ZHANG, X. An advanced understanding of the specific effects of xylan and surface lignin contents on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 137–145, 2013.

KANG, Y.; BANSAL, P.; REALFF, M. J.; BOMMARIUS, A. S. Accessibility, and crystallinity of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 909–916, 2013.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p.153–156, 2004.

KOKTA, B.V. Steam explosion pulping of aspen. **Drevarsky Vyskum**, p. 23–39, 1990.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of Lignocelluloses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 11 pp., 2009.

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

KUMAR, 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, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAND, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3948–3962, 2009.

KUO, C-H.; LEE, C-K. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 41–46, 2009.

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.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367–380, 2002.

LENGOWSKI, E. C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Curitiba–PR, 2012.

LINDER, M.; MATTINEN, M.; KONTTELI, M.; LINDEBERG, G.; STÅHLBERG, J.; DRAKENBERG, T.; REINIKAINEN, T.; PETTERSSON, G.; ANNILA, A. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Protein Science**, v. 4, p. 1056–1064, 1995.

LOH, Y. R.; SUJAN, D.; RAHMAN, M. E.; DAS, C. A. Sugarcane bagasse – The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14–22, 2013.

LÓPEZ-ARENAS, T.; RATHI, P.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, E.; SALES-CRUZ, M. Factors affecting the acid pretreatment of lignocellulosic biomass: Batch and continuous process. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON COMPUTER AIDED PROCESS ENGINEERING – ESCAPE, 2010, Ischia-Nápoles, Itália. p. 979–984.

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.

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 Routes to cellulosic ethanol. BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. (Ed.) New York: Springer, 2011. p.199–239.

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

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 40–46, 2009.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426–432, 2007.

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

MASARIN F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, 10 pp., 2011.

MEDVE, J. **Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanases II.** Tese (Doutorado) – Lund University, Departament of Biochemistry, Lund–Sweden, 1997.

MEIRELES, C. S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartados.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia–MG, 2007.

MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena–SP, 2010.

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.

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. E.; DALE, B. D.; ELANDER, R. T.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, C. M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: 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.

MUSSATTO, 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.; KADLA, J. F.; SADDLER, J. N. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4507–4517, 2011b.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, p. 871–879, 2010.

NISHIKAWA, S. On the spectrum of X-rays obtained by means of lamellar or fibrous substances. **Proceedings Mathematical Physical Society Tokyo**, v. 7, p. 296–298, 2000.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503–2510, 2007.

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.; POONAM, N.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, 10 pp., 2010.

PERSSON, T.; REN, J. L.; JOELSSON, E.; JÖNSSON, A. -S. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3906–3913, 2009.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba–SP, 2008.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba–PR, 2007.

PRIBOWO, A.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 195–203, 2012.

PU, Y.; HU, F.; C.; 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. 1–15, 2013.

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

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 139–150, 2009.

RAHIKAINEN, J. L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O. J.; KRUUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 270–278, 2013.

RAHIKAINEN, J.; LAPPAS, A.; MIKANDER, S.; VIKARI, L.; MARJAMAA, K.; KRUUS, K. TAMMINEN, T. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood—study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, p. 2823–34, 2011.

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

RFA – Renewable Fuels Association, 2011. Statistics: world fuel ethanol production. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>. Acesso em: 29 maio 2013.

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de Bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química, Campinas–SP, 2007.

RODRIGUES, R. C. L. B.; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES, D. JR.; FILHO, H. J. I.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA, A. JR. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1247–1253, 2010.

RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; MUSSATTO, S. I.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1137–1144, 2011.

ROLLIN, J. A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y. H. P. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 1, v. 108, p. 22–30, 2011.

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química, Campinas–SP, 2010.

RYU, K.; KIM, Y. Adsorption of a xylanase purified from Pulpzyme HC onto alkali-lignin and crystalline cellulose. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 10, p. 987–990, 1998.

SANTI JUNIOR, C. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem**. Dissertação (Mestrado). – Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena–SP, 2011.

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

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

SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 517–523, 1995.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786–794, 1962.

SCHELL, D. J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilute–Sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 79–85, 2003.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena–SP, 2009.

SINSABAUGH, R. L.; LIPTAK, M. A. Enzymatic conversion of plant biomass. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. **The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 347–357. (Environmental and Microbial Relationships, IV).

SIQUEIRA, G. A. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena–SP, 2011.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 9, 2011.

SHUAI, L.; YANG, Q.; ZHU, J. Y.; LU, F. C.; WEIMER, P. J.; RALPH, J.; PAN, X. J. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3106–3114, 2010.

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

SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, A. D.; TEMPLETON, D. W. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9043–9053, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; LEITÃO-FERREIRA, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. T. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. Nova Iorque: Jonh Wiley, 1996.

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

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

TABKA, M. G.; HERPÖEL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase 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 a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689–692, 1987.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A.; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p. 177–183, 1981.

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.

VÁRNAI, A.; VIKARI, L.; MARJAMAA, K.; SIIKA-AHO, M. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1220–1227, 2011.

VICENTIN, M. P.; FERRAZ, A. Alkaline-sulfite chemithermomechanical pulping of *Eucalyptus grandis* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora* under varied culture conditions. **Holzforschung** (Berlin), v. 62, p. 375–382, 2008.

WANG, G. S.; PAN, X. J.; ZHU, J. Y.; GLEISNER, R. L. 2008. **Sulfite pretreatment for biorefining biomass**. US Patent 61/047024. Filed by Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF). Utility Conversion 17.abr.2009.

WANG, L.; ZHANG, Y.; GAO, P.; SHI, D.; LIU, H.; GAO, H. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 443–456, 2006.

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.

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

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 2, p. 26–40, 2008.

YANG, B.; WYMAN, C. E.; BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 611–617, 2006.

YOSHIDA, M; LIU, Y.; UCHIDA, S.; KAWARADA, K.; UKAGAMI, Y.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; FUKUDA, K. Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to Monosaccharides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, n. 3, v. 72, p. 805–810, 2008.

YU, Y.; WU, H. W. Significant differences in the hydrolysis behavior of amorphous and crystalline portions within microcrystalline cellulose in hot-compressed water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 3902–3909, 2010.

ZHANG, M.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1407–1414, 2009.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.950-956, 2008.

ZHAO, Y.; LU, W-J.; WANG, H-T. Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p. 411–417, 2009.

ZHOU, J.; WANG, Y-H.; CHU, J.; LUO, L-Z.; ZHUANG, Y-P.; ZHANG, S-L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 819–825, 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.

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

ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y., -H, P. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. **Analyst**, v. 134, p. 2267–2272, 2009.

ZHU, L.; O'DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817–3828, 2007.

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO

Tabela A.1. Valores médios dos Grupos sulfônicos e da Retenção de Água das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C.

Amostras	Temperatura (°C)	Retenção de água (%)	Grupos Sulfônicos	
			/g de bagaço	/g de lignina
VC	130	161,93 ± 1,51	50,89 ± 1,55	201,07 ± 6,13
	150	148,47 ± 3,13	16,05 ± 4,00	68,26 ± 17,02
	160	131,06 ± 1,29	20,05 ± 0,00	92,94 ± 0,01
H89	130	228,00 ± 5,00	27,82 ± 5,94	139,85 ± 29,88
	150	182,17 ± 3,56	8,06 ± 0,00	44,29 ± 0,01
	160	167,03 ± 3,04	26,05 ± 2,00	136,60 ± 10,50
H146	130	241,07 ± 4,83	15,16 ± 1,70	69,46 ± 7,78
	150	215,88 ± 7,99	18,66 ± 2,07	90,41 ± 10,03
	160	164,47 ± 1,56	22,32 ± 0,03	106,70 ± 0,16
H166	130	201,73 ± 2,87	24,40 ± 6,55	103,67 ± 27,82
	150	181,19 ± 4,51	15,51 ± 0,00	73,63 ± 0,00
	160	177,64 ± 1,94	17,70 ± 0,00	83,00 ± 0,02

Tabela A.2. Índice de cristalinidade das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C.

Condições/ Bagaços	VC					H89					H146					H166				
	I ₀₀₂	I _{am}	IC	R (%)	IC _{corr}	I ₀₀₂	I _{am}	IC	R (%)	IC _{corr}	I ₀₀₂	I _{am}	IC	R (%)	IC _{corr}	I ₀₀₂	I _{am}	IC	R (%)	IC _{corr}
<i>in natura</i>	269	111	58,74	100,00	58,74	252	152	39,68	100,00	39,68	191	121	36,65	100,00	36,65	256	119	53,52	100,00	53,52
130 °C	163	84	48,47	73,18	35,47	91	75	17,58	85,35	15,01	86	47	45,35	78,02	35,38	218	143	34,40	87,11	29,97
150 °C	310	154	50,32	78,09	39,30	272	138	49,26	65,66	32,35	120	80	33,33	82,21	27,40	111	60	45,95	79,07	36,33
160 °C	366	149	59,29	70,65	41,89	200	85	57,50	65,03	37,39	189	89	52,91	64,93	34,35	192	63	67,19	71,32	47,92
Após HE	559	245	56,17	-	-	529	293	44,61	-	-	347	276	20,46	-	-	434	254	41,47	-	-

I₀₀₂: Intensidade do pico referente a fase cristalina (plano 002), I_{am}: Intensidade do pico referente a fase amorfa; IC: Índice de cristalinidade; R: Rendimento; IC_{corr}: Índice de cristalinidade corrigido.

APÊNDICE B – HIDROLISE ENZIMÁTICA DOS BAGAÇOS

Tabela B.1. Valores médios da conversão da celulose das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C, em três cargas enzimáticas distintas (FPU de Cellubrix/UI de Novozym).

		130 °C			150 °C			160 °C		
		Carga enzimática (FPU/UI:g)								
Variedade Comercial	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	13,99 ± 0,39	17,72 ± 1,48	29,13 ± 5,22	20,37 ± 0,54	22,93 ± 1,11	24,77 ± 0,44	21,93 ± 0,13	24,32 ± 0,53	30,48 ± 0,00
	12	18,26 ± 0,22	19,99 ± 0,02	34,28 ± 2,12	25,14 ± 0,06	26,28 ± 0,66	28,14 ± 0,02	31,32 ± 0,17	32,38 ± 0,21	40,75 ± 0,10
	24	22,57 ± 0,19	19,94 ± 1,27	35,00 ± 1,93	29,72 ± 0,11	33,56 ± 1,14	37,36 ± 1,02	42,70 ± 1,04	43,39 ± 1,04	51,02 ± 0,05
	48	22,65 ± 0,89	23,30 ± 0,52	37,87 ± 2,74	32,19 ± 2,32	38,80 ± 0,41	46,63 ± 0,03	50,98 ± 1,29	50,36 ± 0,55	60,11 ± 1,40
	72	23,84 ± 0,09	28,56 ± 0,76	41,22 ± 0,75	40,29 ± 1,46	40,25 ± 0,31	44,41 ± 0,22	59,67 ± 0,74	56,40 ± 1,90	62,27 ± 0,82
		Carga enzimática (FPU/UI:g)								
H89	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	19,80 ± 0,34	21,11 ± 2,09	28,72 ± 1,46	25,58 ± 0,12	24,11 ± 0,32	27,66 ± 1,15	19,69 ± 0,26	24,50 ± 0,30	29,76 ± 0,25
	12	22,07 ± 4,01	26,41 ± 1,39	33,07 ± 4,18	31,52 ± 1,08	31,03 ± 0,19	31,59 ± 0,70	31,29 ± 0,37	35,55 ± 0,35	39,22 ± 1,24
	24	25,79 ± 0,90	29,07 ± 0,22	36,56 ± 0,93	47,24 ± 0,62	35,76 ± 0,22	38,87 ± 1,54	43,43 ± 0,41	46,79 ± 1,29	53,45 ± 1,44
	48	29,73 ± 0,74	30,54 ± 0,13	30,81 ± 0,34	44,36 ± 0,50	41,77 ± 0,90	45,61 ± 1,07	51,02 ± 0,39	54,52 ± 0,49	63,70 ± 0,07
	72	31,50 ± 2,28	31,37 ± 0,71	32,44 ± 1,29	49,60 ± 0,43	46,63 ± 1,71	46,30 ± 2,77	55,64 ± 0,07	55,34 ± 0,58	59,73 ± 2,30

Carga enzimática (FPU/UI:g)										
H146	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	20,95 ± 0,47	15,13 ± 0,11	23,15 ± 0,59	17,36 ± 0,33	20,25 ± 0,24	24,08 ± 0,10	26,38 ± 0,60	27,83 ± 1,03	32,37 ± 2,50
	12	24,12 ± 0,00	15,40 ± 0,46	27,56 ± 1,55	18,33 ± 0,27	22,85 ± 0,25	27,52 ± 0,11	36,24 ± 1,03	38,18 ± 0,64	45,96 ± 1,17
	24	26,66 ± 0,11	26,67 ± 0,13	32,68 ± 0,24	23,83 ± 0,85	27,89 ± 0,30	33,48 ± 0,38	48,40 ± 0,27	54,59 ± 2,47	58,20 ± 2,75
	48	26,54 ± 0,07	32,94 ± 0,05	40,35 ± 5,05	28,25 ± 0,34	32,60 ± 0,94	33,50 ± 0,07	58,77 ± 1,15	62,63 ± 0,64	65,74 ± 0,09
	72	30,40 ± 0,07	36,53 ± 0,06	35,35 ± 0,01	32,31 ± 0,77	32,54 ± 0,24	42,93 ± 1,12	72,30 ± 0,09	63,07 ± 5,65	70,95 ± 2,35
Carga enzimática (FPU/UI:g)										
H166	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	15,58 ± 0,19	15,45 ± 0,47	24,99 ± 0,13	27,88 ± 0,15	28,18 ± 1,33	33,85 ± 0,51	22,29 ± 1,41	23,38 ± 0,22	28,77 ± 0,33
	12	18,44 ± 0,34	18,11 ± 0,05	27,90 ± 0,20	34,69 ± 0,16	35,90 ± 0,74	40,80 ± 0,15	29,75 ± 0,43	29,30 ± 2,17	35,88 ± 1,31
	24	26,45 ± 0,03	17,09 ± 0,31	32,77 ± 0,11	43,86 ± 1,15	45,00 ± 0,77	52,12 ± 0,52	35,77 ± 0,24	38,98 ± 0,15	43,55 ± 1,12
	48	28,03 ± 0,31	19,10 ± 0,87	30,76 ± 0,35	51,38 ± 0,16	52,16 ± 1,53	59,11 ± 1,01	42,86 ± 0,89	47,42 ± 0,53	52,63 ± 1,21
	72	28,17 ± 0,37	23,28 ± 0,01	29,80 ± 0,35	62,29 ± 0,33	56,20 ± 2,58	61,08 ± 1,53	48,74 ± 0,43	47,25 ± 2,52	51,13 ± 3,27

Tabela B.2. Valores médios da conversão da hemicelulose das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C, em três cargas enzimáticas distintas (FPU de Cellubrix/UI de Novozym).

		130 °C			150 °C			160 °C		
		Carga enzimática (FPU/UI:g)								
Variedade Comercial	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	8,71 ± 0,20	11,07 ± 0,71	41,81 ± 8,28	33,09 ± 1,58	36,76 ± 2,34	39,70 ± 0,16	36,90 ± 1,36	41,22 ± 1,86	51,08 ± 0,20
	12	12,01 ± 0,00	13,19 ± 0,02	47,68 ± 1,71	40,39 ± 0,50	41,79 ± 0,17	45,35 ± 0,13	52,67 ± 0,61	55,66 ± 0,57	68,14 ± 0,36
	24	15,01 ± 0,15	13,50 ± 0,73	53,69 ± 0,45	48,12 ± 0,35	53,41 ± 0,83	60,79 ± 2,58	73,56 ± 2,20	74,94 ± 2,25	89,04 ± 0,21
	48	15,21 ± 0,45	15,89 ± 0,51	58,45 ± 2,13	52,74 ± 3,91	61,98 ± 1,58	74,45 ± 4,25	88,75 ± 2,53	89,26 ± 0,44	106,87 ± 2,58
	72	16,30 ± 0,10	20,32 ± 0,62	62,99 ± 1,18	66,46 ± 2,16	64,87 ± 2,64	67,80 ± 1,84	103,68 ± 3,38	101,53 ± 3,83	106,61 ± 0,54
		Carga enzimática (FPU/UI:g)								
H89	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	9,71 ± 0,08	10,87 ± 1,23	34,12 ± 1,91	34,61 ± 0,07	33,83 ± 0,27	38,76 ± 1,77	26,40 ± 0,66	29,30 ± 1,31	37,59 ± 0,18
	12	12,05 ± 2,30	13,63 ± 0,26	42,67 ± 5,46	44,58 ± 0,98	45,03 ± 0,80	46,24 ± 1,23	39,74 ± 0,24	44,26 ± 1,15	47,91 ± 0,63
	24	15,12 ± 0,71	17,64 ± 0,43	51,56 ± 1,21	68,52 ± 0,73	53,48 ± 0,88	58,81 ± 2,32	54,71 ± 1,18	62,41 ± 0,52	72,03 ± 1,88
	48	17,99 ± 0,46	20,61 ± 0,42	48,56 ± 0,25	64,22 ± 1,73	64,64 ± 1,18	72,08 ± 1,78	68,45 ± 0,64	72,78 ± 1,32	86,95 ± 2,85
	72	19,22 ± 1,32	21,32 ± 0,37	49,08 ± 1,64	76,77 ± 1,32	73,45 ± 3,31	75,18 ± 0,84	76,72 ± 0,14	81,24 ± 0,17	80,10 ± 4,10

Carga enzimática (FPU/UI:g)										
H146	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	11,65 ± 0,19	9,29 ± 0,05	30,48 ± 0,56	29,34 ± 1,55	35,00 ± 0,15	42,37 ± 1,21	35,91 ± 0,29	36,54 ± 1,78	42,32 ± 2,82
	12	15,33 ± 0,57	9,45 ± 0,04	40,78 ± 0,15	32,22 ± 0,10	41,48 ± 0,01	51,95 ± 1,29	49,30 ± 0,44	49,90 ± 1,16	61,16 ± 1,84
	24	17,22 ± 0,39	17,66 ± 0,14	48,75 ± 0,29	44,64 ± 1,75	52,51 ± 0,12	62,96 ± 0,36	66,33 ± 1,36	71,48 ± 0,07	81,27 ± 3,33
	48	20,57 ± 0,56	24,27 ± 0,17	51,17 ± 2,22	54,87 ± 0,13	63,21 ± 2,01	75,07 ± 0,48	82,90 ± 0,50	85,24 ± 0,01	95,16 ± 0,53
	72	44,51 ± 0,10	26,05 ± 0,15	56,97 ± 0,10	65,61 ± 0,18	63,41 ± 1,44	82,63 ± 2,45	103,90 ± 0,16	88,81 ± 6,80	98,67 ± 2,55
Carga enzimática (FPU/UI:g)										
H166	Tempo (h)	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40	05:10	10:20	20:40
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	5,48 ± 0,16	6,99 ± 0,16	27,82 ± 0,72	35,78 ± 0,03	36,81 ± 1,98	42,83 ± 0,60	32,21 ± 1,68	33,53 ± 0,14	39,76 ± 0,06
	12	7,26 ± 0,16	8,83 ± 0,06	31,18 ± 1,20	45,41 ± 0,29	47,52 ± 0,99	53,89 ± 0,31	42,39 ± 0,31	41,84 ± 3,51	51,29 ± 1,79
	24	11,21 ± 0,16	9,86 ± 0,25	41,42 ± 2,48	58,66 ± 1,34	61,20 ± 0,85	72,66 ± 0,38	51,68 ± 0,25	56,19 ± 0,53	64,79 ± 2,09
	48	13,32 ± 0,17	11,12 ± 0,63	43,01 ± 1,33	71,07 ± 0,52	73,02 ± 1,87	84,88 ± 1,59	63,64 ± 1,01	69,99 ± 0,88	81,21 ± 2,27
	72	13,00 ± 0,10	15,01 ± 0,94	38,70 ± 0,44	87,12 ± 0,29	78,99 ± 5,25	83,14 ± 2,26	74,16 ± 0,32	70,20 ± 4,11	74,77 ± 6,06

Tabela B.3. Valores da velocidade inicial de conversão da celulose das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C, em três cargas enzimáticas distintas (FPU de Cellubrix/UI de Novozym).

Bagaço	Carga enzimática (FPU:UI/mL)	Velocidade inicial (%/h)		
		130 °C	150 °C	160 °C
VC	05:10	2,33	3,40	3,65
	10:20	2,95	3,82	4,05
	20:40	4,86	4,13	5,08
H89	05:10	3,30	4,26	3,28
	10:20	3,52	4,02	4,08
	20:40	4,79	4,61	4,96
H146	05:10	3,49	2,89	4,40
	10:20	2,52	3,38	4,64
	20:40	3,86	4,01	5,40
H166	05:10	2,60	4,65	3,72
	10:20	2,57	4,70	3,90
	20:40	4,17	5,64	4,79

Tabela B.4. Valores da velocidade inicial de conversão da hemicelulose das amostras pré-tratadas com sulfito ácido a 130 °C, 150 °C e 160 °C, em três cargas enzimáticas distintas (FPU de Cellubrix/UI de Novozym).

Bagaço	Carga enzimática (FPU:UI/mL)	Velocidade inicial (%/h)		
		130 °C	150 °C	160 °C
VC	05:10	1,45	5,51	6,15
	10:20	1,84	6,13	6,87
	20:40	6,97	6,62	8,51
H89	05:10	1,62	5,77	4,40
	10:20	1,81	5,64	4,88
	20:40	5,69	6,46	6,26
H146	05:10	1,94	4,89	5,99
	10:20	1,55	5,83	6,09
	20:40	5,08	7,06	7,05
H166	05:10	0,91	5,96	5,37
	10:20	1,17	6,14	5,59
	20:40	4,64	7,14	6,63

APÊNDICE C – MEDIDA DE PROTEÍNA SOLÚVEL

Tabela C.1. Valores obtidos no Teste de ninidrina referentes à quantidade de enzima adsorvida na polpa pelo volume reacional (1mL) e a massa inicial de substrato (g de Avicel ou bagaço pré-tratado com sulfito ácido em diferentes temperaturas).

Amostras		[] mg de proteína /mL de solução	mg de proteína /g de substrato
Avicel	controle	0,293±0,003	19,51
	<i>in natura</i>	0,133±0,016	88,64
VC	130 °C	0,177±0,015	118,14
	150 °C	0,234±0,018	155,70
	160 °C	0,077±0,005	51,13
H89	<i>in natura</i>	0,044±0,001	29,60
	130 °C	0,069±0,017	45,81
	150 °C	0,048±0,003	31,92
	160 °C	0,148±0,007	98,62
H146	<i>in natura</i>	0,018±0,010	12,28
	130 °C	0,078±0,005	52,11
	150 °C	0,035±0,004	23,23
	160 °C	0,014±0,001	9,10
H166	<i>in natura</i>	0,016±0,001	10,75
	130 °C	0,025±0,002	16,69
	150 °C	0,125±0,011	83,56
	160 °C	0,063±0,006	41,71

Tabela C.2. Valores obtidos no Teste de Bradford referentes à porcentagem de enzima livre nas águas de lavagem de Avicel e dos bagaços de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento sulfito ácido em diferentes temperaturas.

Amostras		Enzima livre (%)		
		1ª Lavagem	2ª Lavagem	3ª Lavagem
Avicel		43,73	8,71	0,00
VC	<i>in natura</i>	92,05	5,76	0,00
	130 °C	93,34	15,59	0,00
	150 °C	78,49	0,00	0,00
	160 °C	79,42	0,00	0,00
H89	<i>in natura</i>	88,31	0,00	0,00
	130 °C	83,51	11,14	0,00
	150 °C	97,31	11,96	1,09
	160 °C	91,82	0,00	0,74
H146	<i>in natura</i>	91,27	11,20	0,00
	130 °C	97,94	2,34	0,00
	150 °C	94,90	9,50	0,00
	160 °C	92,72	8,59	0,00
H166	<i>in natura</i>	86,41	27,57	0,00
	130 °C	91,39	8,89	0,00
	150 °C	90,78	0,00	0,00
	160 °C	91,02	6,34	1,25