UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VICTOR TABOSA DE OLIVEIRA SANTOS

Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-
açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana

Lorena
2015

VICTOR TABOSA DE OLIVEIRA SANTOS

Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Versão Original

Lorena
2015

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

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

Santos, Victor Tabosa de Oliveira

Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana / Victor Tabosa de Oliveira Santos; orientador André Luis Ferraz - Versão Original. - Lorena, 2015.

111 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: André Luis Ferraz

1. Híbridos de cana-de-açúcar. 2. ácido sulfúrico diluído. 3. Hidrólise enzimática. 4. Porosidade. 5. área superficial acessível de glucana. I. Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

Dedico este trabalho à toda minha família

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o André Ferraz, pela oportunidade, dedicação e confiança demonstrada durante o todo o processo de orientação da presente tese.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (Felipe, Natasha, Mariana, Luciane, Joseana, Paula, Débora, Dani Cortez, Fernanda e à Prof^a Adriane Milagres) e do Laboratório de Ciências da Madeira (Omar, Fernando Masarin, Ana Paula, Dayelle, Fernanda Valadares, Maria Fernanda, Ângela, Raphael, Fernando Segato, Gabi, Carlaile e Thales), por todos os momentos de convivência e respeito. Em especial, aos grandes amigos, Germano e Cecéu, pelo companheirismo e pelas constantes palavras de incentivo.

Ao amigo José “Gambira” Moreira, por todo o apoio técnico necessário dentro do laboratório e, não menos importante, pelas boas e diárias conversas, geralmente acompanhadas de café.

Ao amigo José “Cobrinha” Carlos, pela assistência laboratorial, receptividade, convivência e sagrada manufatura do nosso café de cada dia.

Aos amigos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pelos momentos de descontração.

À mulher da minha vida, Larissa Teixeira, pelo carinho, companheirismo, incentivo e por compreender toda minha entrega e dedicação necessária para a realização desta tese.

Aos meus pais, Wagner e Ema, pela imensurável contribuição no cumprimento de mais esta etapa na minha vida.

À minha irmã e ao meu sobrinho, pelos momentos de alegria e carinho.

Às minhas avós Dirce e Maria, pelos anos de carinho e dedicação.

Aos meus avôs (*in memorian*), Victório e Tabosa, pelo carinho sublime. SAUDADES.

Aos meus amigos de infância, pelas amizades eternamente presentes e sinceras.

Ao Sport Club Corinthians Paulista, pelos títulos da Libertadores da América e do Mundial Interclubes no ano de 2012; conquistas, as quais me proporcionaram raros momentos de alento em meio a um período conturbado.

RESUMO

SANTOS, V.T.O. **Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana**. 2015. 111p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2015.

O presente trabalho avaliou o comportamento de três híbridos de cana-de-açúcar, contrastantes quanto aos teores de hemicelulose e lignina, diante do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e da subsequente conversão enzimática da glucana à glicose. Os híbridos 89, 140 e 321 (H89, H140 e H321) foram submetidos às diferentes condições de pré-tratamento ácido: 150 °C; 13 g ácido sulfúrico/100 g material; e tempos de reação que variaram entre 20 e 90 min. Os rendimentos de sólidos residuais diminuíram progressivamente em função do aumento da severidade do pré-tratamento. O H89 apresentou rendimentos nitidamente menores, comparados aos dos híbridos H140 e H321; reflexo da maior solubilização de todos os três constituintes estruturais deste híbrido. A hemicelulose foi o componente da parede celular removido com maior eficiência pelo pré-tratamento ácido. Além disso, o pré-tratamento modificou a proporção molar dos constituintes iniciais da hemicelulose (xilose, ácido acético e arabinose), resultando em estruturas residuais menos ramificadas. Paralelamente, também foi observada uma pequena remoção de lignina (entre 21% e 31%, dependendo do híbrido) e de glucana (entre 4% e 15%, dependendo do híbrido) durante o pré-tratamento. Os carboidratos detectados nos hidrolisados ácidos dos híbridos foram predominantemente monoméricos quando os tempos de reação foram maiores do que 40 min. No entanto, os híbridos H140 e H321 se diferenciaram do H89, pois apresentaram oligossacarídeos ($DP \geq 2$) nos hidrolisados obtidos em tempos de reação entre 20 e 30 min. Os rendimentos de conversão enzimática da glucana contida nos sólidos pré-tratados aumentaram substancialmente após o pré-tratamento ácido (principalmente devido à remoção de hemicelulose). No entanto, as conversões máximas de glucana em glicose não ultrapassaram 65%. A deslignificação parcial das amostras pré-tratadas com ácido (90 min), empregando soluções de clorito de sódio/ácido acético, permitiu aumentar a conversão enzimática de glucanas até valores próximos a 100%. De forma geral, o pré-tratamento ácido e a subsequente deslignificação proporcionaram maiores ganhos de conversão enzimática àqueles híbridos inicialmente mais recalcitrantes (H321 e H140). Os rendimentos de pré-tratamento (ácido diluído e clorito-ácido) e da conversão enzimática demonstraram que a maior obtenção de glicose por área plantada (Kg/hectare) ou por material processado (Kg/ton material) seria alcançada com a utilização dos híbridos H89 e H321, respectivamente. A investigação das características microestruturais das paredes celulares dos híbridos permitiu compreender como as etapas de tratamento químico afetaram a conversão enzimática da glucana. O pré-tratamento ácido diminuiu substancialmente o volume total de poros dos três híbridos, enquanto a subsequente deslignificação não retornou a porosidade aos níveis originalmente detectados nas amostras não tratadas. Por outro lado, a área superficial acessível de glucana dos substratos apresentou relação direta com os rendimentos de conversão enzimática da glucana à glicose ($R^2=0,92$). A compilação dos dados analíticos, aliada às determinações de glucana acessível, permitiu propor um parâmetro empírico (relação do teor de glucana com a soma de hemicelulose+lignina+extraíveis), útil para prever os níveis de conversão enzimática de glucana nas amostras estudadas.

Palavras-chave: híbridos de cana-de-açúcar; ácido sulfúrico diluído; hidrólise enzimática; porosidade; área superficial acessível de glucana.

ABSTRACT

SANTOS, V.T.O. **Action of the dilute sulfuric acid pretreatment in sugarcane hybrids and their effects in the enzymatic conversion of glucan.** 2015. 111p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2015.

This study evaluated the performance of three sugarcane hybrids, contrasting for lignin and hemicellulose contents, under dilute sulfuric acid pretreatment and subsequent enzymatic conversion of glucan to glucose. The hybrids 89, 140 and 321 (H89, H140, and H321) were pretreated at different reaction conditions: 150 °C; 13 g sulfuric acid/100 g material; and reaction time ranging from 20 to 90 min. Residual solid yields gradually decreased according to increasing of pretreatment severity. H89 showed the lowest yields compared to the H140 and H321 hybrids, due to the highest solubilization of all the three structural components. Hemicellulose was the major cell wall component removed by the acid pretreatment. Furthermore, acid pretreatment modified the molar ratio of the initial hemicellulose constituents (xylose, arabinose and acetic acid), resulting in less branched structures. Lignin (between 21% and 31%, depending on the hybrid) and glucan (between 4% and 15%, depending on the hybrid) removal were also observed during the pretreatment. Carbohydrates in liquid hydrolysates were predominantly detected as monomers at reaction times greater than 40 min. However, H140 and H321 hybrids differed from H89, since they presented oligosaccharides ($DP \geq 2$) in the hydrolysates obtained at short reaction time (20 and 30 min). Enzymatic conversion of glucan from pretreated solids was substantially increased after the acid pretreatment (mainly due to the hemicellulose removal). Nevertheless, maximum conversion of glucan to glucose did not exceed 65%. Partial delignification of the acid pretreated samples (90 min), employing sodium chlorite/acetic acid solutions, increased the enzymatic conversion of glucan to values near to 100%. In general, acid pretreatment and subsequent delignification provided higher gains of enzymatic conversion to the hybrids originally more recalcitrant (H321 and H140). The pretreatment (dilute acid and chlorite-acid) and enzymatic conversion yields demonstrated that to obtain higher amounts of glucose, taking into account the planted area (Kg/ha) or raw material processed (Kg/ton), would be achieved by using H89 and H321 hybrids, respectively. Analysis of the micro-structural features of the hybrids allowed understanding the effect of the chemical treatment step in the enzymatic conversion of glucan. Acid pretreatment significantly decreased the total pores volume of these hybrids, while the subsequent delignification do not returned the porosity to the original levels detected in raw samples. On the other hand, the accessible surface area of glucan showed a direct correlation with the enzymatic conversion levels of glucan to glucose (the model including several substrates presented $R^2=0.92$). The compilation of analytical data, combined with the accessible glucan, allowed proposing an empirical parameter (ratio of the glucan content with the sum of hemicellulose+lignin+extractives), that was useful for predicting the enzymatic conversion levels of glucan for all the evaluated samples.

Keywords: hybrids of sugarcane; acid pretreatment; enzymatic hydrolysis; porosity; accessible surface area of glucan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura linear da cadeia de celulose e da fibrila elementar resultante da associação entre diferentes cadeias de celulose	18
Figura 2 – Representação esquemática de uma hemicelulose do tipo 4-O-metil-glucuronoarabinosilana	19
Figura 3 – Representação de um fragmento de β -glucana, destacando a presença de ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e β -(1 $\rightarrow$ 3)	20
Figura 4 – Estrutura hipotética de uma lignina composta por unidades hidróxi-fenil, guaiacil e siringil, ilustrando os tipos de ligações entre seus três precursores	21
Figura 5 – Mecanismo de hidrólise da celulose por endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases	27
Figura 6 – Conversão enzimática de glucana dos híbridos H89, H140 e H321, não tratados e após diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.	54
Figura 7 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana em função do teor remanescente e da remoção de hemicelulose dos híbridos H89, H140 e H321 submetidos à diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	57
Figura 8 – Conversão enzimática de glucana dos híbridos H89, H140 e H321 já pré-tratados com ácido sulfúrico diluído, e sequencialmente deslignificados com uma e duas cargas de clorito de sódio/ácido acético	63
Figura 9 – Determinação da distribuição do tamanho de poros e da acessibilidade do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e deslignificado com clorito de sódio/ácido acético, utilizando as metodologias adaptada e convencional de exclusão de solutos	71
Figura 10 – Distribuição do tamanho de poros dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados.....	73
Figura 11 – Acessibilidade dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados à sondas moleculares de diferentes tamanhos..	74
Figura 12 – Correlação entre os valores de ponto de saturação de fibra e retenção de água dos híbridos H89, H140 e H321 não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético	76
Figura 13 – Rendimentos de conversão enzimática de glucana das amostras dos híbridos H89, H140 e H321 não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados, em função do volume acessível à sonda de 50 Å.....	77
Figura 14 – Ilustração gráfica, sem escalas, da hipótese que justificaria a diminuição de poros mensuráveis na parede celular de amostras pré-tratadas com ácido.....	78

Figura 15 – Rendimentos de conversão enzimática em função da área superficial acessível de glucana dos híbridos H89, H140 e H321 não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético.....	81
Figura 16 – Área superficial acessível de glucana das diferentes amostras dos híbridos H89, H140 e H321, em função da Glucana Disponível.....	84
Figura 17 – Rendimentos máximos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (90 min) e sequencialmente deslignificados (30 min).....	85
Figura 18 – Rendimentos máximos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (20–90 min) e sequencialmente deslignificados (15 e 30 min).....	86
Figura 19 – Determinação da absortividade molar em 455 e 624 nm da solução do corante laranja utilizada nos experimentos para avaliar a área superficial acessível de glucana ...	105
Figura 20 – Determinação da absortividade molar em 455 e 624 nm da solução do corante azul utilizada nos experimentos para avaliar a área superficial acessível de glucana	105
Figura 21 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (20–90 min) e sequencialmente deslignificados (15 e 30 min)	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades enzimáticas e teor de proteína em preparações enzimáticas comerciais	38
Tabela 2 – Características das sondas moleculares utilizadas na técnica de exclusão de solutos	39
Tabela 3 – Composição química, rendimento e remoção dos constituintes estruturais da parede celular dos híbridos de cana-de-açúcar submetidos à diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	45
Tabela 4 – Teor e remoção dos constituintes que compõe a hemicelulose dos híbridos de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.	46
Tabela 5 – Teor de lignina insolúvel e solúvel dos híbridos de cana-de-açúcar antes e depois de diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	47
Tabela 6 – Caracterização dos hidrolisados ácidos dos três híbridos de cana-de-açúcar quanto a presença de monômeros e oligômeros de açúcares e ácido acético	52
Tabela 7 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar em diferentes cenários de remoção de hemicelulose.....	58
Tabela 8 – Composição química, rendimento e remoção dos constituintes estruturais da parede celular de amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico e sequencialmente deslignificadas com clorito de sódio/ácido acético.....	61
Tabela 9 – Ganhos de conversão de glucana dos híbridos de cana-de-açúcar quando pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético.....	65
Tabela 10 – Recuperação de glicose a partir da integração de processo, incluindo produtividade em campo dos híbridos de cana-de-açúcar e rendimentos de pré-tratamento e conversão enzimática da glucana.....	68
Tabela 11 – Valores de ponto de saturação de fibra e retenção de água dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético	75
Tabela 12 – Adsorção dos corantes laranja e azul, área superficial acessível de glucana e máximos rendimentos de conversão enzimática de glucana das amostras de híbridos de cana-de-açúcar	80
Tabela 13 – Composição química, rendimento e balanço de massa dos híbridos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e subsequente deslignificação com clorito de sódio/ácido acético	106

Tabela 14 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequentemente com clorito de sódio/ácido acético.....107

Tabela 15 – Valores ajustados com modelo logarítmico e das duplicatas experimentais do volume inacessível do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e deslignificado com 4 cargas de clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos.....108

Tabela 16 – Valores experimentais e ajustados com modelo logarítmico do volume acessível do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e deslignificado com 4 cargas de clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos109

Tabela 17 – Valores ajustados com modelo logarítmico e das duplicatas experimentais do volume inacessível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos110

Tabela 18 – Valores experimentais e ajustados com modelo logarítmico do volume acessível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos111

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Produção de cana-de-açúcar no Brasil	17
2.2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	17
2.3. Obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos	22
2.3.1. Pré-tratamento	23
2.3.1.1. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.....	24
2.3.2. Hidrólise enzimática da fração celulósica de materiais lignocelulósicos	26
2.3.2.1. Fatores físico-químicos da matriz lignocelulósica que afetam a conversão enzimática da celulose à glicose	28
3. OBJETIVO	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Híbridos de cana-de-açúcar.....	34
4.2. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	35
4.2.1. Composição dos hidrolisados ácidos	35
4.3. Deslignificação das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico	36
4.4. Determinação da composição química das amostras de híbridos de cana.....	36
4.5. Hidrólise enzimática das amostras de híbridos de cana-de-açúcar	37
4.6. Determinação do volume de poros e da acessibilidade das amostras de híbridos de cana-de-açúcar.....	38
4.7. Determinação do valor de retenção de água das amostras de híbridos de cana-de-açúcar.	40
4.8. Determinação da área superficial acessível de glucana das amostras de híbridos de cana-de-açúcar.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Pré-tratamento dos híbridos de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído	43
5.1.1. Caracterização dos hidrolisados ácidos.....	50
5.1.2. Hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com ácido.....	52
5.2. Influência da hemicelulose na conversão da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar.	55
5.3. Deslignificação dos híbridos de cana-de-açúcar pré-tratados com ácido sulfúrico.....	58
5.3.1. Hidrólise enzimática das amostras com teores diminuídos de lignina.....	62

5.4. Influência dos tratamentos nos balanços de massa para a recuperação de glicose a partir dos híbridos de cana-de-açúcar.....	64
5.5. Efeito dos tratamentos na estrutura física dos híbridos de cana-de-açúcar.....	69
5.5.1. Porosidade	69
5.5.2. Glucana acessível	78
5.6. Parâmetro para predição de rendimentos de conversão enzimática da glucana....	82
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES.....	105

1. INTRODUÇÃO

Diante da excessiva demanda por petróleo e das atuais preocupações ambientais e financeiras, as fontes energéticas renováveis têm sido foco de discussões e grandes investimentos, no que diz respeito à pesquisa e desenvolvimento. Em meio a esta situação, a utilização da fração polissacarídica (principalmente glucana - celulose) encontrada na parede celular de materiais lignocelulósicos surgiu como um potencial substrato para o incremento da atual produção mundial de etanol, por exemplo. Denominado como etanol de 2ª geração, o processo estabelecido envolve a conversão enzimática da glucana à glicose, com a posterior fermentação deste monossacarídeo à etanol. Porém, sabe-se que a eficiência enzimática sobre materiais íntegros (não pré-tratados) é extremamente limitada, em virtude da complexidade da matriz lignocelulósica. A recalcitrância intrínseca destes materiais às enzimas celulolíticas (celulases) deve-se a íntima associação da glucana aos demais constituintes estruturais da parede celular vegetal: a hemicelulose (polissacarídeo) e a lignina (não polissacarídeo).

Neste contexto, mediante seleções fenotípicas ou genotípicas, a técnica de hibridização tem permitido obter e selecionar plantas com variados teores de hemicelulose e lignina. De forma geral, esta abordagem tem ajudado a melhor compreender a origem da recalcitrância da parede celular dos vegetais às enzimas. Em nosso próprio grupo de pesquisa foi estabelecido que híbridos experimentais de cana-de-açúcar respondem diferentemente à hidrólise enzimática, onde as plantas com menores teores de lignina se mostraram menos recalcitrantes (MASARIN et al., 2011). Mais tarde, no trabalho de Costa et al. (2013), ainda foi evidenciado que, juntamente com a lignina, a teor de hemicelulose pode explicar a recalcitrância de algumas frações do entrenó destes híbridos de cana. Embora interessante, a estratégia de diminuir o teor inicial de hemicelulose e lignina da parede celular, através de hibridização e seleção continuada, ainda não permite alcançar rendimentos de conversão enzimática (sem pré-tratamento do material lignocelulósico) que ultrapassem cerca de 35 % da glucana original. De modo a superar essa limitação, os materiais lignocelulósicos são submetidos ao processo de pré-tratamento. Em comum, os pré-tratamentos buscam alterar e/ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, de modo a aumentar a acessibilidade das celulases ao seu substrato. Os pré-tratamentos podem ser biológicos, químicos, físicos, e utilizados de forma individual, combinada e/ou sequencial. A hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído é um dos tipos de pré-tratamento para

biomassa vegetal mais empregado atualmente. O principal efeito deste pré-tratamento é a dissolução eficiente da hemicelulose presente no material, sendo descritas também algumas alterações estruturais da lignina e diminuição no tamanho das partículas. Em consequência disto, a matriz lignocelulósica sofre uma série de modificações físico-químicas, as quais permitem melhorar significativamente o rendimento de conversão da glucana contida neste material.

Tendo em vista que a etapa de pré-tratamento é extremamente relevante para a produção de etanol de 2ª geração, junto à disponibilidade de um grupo de plantas previamente selecionadas, a presente tese procura avaliar o comportamento de híbridos de cana-de-açúcar, com teores contrastantes de hemicelulose e lignina, diante de um pré-tratamento amplamente utilizado – ácido sulfúrico diluído. Este tipo de abordagem pode indicar a característica necessária de uma matéria-prima (híbrido de cana) para se alcançar melhores rendimentos de hidrólise enzimática, quando pré-tratadas pelo processo ácido. Além disso, avançar em direção de elucidar como a eficiência da hidrólise enzimática da glucana é realmente melhorada por este pré-tratamento, acompanhando algumas prováveis modificações microestruturais da matriz lignocelulósica dos cultivares de cana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de cana-de-açúcar no Brasil

O Brasil é um dos principais produtores mundial de cana-de-açúcar. Apesar de se plantar cana do Centro-Sul ao Norte-Nordeste do país, cerca de 60 % de toda produção nacional provém do Estado de São Paulo (UNICA, 2014). Atualmente, inúmeras linhagens de cana-de-açúcar são utilizadas comercialmente pelo setor sucro-alcooleiro brasileiro. Através de melhoramentos genéticos, as variedades de cana atualmente exibem menor susceptibilidade às pragas e doenças, melhor adaptação às condições edafoclimáticas do local de cultivo e, também, aos modernos processos mecanizados de plantio e colheita. Tais avanços vêm permitindo aumentar o rendimento da área plantada de cana-de-açúcar no Brasil, reduzindo o custo final da produção de etanol e açúcar (CTC, 2014). Durante a safra nacional de 2014/2015, estima-se uma produção de 659,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com previsão de que 53,9 % desse montante serão destinados à produção de álcool e 46,1 % à produção de açúcar (CONAB, 2014). Considerando que o processamento de uma tonelada de cana gera em torno de 140 Kg de bagaço (NOGUEIRA, 2008), pode-se, por exemplo, estimar que mais de 92 milhões de toneladas de bagaço de cana serão geradas na safra 2014/2015.

2.2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

Basicamente, o bagaço de cana é composto pelas paredes celulares da planta de cana-de-açúcar processada. De natureza lignocelulósica, a parede celular é constituída predominantemente por celulose, hemicelulose e lignina. Juntas, estas três macromoléculas estruturais perfazem cerca de 90 % da massa do bagaço. Em geral, o teor de cinzas encontrado neste material é considerado baixo, representando até 4 % da massa total. Adicionalmente, também em pequenas proporções, o bagaço apresenta compostos solúveis não pertencentes à estrutura da parede celular (CANILHA et al., 2011; MILNE et al., 1992; TEMPLETON et al., 2012).

A celulose corresponde ao principal constituinte estrutural da parede celular vegetal. Este polissacarídeo é constituído exclusivamente por resíduos de D-anidroglicose, unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1A). O grau de polimerização de uma cadeia celulósica pode variar entre menos de 100 e mais de 15.000 unidades de resíduos de glicose, dependendo da origem e da forma de extração. As ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4) conferem linearidade à estrutura das cadeias celulósicas, o que possibilita a formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. A associação entre várias cadeias de celulose resulta nas fibrilas elementares (Figura 1B), as quais são compostas por regiões ordenadas (cristalinas), onde há fortes interações inter cadeias de celulose, e regiões não ordenadas (amorfas). Na matriz lignocelulósica, as fibrilas de celulose encontram-se recobertas por hemicelulose e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989; HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009).

Figura 1 – Estrutura linear da cadeia de celulose (A) e da fibrila elementar resultante da associação entre diferentes cadeias de celulose (B).

Fonte: adaptado de Ramos (2003).

Por outro lado, a hemicelulose é um constituinte heteropolissacarídico composto por uma cadeia principal, a qual apresenta grupos laterais pendentes. As hemiceluloses são compostas por anidro-açúcares de pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose) e, em com menor frequência, também podem apresentar grupos acetil e ácidos urônicos (4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico). Contudo, os constituintes que a perfazem, bem como suas proporções, variam de acordo com os tecidos vegetais, o estágio de maturação e o grupo vegetal. No caso de cana-de-açúcar, uma gramínea, a hemicelulose predominante é do tipo 4-O-metil-glucuronoarabinosilana. Esta hemicelulose é caracterizada por uma estrutura composta por

uma cadeia principal de resíduos de anidroxilose unidos por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), com grupos pendentes de arabinosil, acetil e 4-O-metil-glucurônico, covalentemente ligados à cadeia principal (Figura 2) (CARPITA, 1996; TELEMANN; 2009).

Figura 2 – Representação esquemática de uma hemicelulose do tipo 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana.

Fonte: adaptado de Buckeridge e De Souza (2014).

Na parede celular de gramíneas ainda podem ser encontradas glucanas não celulósicas, as β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanas. Este polissacarídeo também é exclusivamente composto por resíduos de anidroglicose, porém estes monômeros encontram-se unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 3), em uma frequência de 3:1 a 4:1. Com isso, as cadeias de β -glucanas apresentam uma estrutura não linear (Figura 3). A quantidade desse polissacarídeo em gramíneas depende do estágio de maturação das paredes celulares. Normalmente, as β -glucanas são sintetizadas/depositadas apenas durante o período de expansão celular, sendo posteriormente degradadas e substituídas por hemiceluloses do tipo glucuronoarabinoxilanas em estágios avançados de amadurecimento (BUCKERIDGE et al., 2004; CARPITA, 1996; CARPITA; McCANN, 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Vale destacar que os métodos convencionais para caracterização química de materiais lignocelulósicos, baseados na hidrólise ácida dos polissacarídeos, não permitem distinguir β -glucanas de celulose (FERRAZ et al., 2000; GOUVEIA et al., 2009; SLUITER et al., 2008).

Figura 3 – Representação de um fragmento de β -glucana, destacando a presença de ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e β -(1 $\rightarrow$ 3).

Fonte: adaptado de Carpita (2006).

Por sua vez, a lignina corresponde ao componente estrutural não polissacarídico da matriz lignocelulósica. A lignina confere suporte estrutural às plantas, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano. Exibindo a estrutura mais complexa dentre os polímeros naturais, a lignina é composta de porções aromáticas e alifáticas. Basicamente, sua síntese acontece a partir de três monômeros, denominados monolignóis (álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Estes compostos aparecem na estrutura da lignina aleatoriamente, conectados por meio de ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C). De acordo com o grau de metoxilação do anel aromático (Figura 4), a unidade básica é o *p*-Hidróxi-fenil (não metoxilada), Guaiacil (uma metoxila) ou Siringil (duas metoxilas). Especificamente para gramíneas (cana-de-açúcar), a lignina apresenta os três tipos de precursores – denominada como lignina HGS. Ao contrário dos polissacarídeos estruturais citados acima, a lignina possui caráter hidrofóbico (FENGEL; WEGENER, 1989; HENRIKSSON, 2009). A hemicelulose e a lignina de gramíneas podem aparecer unidas covalentemente dentro da matriz lignocelulósica. Há evidências indicando que o ácido ferúlico confere a união desses dois componentes estruturais, através da simultânea esterificação do seu grupo carboxila ao grupo arabinosil da hemicelulose e da eterificação de sua hidroxila fenólica ao carbono α da lignina (GRABBER et al., 2009; MASARIN et al., 2011; SCALBERT et al., 1985).

Extrativos são classificados como todos aqueles componentes não estruturais contidos no complexo de células vegetais, passíveis de extração por solventes neutros ou água. Os extrativos correspondem à compostos das mais variadas características químicas. Estes podem ser açúcares, lignanas, ácidos graxos, esteróis, terpenóides, taninos e flobafenos. A proporção e a natureza destes componentes variam conforme a região, maturação e espécie do vegetal, bem como fatores genéticos e geográficos. Alguns

extrativos exercem importante função no metabolismo de células vivas, e também na proteção dos vegetais contra o ataque de microrganismos e insetos (BROWNING, 1967; FENGEL; WEGENER, 1989; JANSSON; NILVEBRANT, 2009). Masarin et al. (2011) caracterizaram compostos extraíveis em etanol de 5 diferentes híbridos de cana-de-açúcar e de uma amostra de bagaço de usina, onde reportaram a predominância de ceras, compostos aromáticos e carboidratos nesta fração.

Figura 4 – Estrutura hipotética de uma lignina composta por unidades hidróxi-fenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), ilustrando os tipos de ligações entre seus três precursores.

Fonte: adaptado de Rodríguez (2013).

O teor dos componentes que compõem a fração fibrosa da cana-de-açúcar é bastante variável. Compilando informações sobre a composição química de um número reduzido de amostras, provenientes de usinas sucro-alcooleiras brasileiras, se observa que os teores de celulose (35,7-45,6 %), hemicelulose (25,2-27,4 %), lignina (19,1-24,4 %), cinzas (1,0-4,9 %) e extrativos (2,2-9,1 %) podem variar expressivamente (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; ESTEVES, 2011; MENDES et al., 2011; SANTOS, 2010; SIQUEIRA et al., 2013). Além disso, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com 11 híbridos experimentais de cana-de-açúcar com conteúdos de glucana, hemicelulose, lignina e extrativos que contrastam entre 38,2 e 42,2 %, 26,3 e 31,5 %, 16,8 e 21,5 % e 1,6 e 7,5 %, respectivamente (MASARIN et al., 2011). Esta variabilidade pode ser observada também dentro de um conjunto de 115 híbridos de cana-de-açúcar (glucana: 32,6-40,7 %, hemicelulose: 23,6-31,0 %, lignina: 14,4-23,1 %, cinzas: 0,6-3,4% e extrativos: 3,5-12,4

%), originais da África do Sul, Estados Unidos da América, Barbados, Austrália, Índia e Réunion (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013a).

2.3.Obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos

Do ponto de vista tecnológico, a anidroglicose presente nas paredes celulares de materiais lignocelulósicos representa um substrato potencial para o incremento da produção de etanol (CARROLL; SOMERVILLE, 2009). Entretanto, a arquitetura da parede celular vegetal, onde os três principais constituintes estruturais encontram-se intimamente associados, impõe dificuldades à efetiva recuperação da glicose de origem celulósica (FENGEL; WEGENER, 1989; SUN; CHENG, 2002). Nesse sentido, o primeiro método desenvolvido para hidrolisar celulose de biomassa à glicose consistia no uso do ácido sulfúrico concentrado. Este processo apresentava como vantagens a alta conversão dos polissacarídeos à monômeros, a mínima formação de produtos da degradação de açúcares e ser aplicável à tipos variados de vegetais. Porém, a utilização de grandes quantidades de ácido, sensibilidade da reação ao elevado teor de umidade em algumas amostras, junto a necessidade por reatores resistentes à corrosão, comprometeram a viabilidade do processo (MOE et al., 2012; WIJAYA et al., 2014; YOON; HAN; SHIN, 2014).

Atualmente, a tecnologia estabelecida para obtenção glicose, a partir de substratos lignocelulósicos, envolve uma etapa de pré-tratamento do material e a subsequente hidrólise enzimática da celulose (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001; ZHU; PAN, 2010). Inclusive, este tipo de configuração de processo encontra-se operando em escala comercial, onde a glicose é fermentada para produção de etanol combustível (FLETCHER, 2014; LARSEN; HAVEN; THIRUP, 2012). Nas seções seguintes da revisão bibliográfica serão descritas com maiores detalhes a importância do pré-tratamento e da hidrólise enzimática durante a obtenção de glicose, expondo alguns fatores que limitam a eficiência de cada uma destas etapas; abordagens que contribuirão para fundamentar o objetivo e o desenvolvimento da presente tese de doutorado.

2.3.1. Pré-tratamento

O pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas torna-se imprescindível, devido à recalcitrância destes materiais à ação das enzimas celulolíticas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SUN; CHENG, 2002). Em comum, os pré-tratamentos buscam alterar e/ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, levando ao maior acesso das celulasas à celulose. O processo pode, inclusive, ser realizado por ação mecânica exclusiva de moagem, porém a redução no tamanho de partículas deve ser expressiva a ponto de aumentar a área superficial das partículas; gerando substratos de granulometria similar a da farinha de trigo (denominado no inglês como "*wood floor*"). Os pré-tratamentos podem ser biológicos, químicos, físicos, conduzidos de forma individual, combinada e/ou sequencial. Contudo, independente do pré-tratamento utilizado, este deve i) maximizar os rendimentos de conversão enzimática da celulose à glicose, ii) minimizar a perda dos demais açúcares, iii) maximizar a produção de co-produtos com valor agregado, iv) evitar a adição de químicos prejudiciais às enzimas hidrolíticas ou aos agentes fermentativos; v) minimizar o uso de energia, substâncias químicas, equipamentos e ainda vi) permitir sua ampliação para escala industrial. No entanto, sabe-se da dificuldade de atender a todas estas exigências em um único processo. Apesar disso, os dois últimos itens aparecem como especialmente importantes na viabilidade econômica para a prática de um processo em escala industrial (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SUN; CHENG, 2002).

Na revisão intitulada "*Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials*", Galbe e Zacchi (2012) descrevem os efeitos de uma série de pré-tratamentos na celulose, hemicelulose e lignina de materiais lignocelulósicos. Dentre os inúmeros pré-tratamentos, os autores abordaram o hidrotérmico, explosão a vapor, ácidos diluídos, soluções alcalinas, organossolve, líquidos iônicos, fungos basidiomicetos, entre outros. Em resumo, cada tipo de pré-tratamento exerce um dado efeito sobre os constituintes estruturais do material, resultando em frações líquidas e sólidas bastante distintas. Além disso, evidenciaram a importância dos pré-tratamentos quando a celulose da biomassa torna-se significativamente mais susceptível às enzimas. Como considerações finais, os autores enfatizam a necessidade de melhorar ("otimizar") os pré-tratamentos, sempre levando em conta os ganhos das etapas subsequentes do processo – hidrólise enzimática e fermentação. Concluem ainda sobre a necessidade de compreender como os

pré-tratamentos afetam a biomassa ao nível estrutural e molecular, e como tais modificações influenciam na ação do complexo enzimático.

2.3.1.1. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

Dentre os pré-tratamentos, a pré-hidrólise com ácido sulfúrico diluído está entre os processos mais comumente aplicados. A solubilização da hemicelulose, as alterações estruturais da lignina, a quebra das ligações lignina-carboidrato e a diminuição no tamanho de partículas, são alguns dos efeitos causados pelo pré-tratamento ácido aos substratos lignocelulósicos; sendo a temperatura, a concentração do ácido e o tempo de residência, as variáveis de processo que demandam otimizações. As modificações estruturais causadas na matriz lignocelulósica proporcionam melhoras significativas nos rendimentos de conversão enzimática da fração celulósica (CANILHA et al., 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; HSU et al., 2010; LYND, 1996). No entanto, durante condições mais severas de pré-tratamento, os polissacarídeos solúveis nos hidrolisados ácidos podem continuar sofrendo reações de hidrólise até a desidratação do monossacarídeo. Além de comprometer a recuperação dos açúcares, este fato resulta na geração de furfural e 5-hidroximetilfurfural (produtos da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente), os quais são compostos inibidores do processo fermentativo (CARA et al., 2008; KOOTSTRA et al., 2009).

Alguns fatores deste processo, como tempo, temperatura, concentração ácida e tipo de reator, afetam o nível de recuperação dos açúcares da hemicelulose, bem como a susceptibilidade da celulose residual à hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010; GALBE; ZACCHI, 2012; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Como a maioria dos trabalhos reportados na literatura se utiliza de materiais lignocelulósicos e condições operacionais de pré-tratamento diferentes, é difícil extrapolar os efeitos obtidos a partir de um substrato lignocelulósico avaliado para outro. Porém, alguns estudos têm aplicado o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em amostras de uma mesma espécie vegetal, mas com teores distintos dos componentes que as perfazem. Esse tipo de abordagem acaba expondo quais seriam as características químicas da biomassa vegetal que podem afetar a eficiência do pré-tratamento ácido. Por exemplo, Davison et al. (2006) reportaram a influência negativa do teor de lignina na recuperação de xilose, avaliando 5 variedades de *Populus* sp. pré-tratadas com ácido sulfúrico (175 °C, 1 % de ácido (m/m), 12 min). A maior recuperação

de xilose (55 %) foi obtida a partir da amostra menos lignificada (22,7 %), sendo que o material com 25,8 % de lignina proporcionou a recuperação de apenas 30 % de xilose. Os menores teores de lignina em amostras de sorgo forrageiro também beneficiaram os rendimentos de solubilização de xilose e conversão enzimática de celulose, quando o material foi pré-tratado à 121 °C, 1,75 % de ácido (m/v) por 60 min (DIEN et al., 2009). Fu et al. (2011), ao reduzirem a expressão do gene responsável pela síntese da enzima ácido cafeico-o-metiltransferase em *switchgrass*, obtiveram amostras menos lignificadas. A modificação composicional desta planta permitiu abrandar a severidade do pré-tratamento e, ao mesmo tempo, diminuir entre 3 e 4 vezes a carga enzimática necessária, para alcançar rendimentos de sacarificação e fermentação simultânea similares àqueles obtidos com a amostra controle. Em outro trabalho, o impacto da variabilidade composicional de 7 amostras de forragem de milho, de localidades distintas, foi avaliado diante do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (WEISS; FARMER; SCHELL, 2010). Para 185 °C, 0,04 % g ácido/g material e 45-75 s, pôde-se observar diferenças de 2 e 1,5 vezes nos rendimentos de recuperação de xilose e conversão enzimática da celulose, respectivamente. Porém, desta vez, os resultados não apresentaram qualquer relação com a lignificação dos materiais, e nem mesmo com os teores de celulose e hemicelulose. Nesse sentido, os autores observaram somente que o teor de cinzas apresentava alguma correlação com a eficiência do pré-tratamento e explicaram os resultados em função da capacidade de neutralização da matéria inorgânica contida nas amostras.

Mais específico para cana-de-açúcar, um grupo de pesquisa da África do Sul utilizou 115 híbridos experimentais, composicionalmente contrastantes, e os avaliaram como potenciais fontes de açúcar para produção de etanol (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013a; 2013b; BENJAMIN; GARCÍA-APARICIO; GÖRGENS, 2014). Basicamente, os híbridos de cana foram submetidos à uma série de condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (150-209 °C, 0-0,99 % de ácido m/m e 1,6-18,4 min) e avaliados quanto a recuperação de xilose no hidrolisado ácido, glicose oriunda da conversão enzimática da celulose, e ainda diante do rendimento total de açúcares (soma dos açúcares recuperados durante o pré-tratamento e conversão enzimática). Os híbridos responderam diferentemente às condições de pré-tratamento, mas algumas variedades demonstraram melhores rendimentos de xilose em mais de duas situações; o mesmo foi observado para a hidrólise enzimática e, conseqüentemente, nos rendimentos totais de açúcares. As condições brandas de pré-tratamento permitiram diferenciar melhor a susceptibilidade das plantas estudadas ao pré-tratamento ácido, de modo em que o aumento

da severidade tornou tal contraste menos evidente. Nas condições variadas de pré-tratamento, a diferença na recuperação final de açúcares chegou a 34 % entre as matérias-primas. No entanto, quando otimizados os pré-tratamentos, entre 74 e 87 % dos açúcares potenciais foram recuperados. Estes resultados demonstram a importância da biomassa e da condição de pré-tratamento na obtenção de rendimentos elevados. Apesar das diferenças, os autores descrevem que outras propriedades físico-químicas dos materiais, não refletidas na composição química, podem estar associadas à recuperação de xilose. Por outro lado, os rendimentos de hidrólise enzimática e açúcares totais se correlacionaram negativamente aos teores de lignina e cinzas; onde a recuperação total de açúcares foi favorecida a partir de híbridos com alto teor de carboidratos e baixos teores de lignina e cinzas. Na produção de etanol, os autores observaram que os maiores rendimentos foram alcançados utilizando amostras inicialmente menos lignificadas; tal característica ainda permitiu diminuir a carga enzimática durante a sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Os dados de etanol de sacarose (1ª geração) e do material fibroso (2ª geração) quando combinados, demonstraram que um híbrido experimental quase duplicaria a produção de etanol por hectare, comparado a uma cana-de-açúcar comercial local. De forma interessante, esta abordagem enfatiza a possibilidade de melhorar os rendimentos de produção de etanol por área plantada de cana-de-açúcar, através do desenvolvimento de novos cultivares mais susceptíveis aos pré-tratamentos e à hidrólise enzimática, sem comprometer o produto de interesse primário da planta – sacarose.

2.3.2. Hidrólise enzimática da fração celulósica de materiais lignocelulósicos

A hidrólise enzimática da celulose é dependente de um conjunto de enzimas, denominadas como celulasas. Basicamente, as celulasas são representadas por três diferentes classes: endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) e 1,4- β -D-glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglucanases hidrolisam as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) da cadeia celulósica aleatoriamente, diminuindo o grau de polimerização das cadeias de celulose. As exoglucanases, comumente conhecidas por celobiohidrolases (CBHs), atuam de maneira processiva e principalmente sobre regiões cristalinas das fibrilas de celulose; a celobiose é o principal produto da ação destas enzimas, porém alguns oligossacarídeos podem ser gerados. Essas celobiohidrolases ainda são diferenciadas em

CBHs I e CBHs II, pois estas enzimas iniciam a hidrólise da cadeia de celulose por suas extremidades redutoras e não redutoras, respectivamente. Por sua vez, as β -glicosidases hidrolisam moléculas de celobiose, e também de alguns celu-oligassacarídeos solúveis, à monômeros de glicose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; ZHANG; LYND, 2004).

Para hidrolisar completa e eficientemente as cadeias de celulose, as três classes de celulasas atuam sinergicamente (Figura 5). O sinergismo se inicia quando as enzimas endoglucanases, atuando sobre as cadeias celulósicas, aumentam o número de extremidades dessas cadeias. Esse fato beneficia as celobiohidrolases, pois essas enzimas clivam os oligossacarídeos somente a partir de extremidades livres. As β -glicosidases exercem um papel importante na eficiência da hidrólise da celulose, já que o acúmulo de celobiose, gerada pelas celobiohidrolases, pode inibir fortemente a ação das demais celulasas (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002; LYND et al., 2002; VÄLJAMÄE et al., 2003).

Figura 5 – Mecanismo de hidrólise da celulose por endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases

Fonte: adaptado de Vanholme et al. (2012)

Adicionalmente às celulasas, recentemente descobriu-se uma classe de enzimas capaz de atuar sobre as cadeias de celulose: as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) (HEMSWORTH et al., 2014). Essas enzimas promovem a clivagem oxidativa das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) entre os resíduos de anidroglicose das cadeias de celulose, principalmente em regiões cristalinas (AACHMANN et al., 2012; QUINLAN et al., 2011). A adição de LPMOs à misturas de celulasas têm contribuído no aumento significativo da

conversão enzimática de diferentes substratos lignocelulósicos (HARRIS et al., 2010; HU et al., 2014). Os extratos enzimáticos comerciais mais modernos, destinados à conversão enzimática de lignocelulósicos, já apresentam em suas formulações atividades de LPMOs. Com isso, estudos mostraram incrementos significativos (~20 %) nos rendimentos de conversão de materiais pré-tratados, em comparação a dados obtidos utilizando o extrato enzimático antecessor – sem LPMOs (CANELLA et al., 2012; TAI; KESHWANI, 2014).

2.3.2.1. Fatores físico-químicos da matriz lignocelulósica que afetam a conversão enzimática da celulose à glicose

A hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos visa a conversão da celulose à monômeros de glicose, os quais podem ser posteriormente convertidos em produtos de interesse comercial. No entanto, o sucesso da conversão enzimática depende das propriedades físicas e químicas desse tipo de substrato. As principais variáveis que afetam a hidrólise são relacionadas à supra-estrutura e à arquitetura da matriz lignocelulósica como um todo. Contudo, não se pode apontar qual característica da biomassa lignocelulósica impõe maior dificuldade à ação das celulasas (YANG et al., 2011).

Por exemplo, a influência da cristalinidade da celulose na hidrólise enzimática ainda parece contraditória. Alguns trabalhos sustentam que a eficiência da conversão enzimática é inversamente proporcional ao teor de celulose cristalina no substrato (FAN; LEE; BEARDMORE, 1981; SASAKI et al., 1979). Por outro lado, há trabalhos indicando que o teor de celulose cristalina no substrato não representa uma característica relevante na eficiência de hidrólise (PURI, 1984; THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992). Da mesma forma, a importância do grau de polimerização da celulose nos rendimentos de hidrólise enzimática é igualmente inconclusiva (YANG et al., 2011). Em meio a contradições, sugere-se que a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose não seriam os parâmetros mais influentes na recalcitrância de materiais lignocelulósicos frente às enzimas celulolíticas (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Na matriz das paredes celulares, as cadeias de celulose encontram-se recobertas por hemicelulose e lignina. Com isso, a remoção ou modificação desses dois componentes pode afetar positivamente a eficiência da hidrólise enzimática da celulose (YANG et al., 2011). A desacetilação da hemicelulose de diferentes substratos tem demonstrado

beneficiar a conversão enzimática da fração celulósica. Grohmann et al. (1989) mostraram o efeito negativo dos grupos acetil da hemicelulose na hidrólise enzimática de palha de trigo e madeira (*aspen*), sendo menos pronunciado após 75 % de remoção; vale destacar que, para esses valores de remoção, através de solução de hidroxilamina, a conversão inicial de celulose aumentou em 2-3 vezes. Com uma abordagem biológica, um trabalho recente promoveu a remoção enzimática (acetil-esterase) dos grupos acetil de amostras de cana-de-açúcar, o que também possibilitou melhorar a taxa e o rendimento da hidrólise enzimática da celulose (VÁRNAI et al., 2014). A hemicelulose quando menos acetilada torna-se mais susceptível às enzimas presentes nos complexos enzimáticos, aumentando a acessibilidade da celulose e, posteriormente, os rendimentos de conversão (GROHMANN et al., 1989; VÁRNAI et al., 2014).

Os ácidos hidroxicinâmicos também podem exercer um papel importante na hidrólise enzimática da celulose, pois fazem o "*cross-link*" entre a hemicelulose e a lignina contidas na matriz lignocelulósica (GRABBER; PANCIERA; HATFIELD, 2002; OLIVEIRA et al., 2014). Siqueira et al. (2011) utilizaram micro-espectrofotometria UV para estimar o conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos em células de vaso, parênquima e fibras de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores encontraram correlações lineares entre os rendimentos de conversão enzimática da celulose e os teores de ácidos hidroxicinâmicos para os diferentes tipos celulares, antes e após o pré-tratamento com clorito de sódio/ácido acético. No entanto, o efeito da remoção de ácidos hidroxicinâmicos se misturou com o efeito da remoção de lignina, visto que ambos os componentes foram removidos simultaneamente. No caso das células de parênquima, as quais não se mostraram lignificadas, a remoção dos ácidos hidroxicinâmicos foi fundamental para melhorar a digestibilidade da parede celular. Outro estudo com uma abordagem semelhante envolveu a avaliação de 19 amostras de plantas de milho (RIBOULET et al., 2007). Neste trabalho, plantas com maiores conteúdos de ácidos ferúlico e *p*-cumárico apresentaram a celulose menos susceptível à hidrólise enzimática. Em geral, nota-se que a remoção ou o menor conteúdo destes ácidos nos materiais facilitem o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos. Como contra ponto, Masarin et al. (2011) não observaram qualquer relação entre o teor de ácidos hidroxicinâmicos e a conversão enzimática da glucana de híbridos de cana-de-açúcar.

A eficiência da conversão enzimática de celulose à glicose tem sido relacionada diretamente com a remoção e/ou o teor de hemicelulose das biomassas lignocelulósicas (CANILHA et al., 2011; TAI; KESHWANI, 2014), sugerindo que esse constituinte

estrutural impede fisicamente o acesso das celulasas às cadeias de celulose (CHANDRA et al., 2007). Para bagaço de cana-de-açúcar, a remoção quase completa da hemicelulose, por pré-tratamentos ácidos ou hidrotérmicos, tem proporcionado converter enzimaticamente menos do que 70 % da celulose (CANILHA et al., 2011; ROCHA et al., 2013). No entanto, o real efeito da hemicelulose não pode ser facilmente isolado das demais transformações causadas pelo pré-tratamento, pois simultaneamente acontecem alterações na cristalinidade da celulose, na estrutura e na distribuição da lignina residual (JU; ENGELHARD; ZHANG, 2013). Os rendimentos de conversão enzimática da celulose podem ser aumentados com a remoção seletiva da hemicelulose, empregando xilanases (VÁRNAI et al., 2014); o que permite isolar o efeito desse componente estrutural e inferir sobre sua influência na intrínseca recalcitrância do material.

Assim como atribuído à hemicelulose, a lignina prejudica a hidrólise enzimática da celulose ao limitar fisicamente o acesso das celulasas à celulose (CHANDRA et al., 2007). Em nosso grupo de pesquisas, foram estabelecidas correlações entre a eficiência de conversão enzimática da celulose e os níveis de remoção seletiva da lignina de amostras de bagaço de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011, 2013; SANTI-JUNIOR et al., 2013). Nos últimos anos, o grupo também tem estudado um conjunto de 11 híbridos experimentais de cana-de-açúcar com teores contrastantes de lignina. A conversão enzimática desses híbridos foi avaliada e indicou que a celulose contida em matrizes menos lignificadas é mais susceptível à hidrólise enzimática (MASARIN et al., 2011; 2013). Neste estudo, os rendimentos de conversão foram correlacionados com os teores de lignina das amostras, onde o conteúdo de extrativos, ácidos hidroxicinâmicos, celulose e hemicelulose não puderam explicar os rendimentos de hidrólise enzimática. A relevância da lignina na hidrólise enzimática da celulose também já foi reportada para amostras de milho (RIBOULET et al., 2007) e álamo (STUDER et al., 2011). Para cana-de-açúcar, a leve diminuição do teor de lignina (através de hibridização) se torna uma estratégia viável para aumentar os rendimentos de hidrólise enzimática, já que este processo pode não comprometer a produção de sacarose e biomassa por área plantada (BENJAMIN; GARCÍA-APARICIO; GÖRGENS, 2014; MASARIN et al., 2011).

A hidrólise enzimática da celulose ainda pode ser prejudicada pela adsorção improdutiva das celulasas à lignina. A adsorção irreversível (improdutiva) das enzimas à superfície da lignina acontece por meio de interações hidrofóbicas lignina-celulasas; comprometendo os rendimentos de conversão por diminuir a disponibilidade de enzimas ativas no meio reacional. Porém, o nível de adsorção depende de características específicas

tanto da lignina, quanto das enzimas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SAMMOND et al., 2014). Por exemplo, Guo et al. (2014) demonstraram a maior capacidade (nesta ordem) das ligninas isoladas de pinheiro, forragem de milho, *aspen* e *kenaf* em adsorver celulasas produzidas por *Penicillium oxalicum* JU-A10-T. Dentre as enzimas, a celobiohidrolase foi a mais adsorvida pelas ligninas, seguida pelas endoglucanases e β -glicosidases. O conhecimento mais detalhado sobre o mecanismo responsável pela adsorção enzima-lignina abriria caminho para o desenvolvimento de novos coquetéis enzimáticos, contendo proteínas menos sujeitas à esse tipo de interação (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Por enquanto, a solução encontrada para prevenir a adsorção improdutiva das celulasas têm sido adicionar alguns aditivos (albumina, surfactantes, polímeros) ao meio reacional de hidrólise. Estes compostos se ligam aos sítios da lignina, os mesmos onde as enzimas se ligariam, garantindo com que as enzimas permanecem livres/ativas para promover a hidrólise da celulose (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; KUMAR et al., 2012; SANTOS et al., 2011). Contudo, provavelmente tal estratégia se restringirá à estudos laboratoriais, uma vez que a utilização desses compostos aumentaria o custo do processo e o tornaria financeiramente inviável (LIU; ZHU et al., 2010).

A matriz da parede celular vegetal apresenta uma porosidade, determinada pela estreita associação entre seus três principais constituintes estruturais (GARDNER et al., 1999). Naturalmente, as paredes celulares lignificadas apresentam baixa porosidade, o que dificulta a infiltração efetiva das celulasas nas matrizes lignocelulósicas. A importância da porosidade na hidrólise enzimática da biomassa foi evidenciada quando estudos mostraram correlações entre o volume de poros acessíveis às celulasas ($\sim 50 \text{ \AA}$) e a eficiência de conversão da celulose (GRETHLEIN, 1985; SANTI-JUNIOR et al., 2013; WONG et al., 1988). Porém, algumas vezes a porosidade do material não pôde explicar a conversão enzimática da celulose, indicando que outras propriedades do material (não refletidas na porosidade) poderiam influenciar os rendimentos (GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986; ISHIZAWA et al., 2007). Em comum, os trabalhos citados proporcionaram o aumento da porosidade dos substratos por meio de diferentes condições de pré-tratamento; simultaneamente, foi observada também a remoção de hemicelulose e a remoção e/ou redistribuição de lignina.

Diante da premissa que a hidrólise enzimática da celulose depende necessariamente da interação celulose-enzima para acontecer, a área superficial de celulose acessível às celulasas seria o principal fator limitante dos rendimentos de conversão enzimática

(YANG et al., 2011). Mesmo sem demonstrações experimentais, a maioria das descrições sobre pré-tratamentos atribuem a melhora da hidrólise enzimática ao aumento da acessibilidade das cadeias de celulose às celulases; pois parece claro que, o pré-tratamento, ao remover a lignina e/ou a hemicelulose depositadas sobre as fibrilas de celulose, aumenta a proporção de celulose “limpa” (ALVIRA et al., 2010; GALBE; ZACCHI, 2012; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MOSIER et al., 2005). Nesse sentido, Jeoh et al. (2007) mostraram o aumento da acessibilidade de celobiohidrolases (Cel7A, marcadas com sondas fluorescentes) à celulose de amostras de forragem de milho pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído; durante o desenvolvimento do estudo, os autores enfatizaram que mensurar alterações físicas, como porosidade e área superficial, seriam meios indiretos de investigar a digestibilidade enzimática de um material. De fato, a determinação da área superficial acessível de celulose tem sido utilizada para sustentar o rendimento de conversão enzimática de diferentes substratos lignocelulósicos (CHANDRA; SADDLER, 2012). Especificamente para cana-de-açúcar, os rendimentos de conversão enzimática das frações de epiderme, nó e entrenó, pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído (121 °C, 30 min e 5-20 g ácido/ 100 g de material), também foram explicados pela área de celulose acessível – mensurada com a adsorção de corantes (técnica de *Simons' stain*) (BRIENZO et al., 2014). Estudos mais detalhados sobre a área superficial acessível de celulose poderiam identificar características estruturais do material que, adequadamente alteradas pelo pré-tratamento, forneceria uma melhor perspectiva de rendimentos mais elevados de conversão enzimática da celulose (YANG et al., 2011).

Em nosso grupo de pesquisa, a característica anatômica de 3 híbridos experimentais de cana-de-açúcar também foi identificada como um fator determinante na eficiência da hidrólise enzimática (COSTA et al., 2013). Isso porque se correlacionou, de maneira inversamente proporcional, a área ocupada por feixes vasculares com os rendimentos de conversão da celulose em 3 diferentes regiões do entrenó. Nesse estudo, ainda foi verificado que a soma dos teores de hemicelulose e lignina (constituintes que recobrem a celulose) pode explicar melhor o nível de conversão enzimática das regiões do entrenó, e não o teor isolado de cada componente. Este resultado permitiu ao grupo propor um parâmetro empírico de predição de conversão de celulose, considerando o efeito positivo do alto teor celulose e dos baixos teores de lignina e hemicelulose, e o efeito negativo dos feixes vasculares das amostras. Os níveis de conversão de celulose nesse estudo se ajustaram bem ao parâmetro mencionado ($R^2 = 0,96$), seguindo um modelo polinomial de segunda ordem.

3. OBJETIVO

O objetivo principal da presente tese foi avaliar o comportamento de híbridos de cana-de-açúcar, contrastantes quanto aos teores de hemicelulose e lignina, diante do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e determinar como isso reflete nos rendimentos de conversão enzimática da glucana à glicose.

Para atingir tal objetivo, foram executadas as etapas descritas:

- Avaliar o efeito de diferentes condições de pré-tratamento com ácido nos componentes estruturais da parede celular dos híbridos de cana-de-açúcar;
- Avaliar a solubilização dos polissacarídeos dos híbridos através da quantificação de oligossacarídeos e monossacarídeos nos hidrolisados oriundos do pré-tratamento ácido;
- Avaliar como a remoção progressiva da fração hemicelulósica afeta a conversão enzimática da glucana;
- Remover parcial e seletivamente a lignina das amostras já pré-tratadas com ácido sulfúrico e determinar o efeito da diminuição do conteúdo de lignina na hidrólise enzimática das amostras;
- Determinar o efeito dos tratamentos nas características microestruturais das paredes celulares dos híbridos e correlacionar tais parâmetros com a eficiência da conversão enzimática da glucana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Híbridos de cana-de-açúcar

Os híbridos de cana-de-açúcar 89, 140 e 321 (denominados H89, H140 e H321, respectivamente) foram selecionados dentro de um grupo de plantas desenvolvidas experimentalmente por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (projeto CNPq 552741/2007-8, coordenador Dr. Márcio Barbosa), associados à RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Esses três híbridos experimentais foram escolhidos por exibirem características contrastantes de composição química e recalcitrância à hidrólise enzimática (MASARIN et al., 2011). As sementes resultantes do processo de hibridação foram plantadas em bandejas e mantidas por 30 dias em casa de vegetação. Quando crescidas, as plântulas foram transferidas para o campo, gerando as plantas utilizadas para a propagação vegetativa subsequente. O plantio dos híbridos foi realizado em maio de 2007, em linhas de 5 m de comprimento no campo experimental de Oratórios, MG, Brasil (20°25'50" de latitude sul e 42°48'20" de longitude oeste). Em julho de 2009 o material foi colhido, com 12 meses de cultivo (2º corte), o qual foi utilizado em todos os experimentos da presente tese.

Os híbridos foram submetidos à uma máquina “picadeira”, onde a maior fração obtida apresentava fragmentos entre 5 e 10 mm de comprimento. Em seguida, o material foi lavado com água (torneira) para remoção da sacarose. Para evitar a perda de partículas finas (<0,2 mm de comprimento), o material foi lavado no interior de uma coluna de PVC (1 m de comprimento e 150 mm de diâmetro), equipada de uma tela de aço de 200 *mesh* na sua base. As partículas não retidas pela tela foram bombeadas de volta para dentro da coluna, as quais foram eficientemente retidas pela própria camada formada pelas maiores fibras. A passagem de água corrente pela coluna foi cessada quando não era possível detectar açúcar pela metodologia de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O material resultante foi armazenado em freezer a -18 °C, até o momento de sua utilização.

4.2. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

O pré-tratamento ácido dos híbridos de cana-de-açúcar foi conduzido em reatores de aço-inox de 800 mL, mantidos em banho de silicone termostatizado. Os reatores foram carregados com 20 g do material lignocelulósico (massa seca) e submetidos à 30 min de vácuo. A etapa de impregnação do material foi completa com a adição da solução ácida ao reator (13 g ácido sulfúrico/100 g de material), mantendo o vácuo por mais 15 min. A massa reacional correspondeu a um total de 400 g, incluindo amostra, ácido e água destilada. Foram necessários aproximadamente 25 min para atingir a temperatura de trabalho desejada (150 °C) – rampa de aquecimento. Ao alcançar tal temperatura, os pré-tratamentos foram conduzidos por tempos que variaram entre 20 e 90 min. Em seguida, os reatores foram retirados do banho de silicone e resfriados em banho de gelo. Finalizada a etapa de pré-tratamento, o material resultante (sólido e líquido) foi filtrado em papel de filtro. A fração líquida obtida (hidrolisado ácido) foi armazenada em freezer (-18 °C); enquanto isso, o sólido retido no papel de filtro (amostra de híbrido pré-tratado com ácido) foi lavado com 4000 mL de água destilada, e seco à temperatura ambiente.

4.2.1. Composição dos hidrolisados ácidos

Os hidrolisados ácidos dos pré-tratamentos (20–90 min) foram caracterizados quanto à concentração de glicose, xilose, arabinose e ácido acético. Em paralelo, determinou-se, de forma indireta, quanto desses componentes estavam presentes como oligômeros (grau de polimerização ≥ 2), submetendo os hidrolisados a uma etapa de pós-hidrólise. Para isso, a concentração ácida dos hidrolisados foram ajustadas para 4 % (m/m), utilizando solução de ácido sulfúrico 72 % (m/m); e posteriormente, autoclavados a 121 °C, durante 60 min (SLUITER et al., 2008). A quantidade de oligômero foi determinada pela diferença das concentrações de monômeros detectadas nos hidrolisados depois e antes da pós-hidrólise (Equação 1).

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna Bio-Rad HPX-87H mantida a 45°C, ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel e fluxo de 0,6 mL/min. Os

açúcares e o ácido acético foram detectados por meio de um detector de índice de refração (Waters 2414), com temperatura controlada de 35 °C. Antecedendo a aplicação das amostras ao aparelho de HPLC, as mesmas foram filtradas em Sep-Pak C18.

$$\text{Oligômero (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{CMi} \cdot 100}{\text{CMf}} \right) \quad (1)$$

Onde CMi é a concentração de monômero de um determinado componente do hidrolisado ácido; CMf é a concentração de monômero do mesmo componente no hidrolisado após sua pós-hidrólise.

4.3.Deslignificação das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico

Os híbridos de cana-de-açúcar pré-tratados com ácido sulfúrico (90 min) foram submetidos à um tratamento subsequente de deslignificação, utilizando solução aquosa de clorito de sódio/ácido acético (BROWNING, 1967). Para cada g de material pré-tratado, foram utilizados 0,3 g de clorito de sódio, 0,1 mL de ácido acético e 32 mL de água destilada. Dentro de um becker, a mistura foi mantida entre 70 e 80 °C, durante 15 e 30 min. Na reação de 30 min, adicionou-se uma nova carga de clorito de sódio e ácido acético após 15 min. Terminados os tempos de reação, os materiais foram resfriados em banho de gelo e filtrados em papel de filtro. O material retido no filtro (amostra de híbrido subsequentemente deslignificada) foi lavado com 80 mL de água destilada, 20 mL de acetona e seco à temperatura ambiente.

4.4.Determinação da composição química das amostras de híbridos de cana

Híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequentemente deslignificados foram quimicamente caracterizados, seguindo a metodologia descrita por Ferraz et al. (2000). Para determinação dos compostos extraíveis, aproximadamente 3 g de amostra foi extraída em aparelho Soxhlet com etanol (95 %), durante 6 h. O teor de extraíveis foi estabelecido pela diferença das massas da amostra extraída e não extraída.

Para a determinação de glucana, hemicelulose e lignina, 300 mg de amostra extraída foi submetida à hidrólise ácida em 2 estágios. O primeiro dos estágios, conduzido com 3 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72 % (m/m) a 30 °C, por 60 min. Posteriormente, esta mistura foi então diluída com 79 mL de água destilada e autoclavada a 121 °C, por 60 min (2º estágio). O material resultante desta etapa foi filtrado em filtro de vidro poroso (nº 3), sendo seco a 105 °C e utilizado na quantificação de lignina insolúvel. No filtrado, a concentração da lignina solúvel em meio ácido foi determinada pela leitura da absorbância em 205 nm, considerando a absorvidade molar da lignina como 105 L.g⁻¹.cm⁻¹. A concentração de açúcares monoméricos e do ácido acético no filtrado foi determinada por HPLC (como descrito na seção “Composição dos hidrolisados ácidos”). Diante disso, utilizou-se fatores para converter monômeros às suas formas poliméricas: 0,90 para glicose (glucana), 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para grupos acetila (hemicelulose).

4.5. Hidrólise enzimática das amostras de híbridos de cana-de-açúcar

Duas preparações enzimáticas comerciais, derivadas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma-Aldrich, C2730) e *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, C6105), foram utilizadas na hidrólise enzimática dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético. Estes experimentos foram conduzidos com 10 FPU e 20 UI de β-glicosidase/g amostra; para alcançar tais cargas enzimáticas, o volume de extrato adicionado aos ensaios foi baseado nos valores de atividade previamente determinados pelo nosso grupo de pesquisa (Tabela 1).

As diferentes amostras dos híbridos foram submetidas ao moinho de facas até o material passar por uma malha de 20 *mesh*. O material moído foi então empregado como substrato nos ensaios de hidrólise enzimática. Os experimentos foram conduzidos em tubos de centrífuga (50 mL), contendo: 0,2 g de amostra (massa seca), extratos enzimáticos e tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica); o volume final da reação foi de 10 mL. Os tubos foram mantidos em agitação recíproca de 120 rpm a 45 °C, durante o período de 72 h. Em determinados intervalos de tempo, alíquotas foram coletadas e submetidas a água fervente por 5 min; em seguida, as mesmas alíquotas foram centrifugadas durante 30 min (4500 g). A concentração de glicose nos sobrenadantes foi

determinada em HPLC (descrito na seção “Composição dos hidrolisados ácidos”) e utilizada para estabelecer os rendimentos de conversão enzimática da glucana das diferentes amostras (Equação 2).

Tabela 1 – Atividades enzimáticas e teor de proteína em preparações enzimáticas comerciais (VALADARES, 2013)

	Preparação enzimática comercial	
	<i>Trichoderma reesei</i> (Sigma-Aldrich C2730)	<i>Aspergillus niger</i> (Sigma-Aldrich C6105)
Celulase total (FPU.mL ⁻¹)	45±2	nd
Endoglucanase (UI.mL ⁻¹)	549±54	nd
Celobiohidrolase (UI.mL ⁻¹)	101±11	nd
β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	77±2	752±2
Xilanase (UI.mL ⁻¹)	485±10	2517±25
β-xilosidase (UI.mL ⁻¹)	29±0,4	8±1
Proteína (mg.mL ⁻¹)	107±5	62±3

nd = não detectado.

$$\text{Conversão de glucana (\%)} = \left(\frac{(cG \cdot VR) \cdot 0,9}{Mi} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde cG é a concentração de glicose no sobrenadante (g/L); VR é o volume total da reação (L); Mi é a massa inicial de glucana (g) adicionada à reação.

Paralelamente, e nas mesmas condições descritas acima, as amostras de híbridos também foram hidrolisadas enzimaticamente em tampão acetato de sódio contendo 1 % (m/v) de albumina bovina (YANG; WYMAN, 2006). Todos os ensaios de hidrólise enzimática do presente estudo foram realizados em triplicata.

4.6.Determinação do volume de poros e da acessibilidade das amostras de híbridos de cana-de-açúcar

A técnica de exclusão de solutos (STONE; SCALLAN, 1968) foi utilizada para caracterizar o volume de poros e a acessibilidade das paredes celulares dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico (90 min) e subsequentemente deslignificados (30

min); porém, conduzida em menor escala e com número reduzido de sondas moleculares. Quatro diferentes sondas moleculares (dextranas) foram escolhidas para a realização deste experimento, cujas massas moleculares e diâmetros estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Características das sondas moleculares (dextranas) utilizadas na técnica de exclusão de solutos

Sondas	Massa molar (g/mol)	¹ Diâmetro (Å)	Fornecedor
Dextran T6	6.000	44	Pharmacosmos
Dextran T10	10.000	55	
Dextran T20	20.000	74	
Dextran T2000	2.000.000	553	

¹ = dados de Oliver III et al. (1992).

Primeiramente, soluções das sondas moleculares foram preparadas em água destilada (~1,5 %, m/m); sendo reservada uma alíquota de cada solução para determinar sua exata concentração inicial (C_i). Os ensaios foram conduzidos em tubos de microcentrífuga (2 mL), contendo aproximadamente: 0,1 g de amostra (massa seca) e 2 g da solução de sonda molecular; este procedimento foi repetido para cada uma das 4 diferentes sondas moleculares avaliadas, em duplicata. O “branco” do experimento foi realizado nas mesmas condições descritas acima, havendo apenas a substituição da solução de sonda por água destilada. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 24 h, e agitados de forma manual e ocasional durante este período. Ao final, os tubos foram centrifugados a 4000 g e os sobrenadantes recolhidos para análise da concentração final de dextrana na solução (C_f). A concentração inicial e final das sondas nas soluções foi determinada utilizando-se um detector de índice de refração (Waters 2414). Para isso, água destilada foi utilizada como fase móvel (0,4 mL/min), com aplicação de 20 µL de amostra (solução) e manutenção do detector a 32 °C. A concentração de dextrana nas soluções foi determinada com o auxílio de curvas de calibração, previamente construídas para cada uma das dextranas (sondas moleculares) avaliadas.

O volume inacessível (v_i) (mL água/g amostra seca) das amostras, referente a cada uma das 4 sondas testadas, foi calculado com a equação 3 (ISHIZAWA et al., 2007):

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

Onde W é a massa da solução de dextrana (g); q é a massa de água na amostra (g); p é a massa seca da amostra (g); C_i e C_f são as concentrações inicial e final da solução de uma sonda específica, respectivamente.

Todo o volume de água inacessível à sonda de 553 Å foi considerado como o volume total de poros na parede celular das amostras (STONE; SCALLAN, 1968); por definição, o volume total de poros é chamado também de ponto de saturação da fibra (FSP) (SCALLAN; CARLES, 1972). Sendo assim, determina-se o volume de poros acessível à uma sonda específica (V_a) entre a diferença do valor do ponto de saturação da fibra (d_s) e o volume de poro inacessível da amostra àquela sonda específica (d_i), como demonstrado pela Equação 4 (ISHIZAWA et al., 2007)

$$V_a = d_s - d_i \quad (4)$$

Paralelamente às amostras dos híbridos, duas amostras de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e tratada com solução aquosa de clorito de sódio/ácido acético por 4 h (ambas secas ao ar), também foram caracterizadas quanto ao volume de poros e acessibilidade. Trata-se de amostras com volumes de poro e acessibilidade já determinados em nosso grupo de pesquisa (SANTI-JUNIOR et al., 2013). Os resultados experimentais (duplicatas) de volume inacessível referentes as 4 sondas propostas, obtidos por Santi-Junior et al. (2013) e durante todo o presente estudo, foram ajustados com modelos logarítmicos. A partir dos dados modelados de volume inacessível, o volume acessível das diferentes amostras às diferentes sondas foi calculado.

4.7.Determinação do valor de retenção de água das amostras de híbridos de cana-de-açúcar

O valor de retenção de água dos híbridos não tratados e das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico (90 min) e subsequentemente deslignificadas (30 min), foi determinado de acordo com o método proposto por Guo et al. (2011). Durante 24 h, cerca de 1,0 g de amostra foi mantido imerso em 100 mL de água destilada. Após este tempo, a amostra foi transferida para um aparato de centrifugação, composto por módulo de ultrafiltração (Millipore, Amicon Ultra-15), tubo de 50 mL e malha de aço de 200 *mesh*.

Após a centrifugação (4505 g por 15 min), a massa de amostra retida na malha de aço foi determinada e então o material foi mantido em estufa a 105 °C, até massa constante. Determinadas as massas da amostra antes (úmida, após a centrifugação) e depois da secagem em estufa, o valor de retenção de água (WRV) foi calculado com a Equação 5:

$$WRV = \left(\frac{m_0 - m_1}{m_1} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde m_0 é a massa da amostra úmida; m_1 é a massa da amostra seca a 105 °C.

4.8.Determinação da área superficial acessível de glucana das amostras de híbridos de cana-de-açúcar

A glucana acessível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (90 min) e subsequente deslignificados (30 min) foi determinada pela técnica de coloração diferencial proposta por Simons (1950); e aprimorada ao longo dos anos por outros pesquisadores (CHANDRA et al., 2008, 2009; CHANDRA; SADDLER, 2012; YU; MINOR; ATALLA, 1995). O mesmo ensaio aplicado aos híbridos de cana-de-açúcar foi empregado para determinar a porção de glucana acessível em um material de referência, que compreendeu a uma amostra de polpa de dissolução. Este substrato é composto quase que exclusivamente de glucana (≥ 96 %, m/m) (HU et al., 2014), o qual foi gentilmente cedido pelo *Forest Products Laboratory - USDA Forest Service*.

Primeiramente, soluções dos corantes laranja (Direct Orange (DO), Pontamine Fast Orange 6RN, lote nº 814071) e azul (Direct Blue (DB), Pontamine Fast Sky Blue 6BX, lote nº 327081) foram preparadas em concentrações iniciais de 10 mg/mL. A solução do corante laranja foi submetida à ultrafiltração, utilizando um aparato de filtração Amicon sob pressão de nitrogênio (28 psi), e membrana de 100 kDa. Restando cerca de 20 % do volume inicial da solução, a membrana foi trocada e este procedimento repetido por mais duas vezes. A concentração da solução de DO retida na ultrafiltração foi determinada através de secagem até massa constante (em estufa a 105 °C), e então reajustada para 10 mg/mL com água destilada. O corante DB foi empregado sem prévia purificação.

Em tubos com tampa plástica (2 mL), foram adicionados 10 mg de amostra (massa seca), 100 µL de tampão fosfato salino 0,3 mol/L (NaCl 1,4 mmol/L, pH 6,0) e água deionizada. A adição de água variou para que o volume reacional final fosse ajustado para 1,0 mL, devido aos diferentes volumes de água da amostra (umidade) e das soluções de corantes adicionadas. Seis diferentes concentrações dos corantes DO e DB foram avaliadas simultaneamente, adicionando 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µL da solução de cada corante à cada uma das condições. Esta mistura então permaneceu por 6 h a 70 °C, sob agitação recíproca de 200 rpm. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada (1800 g, 5 min) e o sobrenadante teve a absorbância determinada em espectrofotômetro, a 455 e 624 nm. A concentração dos corantes DO e DB na solução foi determinada utilizando as equações 6 e 7, respectivamente

$$[DO] = \frac{(\epsilon_{DB624} \times A_{455}) - (\epsilon_{DB455} \times A_{624})}{(\epsilon_{DO455} \times \epsilon_{DB624}) - (\epsilon_{DB455} \times \epsilon_{DO624})} \quad (6)$$

$$[DB] = \frac{(\epsilon_{DO455} \times A_{624}) - (\epsilon_{DO624} \times A_{455})}{(\epsilon_{DO455} \times \epsilon_{DB624}) - (\epsilon_{DB455} \times \epsilon_{DO624})} \quad (7)$$

Onde ϵ_{DB455} e ϵ_{DB624} corresponde a absorvidade molar ($L g^{-1} cm^{-1}$) do corante azul em 455 e 624 nm, respectivamente; ϵ_{DO455} e ϵ_{DO624} corresponde a absorvidade molar ($L g^{-1} cm^{-1}$) do corante laranja em 455 nm e 624 nm, respectivamente; e A_{455} e A_{624} são os valores de absorbância das soluções em 455 nm e 624 nm, respectivamente.

A quantidade de corante adsorvido nas amostras foi determinada entre a diferença da quantidade de corante adicionado inicialmente (solução 10 mg/mL) e a quantidade de corante no sobrenadante após 6 h de incubação. Com esses valores, foram construídas isotermas para cada um dos corantes, relacionando adsorção de corante (mg corante/g amostra) com a concentração de corante no sobrenadante (mg/mL). A caracterização da área superficial acessível de glucana das amostras foi calculada através da razão entre os valores máximos de adsorção obtidos para os corantes laranja e azul (DO/DB).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento dos híbridos de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído

Os três híbridos de cana-de-açúcar foram submetidos à diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, buscando observar o efeito do ácido nos principais componentes da parede celular. Um dos primeiros critérios de avaliação de um processo de pré-tratamento é o rendimento de recuperação de sólidos. Para os três híbridos avaliados, os rendimentos foram diminuídos conforme a severidade do pré-tratamento ácido (Tabela 3) o que era esperado, pois a hidrólise ácida promove a solubilização progressiva dos componentes da biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989). No entanto, H89 se diferenciou dos demais híbridos ao apresentar rendimentos nitidamente menores para todas as condições de pré-tratamento; apenas 53,1 % da massa foi recuperada na maior severidade de pré-tratamento. Por outro lado, os rendimentos dos híbridos H140 e H321 foram semelhantes entre si, em meio as diferentes severidades de pré-tratamento, apresentando rendimentos mínimos de 62,0 e 64,4 %, respectivamente. Os resultados classificam o H89 como a planta (biomassa) mais susceptível à ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. A vulnerabilidade dos híbridos ao pré-tratamento ácido poderia estar associada às características anatômicas e químicas. Do ponto de vista anatômico, um dado interessante a respeito dos híbridos em estudo foi reportado por Costa et al. (2013). Os autores observaram que a área de um entrenó ocupada por feixes vasculares no H140 é expressivamente superior ao do H89. Estes dados sugerem que a hidrólise (solubilização) elevada observado no H89 e a baixa no H140 pode estar associada a maior presença de fibras e vasos no H140; sendo este tipo celular mais resistente à hidrólise do que as células de parênquima, as quais são mais abundantes no H89.

Do ponto de vista da composição química, a hemicelulose foi o constituinte estrutural da parede celular mais susceptível ao pré-tratamento ácido (Tabela 3). A eficiência de remoção da hemicelulose dos híbridos aumentou junto ao tempo do pré-tratamento, o que está de acordo com outros trabalhos da literatura que estabeleceram a significância do tempo de pré-tratamento com ácido sulfúrico na remoção de hemicelulose de materiais lignocelulósicos (CANILHA et al., 2011; SCHELL et al., 2003; ZHANG et al., 2014). Por outro lado, o nível da eficiência pronunciou-se diferentemente para os três

híbridos de cana (Tabela 3). Para a condição mais branda de pré-tratamento (20 min), quase duas vezes mais hemicelulose foi removida do H321 (42,2 %) em comparação ao obtido para os outros dois híbridos, H89 (24,8 %) e H140 (20,5 %). As eficiências de remoção de hemicelulose tornaram-se mais semelhantes nos tempos mais longos de pré-tratamento avaliados, pois a solubilização de hemicelulose atingiu valores próximos à remoção completa deste componente (86,0–90,7 %, após 90 min de reação). O maior nível de remoção inicial de hemicelulose no H321 poderia estar associado com o maior teor deste componente nesse híbrido, comparado aos outros dois em estudo e/ou à disposição da hemicelulose nas paredes. Pode-se supor que a maior exposição da hemicelulose no H321 a tornaria mais susceptível à hidrólise ácida nos tempos curtos de reação (20 min). Acompanhada das remoções de hemicelulose citadas anteriormente, os pré-tratamentos originaram amostras de H89 (27,3–4,8 %), H140 (27,0–6,1 %) e H321 (31,0–5,5 %) com teores variados de hemicelulose, inicial e final, respectivamente, conforme indicado entre parênteses. Os híbridos de cana tiveram seus teores originais de hemicelulose diminuídos em mais de 20 pontos percentuais, quando submetidos à máxima severidade de pré-tratamento.

Outro aspecto relevante do processo de pré-tratamento com ácido diluído é a extensão da desacetilação e desramificação da hemicelulose. Está bem documentado na literatura que algumas enzimas hemicelulolíticas não atuam em ligações glicosídicas próximas às ramificações (BIELY, 2012; PULS, 1997). Desta forma, avaliar a remoção de grupos acetila e arabinosil durante o pré-tratamento se mostra relevante. Os dados da Tabela 4 mostram que os teores de grupos acetila das amostras diminuíram em função da severidade do pré-tratamento, de maneira gradual e similar para os três híbridos; partindo de 2,6–3,0 % para os híbridos não tratados até 0,5–0,6 %, após 90 min de pré-tratamento. Quanto aos grupos arabinosil, se nota que os teores das amostras diminuíram de forma mais acentuada (Tabela 4). Na condição mais branda do pré-tratamento ácido (20 min), o teor de grupos arabinosil dos híbridos H89, H140 e H321 foi de 2,4 %, 2,0 % e 2,7 % para 0,7 %, 0,8 % e 0,7 %, respectivamente; chegando a 0,2 % nas amostras pré-tratadas por 90 min. A estrutura original da hemicelulose dos híbridos exibe 10 resíduos de xilose para 1 de arabinose e 3,5–4 de ácido acético, independente do híbrido avaliado. O pré-tratamento ácido promoveu a remoção eficiente desses três constituintes, porém somente a proporção de arabinose foi consideravelmente alterada. Estes dados sugerem que a remoção de xilose e ácido acético aconteceu na mesma extensão, já que se obteve hemiceluloses residuais menos ramificadas por grupos arabinosil, mas igualmente acetiladas.

Tabela 3 – Composição química, rendimento e remoção dos constituintes estruturais da parede celular dos híbridos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

Híbrido	* Amostra	Composição química (% m/m)				Rendimento (%)	Remoção (% g/100 g constituinte)		
		Extraíveis	Glucana	Hemicelulose	Lignina		Glucana	Hemicelulose	Lignina
89	não tratada	7,5±0,1	40,3±0,1	27,3±0,3	16,8±0,1	100,0	0	0	0
	20 min	3,8±0,1	41,9±0,0	24,6±0,7	20,4±0,2	82,8	14,0	24,8	0
	30 min	7,5±0,1	53,8±2,2	12,8±0,4	21,1±0,2	63,0	16,0	70,5	20,9
	40 min	7,6±0,2	54,1±1,0	11,6±0,2	21,5±0,1	62,1	16,6	73,8	20,5
	60 min	7,6±0,3	58,8±0,5	7,4±0,1	22,1±0,1	59,8	12,8	84,7	21,4
	90 min	8,0±0,1	64,4±0,2	4,8±0,1	21,8±0,1	53,1	15,1	90,7	31,1
140	não tratada	5,1±0,5	38,2±0,5	27,0±0,3	21,5±0,2	100,0	0	0	0
	20 min	3,6±0,2	39,0±0,3	24,2±0,2	24,8±0,2	88,8	9,4	20,5	0
	30 min	6,4±0,5	47,5±1,2	14,0±0,5	26,7±0,3	72,8	9,5	62,3	9,7
	40 min	7,0±0,3	49,8±0,3	11,2±0,1	27,0±0,2	68,5	10,8	71,6	14,0
	60 min	9,1±0,1	52,0±0,7	8,4±0,5	27,0±0,4	65,3	11,2	79,7	18,1
	90 min	8,2±0,2	57,0±1,8	6,1±0,2	25,9±0,2	62,0	7,5	86,0	25,3
321	não tratada	1,6±0,3	40,4±0,5	31,0±1,0	20,2±0,4	100,0	0	0	0
	20 min	3,4±0,2	46,4±0,3	21,3±0,1	24,1±0,1	84,1	3,4	42,2	0
	30 min	5,4±0,0	49,8±0,1	16,7±0,5	24,0±0,2	78,5	3,3	57,7	6,8
	40 min	7,8±0,1	55,3±0,6	8,7±0,4	25,2±0,2	68,7	5,9	80,7	14,3
	60 min	7,6±0,0	57,7±0,1	7,9±0,1	25,1±0,2	67,7	3,3	82,7	15,9
	90 min	10,0±0,2	59,0±0,2	5,5±0,1	24,8±0,5	64,4	5,9	88,6	20,9

* = híbridos não tratados e após diferentes tempos de pré-tratamento com ácido sulfúrico (150 °C, 13 g ácido/100g material); Os dados de composição química são valores médios de triplicatas, seguido de seus desvios padrão.

Tabela 4 – Teor e remoção dos constituintes que compõe a hemicelulose dos híbridos de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

Híbrido	*Amostra	Hemicelulose (% , g/100 g material)			**Rendimento (%)	Remoção (% , g/100 g constituinte)			#Hemicelulose (razão molar)		
		Xilana	Arabinosil	Acetil		Xilana	Arabinosil	Acetil	Xilose	Arabinose	Ácido acético
89	não tratada	22,1±0,2	2,4±0,0	2,8±0,1	100,0	0	0	0	10	1,1	3,9
	20 min	21,4±0,2	0,7±0,4	2,7±0,0	82,8	19,9	75,9	20,2	10	0,3	3,9
	30 min	11,1±0,4	0,4±0,0	1,3±0,0	63,0	68,4	89,5	70,8	10	0,4	3,6
	40 min	10,1±0,2	0,4±0,0	1,0±0,0	62,1	71,6	89,7	77,8	10	0,4	3,0
	60 min	7,0±0,1	0,1±0,0	0,3±0,0	59,8	81,1	97,5	93,6	10	0,1	1,3
	90 min	4,1±0,0	0,2±0,0	0,5±0,1	53,1	90,1	95,6	90,5	10	0,5	3,7
140	não tratada	22,4±0,2	2,0±0,1	2,6±0,1	100,0	0	0	0	10	0,9	3,6
	20 min	20,2±0,2	0,8±0,0	3,2±0,0	88,8	20,0	64,5	0,0	10	0,4	4,9
	30 min	12,0±0,4	0,4±0,0	1,6±0,1	72,8	61,0	85,5	55,2	10	0,3	4,1
	40 min	9,6±0,1	0,4±0,0	1,2±0,0	68,5	70,7	86,3	68,4	10	0,4	3,8
	60 min	6,8±0,1	0,3±0,0	1,3±0,5	65,3	80,2	90,2	67,4	10	0,4	5,9
	90 min	5,2±0,2	0,3±0,0	0,6±0,1	62,0	85,6	90,7	85,7	10	0,6	3,5
321	não tratada	25,3±0,7	2,7±0,2	3,0±0,7	100,0	0	0	0	10	1,1	3,6
	20 min	18,1±0,1	0,7±0,1	2,5±0,2	84,1	39,8	78,2	29,9	10	0,4	4,2
	30 min	14,6±0,5	0,6±0,1	1,5±0,2	78,5	54,7	82,6	60,8	10	0,4	3,2
	40 min	7,5±0,4	0,3±0,0	0,9±0,0	68,7	79,6	92,4	79,4	10	0,4	3,7
	60 min	6,9±0,0	0,3±0,0	0,7±0,1	67,7	81,5	92,5	84,2	10	0,4	3,1
	90 min	4,8±0,1	0,2±0,0	0,5±0,1	64,4	87,8	95,2	89,3	10	0,4	3,2

* = híbridos não tratados e após diferentes tempos de pré-tratamento com ácido sulfúrico (150 °C, 13 g ácido/100g material); ** = rendimento do processo de pré-tratamento; # = proporção dos constituintes que perfazem a hemicelulose; Os dados de composição química são valores médios de triplicatas, seguido de seus desvios padrão

A diminuição de hemicelulose nas amostras levou ao enriquecimento das mesmas em glucana e lignina (Tabela 3). Porém, observou-se que ambos os constituintes estruturais também foram parcialmente removidos durante o pré-tratamento ácido. A eficiência de remoção de glucana diferiu para os três híbridos; em ordem de susceptibilidade, encontram-se as glucanas dos híbridos H89 (15 %), H140 (10 %) e H321 (4 %). A remoção de glucana foi detectada já nos tempos curtos de reação (20 min), para os três híbridos, e se manteve constante ao longo dos pré-tratamentos. Martin et al. (2007) também observaram mínima variação na remoção da glucana de bagaço de cana-de-açúcar submetido à diferentes condições de pré-tratamento com ácido (8 g H₂SO₄/100 g bagaço; 122 °C; 20–60 min), removendo menos do que 10 % do conteúdo original de glucana. O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído solubiliza preferencialmente a fração amorfa da glucana presente na biomassa vegetal (LI et al., 2010). Considerando isto, e a máxima remoção de glucana dos híbridos ter ocorrido já na condição branda de pré-tratamento, os resultados permitem inferir que a quantidade (constante) solubilizada representa a porção amorfa de glucana nos materiais; dado este, que evidencia a diferença no teor total deste tipo de glucana dos três híbridos. Porém, não há como inferir sobre a origem da glucana removida, se provém de celulose amorfa, glucanas mistas, glucomanas ou dos três tipos de componentes simultaneamente.

Diferente da hemicelulose e da glucana, a condição mais branda do pré-tratamento ácido (20 min) não foi capaz de atuar na lignina dos híbridos, a ponto de removê-la dos materiais (Tabela 3). A remoção iniciou aos 30 min de pré-tratamento, observando que, para esta condição, a remoção de lignina do H89 (20,9 %) foi duas e três vezes maior do que a dos híbridos H140 (9,7 %) e H321 (6,8 %), respectivamente. Tal diferença oscilou nas demais condições de pré-tratamento avaliadas, alcançando remoções máximas ao final de 90 min: 31,1 % (H89), 25,3 % (H140) e 20,9 % (H321). A eficiência com que a remoção de lignina ocorreu durante o pré-tratamento pode estar relacionada à sua característica estrutural. A proporção de grupos siringil e guaiacil (S/G) da lignina de *switchgrass* diminuiu de 0,8 para 0,5 após o pré-tratamento com ácido sulfúrico (SAMUEL et al., 2010); este dado, por exemplo, aponta para a solubilização preferencial de unidades siringil em meio ácido. Neste trabalho, ainda se pôde observar que o tratamento ácido diminuiu substancialmente o teor de lignina solúvel da amostra. Este comportamento também foi observado para a lignina dos híbridos de cana avaliados na presente tese, onde esse efeito foi se tornando mais pronunciado com o aumento da severidade do pré-tratamento (Tabela 5). De forma similar ao obtido para *switchgrass*, também se observou o

aumento da proporção entre a lignina insolúvel e solúvel das amostras. Este conjunto de informações leva à suposição de que o pré-tratamento ácido, ao dissolver preferencialmente unidades do tipo S (SAMUEL et al., 2010), deu origem à materiais com ligninas residuais enriquecidas em unidades G; sendo assim, a alteração entre lignina insolúvel/solúvel estaria associada a frequência de unidades G e S nessas frações, respectivamente. Adicionalmente, os resultados ainda sugerem que a lignina do H89 exibe, proporcionalmente, mais unidades do tipo S, comparada às ligninas dos outros híbridos.

Além das diferenças estruturais da lignina entre os híbridos, parte da remoção de lignina poderia estar relacionada aos ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e *p*-cumárico) presentes em cada híbrido. Masarin et al. (2011) determinaram que há correlação entre os teores de lignina e destes ácidos nos híbridos em estudo. Os autores determinaram ainda os teores de ácidos hidroxicinâmicos de modo a discriminar os ácidos totais (ésteres com a função fenol livre + ésteres com a função fenol formando éter com a lignina) dos ácidos na forma de ésteres com a função fenol livre. O segundo grupo de ácidos hidroxicinâmicos seria, a princípio, susceptível à clivagem por hidrólise ácida e solubilização (HSU et al., 2010). Os dados indicam que os teores de ácidos hidroxicinâmicos totais eram de 5,0 %, 6,2 % e 8,2 % para os híbridos H89, H140 e H321, respectivamente. Os teores de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, com a função fenol livre, eram de 2,3 %, 3,0 % e 3,6 %, respectivamente. Estes valores se opõem à tendência de remoção de lignina; ou seja, maior remoção de lignina foi observada para os híbridos com quantidades inferiores de ácidos hidroxicinâmicos. Estes dados sugerem que, havendo hidrólise dos ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, ao menos parte dos compostos solubilizados voltaria a se condensar com a lignina (insolúvel), formando novas ligações carbono-carbono.

Durante o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, os polissacarídeos estruturais podem sofrer reações de desidratação, fragmentação, policondensação e/ou polimerização, dando origem à estruturas que, eventualmente, são depositadas sobre a superfície do material tratado (HU; JUNG; RAGAUSKAS, 2012). Diante da possível extração desses compostos com etanol, os conteúdos extraídos das amostras foram chamados de “extraíveis” (Tabela 3). O pré-tratamento de 20 min proporcionou a diminuição de extraíveis nos híbridos H89 e H140, comparado aos seus teores quando não tratados. Este dado constata que houve remoção dos extrativos durante o pré-tratamento brando. Por outro lado, o teor de extraíveis do H321 aumentou, suportando a ideia de que outros compostos estão sendo formados pelo pré-tratamento e integrados à composição dessas amostras. Seguindo essa tendência, após as demais condições de pré-tratamento (30–90

min), as amostras apresentaram teores de extraíveis superiores ou similares àqueles encontrados nos híbridos não tratados. Uppugundla et al. (2014) também mostram o aumento de 10,4 % para 15,4 % (m/m) do teor de extrativos da amostra de forragem de milho pré-tratada com ácido sulfúrico, mas não discutem sobre o ocorrido. Para os materiais pré-tratados, os extraíveis podem corresponder à produtos de degradação de açúcares, os quais permanecem insolúveis em meio ácido, fragmentos de lignina e até mesmo frações das ligninas acumuladas na forma de gotículas (*droplets*) sobre a superfície dos materiais (DONOHOE et al., 2008).

Tabela 5 – Teor de lignina insolúvel e solúvel dos híbridos de cana-de-açúcar antes e depois de diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

Híbrido	*Amostra	Lignina (% g/100 g material)		Insolúvel/Solúvel
		Insolúvel	Solúvel	
89	não tratada	15,4±0,1	1,4±0,0	11,0
	20 min	18,4±0,2	2,0±0,0	9,2
	30 min	19,8±0,2	1,2±0,0	16,5
	40 min	20,3±0,1	1,2±0,0	16,9
	60 min	21,0±0,0	1,1±0,0	19,1
	90 min	21,0±0,1	0,8±0,0	26,3
140	não tratada	20,2±0,2	1,3±0,0	15,5
	20 min	22,7±0,2	2,1±0,1	10,8
	30 min	25,1±0,2	1,6±0,0	15,7
	40 min	25,6±0,1	1,5±0,1	17,1
	60 min	25,7±0,4	1,2±0,0	21,4
	90 min	25,0±0,2	0,9±0,0	27,8
321	não tratada	18,7±0,3	1,5±0,1	12,5
	20 min	22,3±0,1	1,7±0,0	13,1
	30 min	22,4±0,2	1,6±0,0	14,0
	40 min	24,0±0,2	1,2±0,0	20,0
	60 min	24,1±0,2	1,1±0,0	21,9
	90 min	23,9±0,5	0,9±0,0	26,6

* = híbridos não tratados e após diferentes tempos de pré-tratamento com ácido sulfúrico (150 °C, 13 g ácido/100g material); Os dados de composição química são valores médios de triplicatas, seguido de seus desvios padrão.

5.1.1. Caracterização dos hidrolisados ácidos

A fração líquida (hidrolisado ácido) das diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído foram caracterizadas quanto à concentração de glicose, xilose, arabinose e ácido acético. Adicionalmente, os hidrolisados ácidos foram submetidos à etapa de pós-hidrólise (SLUITER et al., 2008). Este procedimento permitiu estabelecer quanto destes componentes encontravam-se na forma de oligômeros (grau de polimerização ≥ 2). Em geral, os resultados mostram que a concentração de glicose, xilose, arabinose e ácido acético nos hidrolisados ácidos refletiram o nível de susceptibilidade de hidrólise das glucanas e das hemiceluloses às condições de pré-tratamento. Ou seja, conforme a severidade do pré-tratamento ácido foi aumentada, houve também um aumento na concentração destes componentes nos hidrolisados dos três híbridos estudados (Tabela 6); a xilose aparece como principal constituinte de todos os hidrolisados ácidos. De maneira geral, a concentração de cada componente se mostra semelhante para os hidrolisados da mesma condição de pré-tratamento (tempo de reação). Porém, no hidrolisado ácido oriundo do pré-tratamento brando (20 min) do H321, foram observadas maiores concentrações de xilose, arabinose e ácido acético; certamente, em decorrência da remoção proporcionalmente superior de hemicelulose obtida nesta condição de pré-tratamento. De forma semelhante, a maior susceptibilidade da glucana do H89 ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído acarretou em hidrolisados mais ricos em glicose.

De forma interessante, a quantificação de oligômeros nos hidrolisados ácidos aponta a provável diferença com que os polissacarídeos estruturais dos híbridos de cana-de-açúcar foram removidos pelo pré-tratamento ácido. Nos hidrolisados ácidos do H89, toda a xilose foi detectada já na forma monomérica (Tabela 6). Por outro lado, 72,8 e 71,3 % da xilose presente nos hidrolisados ácidos obtidos após 20 min de reação, dos híbridos H140 e H321, encontravam-se como oligômeros, respectivamente. Os resultados ainda mostraram a presença de 40,9 % de xilose oligomérica no hidrolisado ácido de 30 min do H321; nesta mesma condição de reação, o H140 apresentou 16,8 % da xilose na forma de oligômeros. Considerando que a remoção de hemicelulose apresentou a mesma magnitude nos três híbridos estudados, durante os primeiros 20-30 min de reação, e que a estabilidade de xilo-oligômeros, em meio ácido, aumenta segundo seu grau de polimerização (KUMAR; WYMAN, 2008), o conjunto de resultados sugere que as hemiceluloses dos híbridos H321, H140 e H89 foram removidas das matrizes lignocelulósicas em fragmentos

de maior, intermediário e menor grau de polimerização, respectivamente. Quando os tempos de reação superaram os 30 min, os oligômeros dos três híbridos em estudo foram convertidos até os monossacarídeos correspondentes.

Os dados também permitiram inferir sobre a estabilidade superior dos oligômeros de glicose em meio ácido, comparado aos de xilose. Tal afirmativa baseia-se em que toda porção de glucana susceptível ao pré-tratamento ácido fora solubilizada já nos primeiros 20 min (Tabela 3) e que, ainda assim, seus oligômeros foram detectados na maioria dos hidrolisados ácidos seguintes (Tabela 6). Além do que, em um mesmo hidrolisado ácido, a proporção de glicose como oligômeros se mostrou sempre superior a de xilose. Moxley e Zhang (2007) citam a necessidade de condições mais extremas de ácido e temperatura para alcançar a hidrólise completa de celulo- do que de xilo-oligossacarídeos. Com isso, mesmo diante da falta de conhecimento sobre o grau de polimerização dos oligômeros de glicose e xilose no momento da solubilização, podemos atribuir a maior frequência destes oligos nos hidrolisados ácidos à sua maior estabilidade. Nos hidrolisados do H140 e H321, a quantidade de glicose detectada como oligômero foi superior à encontrada nos do H89. E assim como proposto às hemiceluloses, as glucanas dos H89, H140 e H321 parecem ser removidas de suas matrizes lignocelulósicas em fragmentos de menor, intermediário e maior grau de polimerização, respectivamente.

A presença de “oligômeros” de arabinose e ácido acético nos hidrolisados ácidos não seguiu um padrão definido. Nesse sentido, somente vale destacar a detecção destes oligômeros em alguns dos hidrolisados ácidos do H89, nos quais foram detectadas apenas xiloses monoméricas. Considerando que tanto arabinose, quanto ácido acético, encontram-se ligados covalentemente a moléculas de xilose, em hemiceluloses de gramíneas (BUCKERIDGE; DE SOUZA, 2014; CARPITA, 1996), “oligômeros” de xilose deveriam ser também detectados em tais hidrolisados. Este fato sugere que parte da xilose presente nos hidrolisados ácidos sofreu degradação por desidratação durante a etapa de pós-hidrólise – 4 % de H_2SO_4 , 121 °C por 60 min (SLUITER et al., 2008). Recentemente, Zhang et al. (2014) aprimoraram as condições de pós-hidrólise, justamente para maximizar a recuperação de xilose em hidrolisados com grandes quantidades de xilo-oligômeros. Aplicando uma pós-hidrólise com 0,75 % de H_2SO_4 , 110 °C por 180 min ou 0,5 % de H_2SO_4 , 110 °C por 240 min, quase 100 % da xilose dos hidrolisados foi recuperada por estes autores. Contudo, mesmo considerando que pode ter havido uma pequena degradação de xilose no procedimento adotado na presente tese, pode-se assumir que os padrões de

solubilização propostos às hemiceluloses dos três híbridos foram consistentes com o que foi discutido anteriormente.

Tabela 6 – Caracterização dos hidrolisados ácidos dos três híbridos de cana-de-açúcar quanto a presença de monômeros e oligômeros de açúcares e ácido acético

Híbrido	Hidrolisados ¹	Componentes (g/L)			
		Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético
89	20 min	3,5 (30,0)	3,0 (0)	0,7 (1,9)	0,6 (14,8)
	30 min	4,1 (29,9)	9,5 (0)	1,1 (11,4)	1,6 (7,9)
	40 min	3,6 (21,1)	9,8 (0)	1,0 (3,6)	1,6 (0)
	60 min	4,0 (6,7)	12,9 (0)	1,1 (5,6)	2,2 (0)
	90 min	4,2 (0)	12,0 (0)	1,2 (0)	2,1 (0)
140	20 min	0,8 (78,9)	2,2 (72,8)	0,6 (5,0)	0,5 (6,0)
	30 min	1,0 (52,4)	8,0 (16,8)	0,9 (7,2)	1,8 (18,5)
	40 min	1,1 (34,7)	9,4 (0)	1,2 (0)	2,0 (7,3)
	60 min	1,2 (2,2)	12,6 (0)	1,1 (0)	2,4 (0)
	90 min	1,5 (0)	12,9 (0)	1,1 (0)	2,5 (2,8)
321	20 min	1,4 (88,5)	4,6 (71,3)	0,8 (5,1)	1,0 (28,9)
	30 min	1,5 (83,0)	7,0 (40,9)	1,0 (6,9)	1,5 (24,5)
	40 min	1,8 (35,9)	11,2 (0)	1,1 (7,7)	2,2 (1,9)
	60 min	1,6 (20,5)	11,7 (0)	1,1 (5,0)	2,2 (0)
	90 min	1,7 (1,0)	12,4 (0)	1,2 (0)	2,4 (0)

¹ = fração líquida oriunda de diferentes tempos de pré-tratamento ácido (150 °C, 13 g ácido/100 g material);
() = porcentagem de oligômero, referente ao total do componente (g/L) encontrado no hidrolisado ácido.

5.1.2. Hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com ácido

Os sólidos residuais dos pré-tratamentos discutidos anteriormente foram submetidos à hidrólise enzimática. Paralelamente ao ensaio convencional de hidrólise enzimática, todos estes materiais foram também hidrolisados na presença de 1 % de albumina (BSA), visando eliminar uma eventual adsorção das enzimas celulolíticas à lignina presente nas amostras (YANG; WYMAN, 2006). Materiais ricos em lignina podem apresentar rendimentos subestimados de conversão enzimática da glucana em razão da adsorção improdutiva das enzimas (KUMAR et al., 2012). Diante de inúmeros aditivos

listados na literatura para prevenir tal fenômeno (ERIKSSON et al., 2002; KRISTENSEN et al., 2007), optou-se pela aplicação de BSA aos ensaios de hidrólise enzimática da presente tese, devido sua prévia utilização em estudos desenvolvidos dentro do nosso grupo de pesquisa (GONÇALVES, 2013; VALADARES, 2013).

Os rendimentos de conversão de glucana das amostras tenderam a aumentar de acordo com a severidade do pré-tratamento aplicada aos três híbridos de cana (Figura 6). Contudo, foi observado que os rendimentos de conversão não diferiram substancialmente entre algumas amostras dos híbridos H89 (não tratado e 20 min), H140 (60 e 90 min) e H321 (40 e 60 min). Provavelmente, este resultado se deve à semelhança entre a composição química das amostras, pois as condições de pré-tratamento não foram suficientemente eficientes para ocasionar mudanças significativas, a ponto de diferir os rendimentos de conversão. Observados os rendimentos mínimos e máximos de conversão, obtidos ao final de 72 h de hidrólise, o H140 (13,9–48,9 %) demonstrou a maior recalcitrância frente a hidrólise enzimática, seguida do H321 (14,2–54,9 %) e do H89 (25,6–63,1 %).

A adição de BSA aos ensaios de hidrólise enzimática auxiliou somente os rendimentos de conversão de amostras resultantes dos pré-tratamentos mais severos – 60 e 90 min de reação (Figura 6A, B e C). Considerando que o teor de lignina residual não aumentou significativamente nas amostras dos três híbridos após 40 min de reação (Tabela 3), somente alterações estruturais das ligninas residuais, contidas nos substratos das reações de 60 e 90 min, poderiam explicar o efeito benéfico da BSA na hidrólise de glucanas. A diminuição de hidroxilas alifáticas e a formação de novas ligações C-C (resultantes da desidratação e condensação em meio ácido) devem elevar o caráter hidrofóbico da lignina superficial no material lignocelulósico como já demonstrado por Berlin et al. (2006). Os mesmos autores atribuíram o aumento da adsorção improdutiva de celulasas, e também de xilanases, a este tipo de alteração estrutural. Desta forma, acredita-se que apenas os pré-tratamentos ácidos mais severos foram aptos a realizar tais alterações estruturais na lignina dos híbridos, afetando claramente o desempenho das celulasas adicionadas. A eficiência com que a BSA aumentou os rendimentos de conversão da glucana nos híbridos H89, H140 e H321 pré-tratados por 90 min foi de 7,6 %, 4,6 % e 5,4 %, respectivamente. Ao admitir que a diferença dos rendimentos de conversão, obtidas na presença e ausência de BSA, corresponda diretamente à quantidade de enzima adsorvida à lignina, poderia se estimar a hidrofobicidade das ligninas residuais dos híbridos após 90 min de pré-tratamento ácido como sendo: H89 > H321 > H140.

Figura 6 – Conversão enzimática de glucana dos híbridos H89 (A), H140 (B) e H321 (C), não tratados e após diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (20–90 min). Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos na presença (linhas pontilhadas) e ausência de albumina (linhas cheias), utilizando triplicadas para determinar o rendimento médio da conversão de glucana e seu desvio padrão (barras). Quando as barras de desvio não são visíveis nas figuras, a magnitude dos desvios padrão foi menor do que o tamanho do símbolo.

Fonte: arquivo pessoal.

Observando o rendimento de conversão de glucana do H140 na ausência de BSA, poderíamos inferir que 90 min de pré-tratamento ácido gerou uma amostra ligeiramente mais recalcitrante do que aquela oriunda de 60 min (Figura 6B). E assim como Moxley et al. (2012), atribuir este fato à prováveis alterações morfológicas na glucana ou na lignina do material, as quais afetariam a afinidade das enzimas à glucana ou, até mesmo, a área superficial de glucana disponível. No entanto, o fenômeno observado para o H140 parece estar relacionado simplesmente à capacidade adquirida da lignina em adsorver as celulasas, uma vez que o decréscimo da conversão de glucana pôde ser contornado com a adição de BSA ao ensaio de hidrólise enzimática. Este resultado ainda exalta a importância da utilização de aditivos dessa natureza na hidrólise enzimática de materiais com altos teores de lignina, para que a conclusão sobre a susceptibilidade da glucana às enzimas celulolíticas não seja tratada de forma subestimada.

5.2. Influência da hemicelulose na conversão da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar

As seções anteriores mostraram a hemicelulose como o principal constituinte estrutural removido das paredes celulares dos híbridos de cana-de-açúcar durante as diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Adicionalmente, foram descritas as eficiências de remoção e diminuição do teor de hemicelulose das amostras, bem como os rendimentos de conversão da glucana, dependentes da severidade do pré-tratamento. Juntas, estas informações apontam para que o aumento dos rendimentos de conversão das amostras aconteceu por intermédio da remoção da hemicelulose. Nessa situação, buscou-se investigar sobre a existência de uma correlação direta entre a hemicelulose e o rendimento de conversão da glucana dos três híbridos. Para tal avaliação, foram utilizados somente os resultados oriundos de ensaios enzimáticos contendo BSA, pois trata-se de dados teoricamente livres do efeito negativo causado por parte da lignina residual presente nas amostras pré-tratadas.

A influência da fração hemicelulósica nos rendimentos de conversão enzimática das glucanas foi avaliada a partir de gráficos gerados com os dados obtidos após 72 h de hidrólise (Figura 7). Os dados indicam que há uma relação inversa entre o teor de hemicelulose residual e os níveis de conversão enzimática de glucana, bem como uma relação direta entre os níveis de remoção de hemicelulose, obtidos durante o pré-

tratamento, e a eficiência de conversão de enzimática de glucana (Figura 7A e B, respectivamente). O comportamento observado na Figura 7B equivale àquele recentemente descrito para amostras de forragem de milho oriundas de diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (TAI; KESHWANI, 2014). Corroborando a literatura corrente, as correlações obtidas no presente estudo (R^2 acima de 0,96) mostraram o papel negativo da hemicelulose na conversão enzimática da glucana. O motivo para que a remoção de hemicelulose melhore os rendimentos de conversão está associado à maior exposição e acessibilidade das cadeias de glucana às celulases, uma vez que as fibrilas de celulose encontram-se na matriz lignocelulósica recobertas de hemicelulose e lignina (DING; HIMMEL, 2006).

As linhas das correlações exponenciais ainda permitiram diferenciar a influência que a hemicelulose de cada híbrido exerce sobre seus respectivos rendimentos de conversão. Por exemplo, em comparação à correlação estabelecida para o H89, as linhas de tendência dos híbridos H140 e H321 mostram curvaturas mais acentuadas quando as amostras apresentam baixos teores residuais de hemicelulose (Figura 7A) ou elevados níveis de remoção de hemicelulose (Figura 7B). Os dados indicam que atingindo um determinado valor de remoção de hemicelulose, os incrementos de conversão de glucana nos híbridos H140 e H321 tornaram-se proporcionalmente superiores àqueles obtidos para o H89. Esse tipo de verificação experimental indica que o pré-tratamento ácido tende a diminuir a diferença das recalcitrâncias originais observadas nos diferentes híbridos em estudo, que era superior a 10 pontos percentuais (H140/13,9 %, H321/14,2 % e H89/25,6 %, para conversão de glucana nos materiais não tratados). Para enfatizar este raciocínio, as equações exponenciais ($y = ae^{bx}$) obtidas na Figura 7B foram utilizadas para simular os rendimentos de conversão da glucana em diferentes cenários de remoção de hemicelulose (Tabela 7). Nesse sentido, a remoção de 50 % da hemicelulose dos híbridos ainda não seria suficiente para diminuir o contraste entre os rendimentos de conversão dos materiais não tratados. A diferença entre os híbridos começou a decrescer (7,0 %) quando a remoção de hemicelulose foi de 85 %, justamente onde a inclinação mais acentuada das linhas dos híbridos H140 e H321 permitiu a aproximação dos dados aos observados no H89. Avançando para um cenário hipotético de total remoção de hemicelulose (100 %), menos de 5 pontos percentuais diferenciariam os rendimentos de conversão da glucana dos híbridos de cana mais (H140 e H321) e menos (H89) recalcitrantes.

Figura 7 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana em função do teor remanescente (A) e da remoção de hemicelulose (B) dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul) submetidos a diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos na presença de albumina, utilizando triplicadas para determinar o valor médio de conversão de glucana e os desvios padrão (barras).

Fonte: arquivo pessoal.

Os resultados apresentados confirmaram a influência direta da hemicelulose nos rendimentos de conversão enzimática dos híbridos de cana-de-açúcar. As correlações estabelecidas levam a suposição que tal influência deve-se ao impedimento físico causado pela hemicelulose, imaginando que sua remoção tornaria a glucana gradualmente mais susceptível ao ataque das celulasas. Além disso, os dados indicam que as plantas originalmente mais recalcitrantes se beneficiam mais da remoção de hemicelulose. Outro dado interessante destaca a impossibilidade de superar rendimentos de 48,9–63,1 % de

conversão de glucana, mesmo diante das expressivas remoções de hemicelulose ($\geq 86,0\%$) dos híbridos durante o pré-tratamento ácido. A simulação proposta demonstrou que, caso toda hemicelulose fosse removida das amostras, o melhor rendimento de conversão ainda permaneceria abaixo de $66,0\%$. Porém, é comum que diferentes biomassas lignocelulósicas, inclusive vindas de condições “otimizadas” de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, apresentem rendimentos de conversão inferiores a $70,0\%$ (CANILHA et al., 2011; CARA, et al., 2008; LU et al., 2007). Claramente, a reatividade da glucana das amostras de híbridos pré-tratadas foi limitada até certo ponto pela fração hemicelulósica. A lignina remanescente nas amostras pré-tratadas com ácido poderia explicar a dificuldade de se atingir maiores rendimentos, já que sua remoção de materiais lignocelulósicos não tratados também proporciona notáveis incrementos aos rendimentos de conversão enzimática (KUMAR et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013).

Tabela 7 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar em diferentes cenários de remoção de hemicelulose

Remoção de hemicelulose simulada	Conversão enzimática de glucana calculada (%) [*]		
	H89	H140	H321
0 %	23,3 (25,6)	14,0 (13,9)	13,5 (14,2)
50 %	38,3	29,6	28,4
85 %	55,9	49,0	48,7
100 %	65,7	60,9	61,3

* = valores preditos para 72 h de conversão de glucana obtidos a partir das equações expostas na Figura 3; Entre parênteses estão indicados os dados experimentais de conversão de glucana obtidos com as amostras não tratadas

5.3.Deslignificação dos híbridos de cana-de-açúcar pré-tratados com ácido sulfúrico

Com o intuito de determinar o efeito da diminuição do teor de lignina na conversão de glucana dos híbridos de cana-de-açúcar já pré-tratados com ácido sulfúrico diluído, buscou-se promover a remoção parcial e seletiva da lignina destas amostras. Com esta finalidade, foi utilizado o tratamento com clorito de sódio/ácido acético, uma vez que este reagente se mostrou seletivo para a remoção de lignina de bagaço de cana-de-açúcar, com mínima remoção dos carboidratos estruturais do material (SIQUEIRA et al., 2013).

Comparado aos processos convencionais de deslignificação (polpação Kraft e sulfito), a maior seletividade do processo clorito-ácido confere condições mais adequadas para estudos que procuram determinar os efeitos físico-químicos da deslignificação seletiva de materiais lignocelulósicos (AHLGREN; GORING, 1971). Apesar de não muito bem esclarecidas, as reações químicas existentes neste sistema são responsáveis pela formação do ácido cloroso, o qual é convertido à dióxido de cloro (principal produto) e íons clorato e cloreto como produtos secundários na reação (BROWNING, 1967).

As amostras de híbridos já pré-tratadas com ácido por 90 min foram então submetidas à subsequente deslignificação, utilizando duas adições consecutivas de clorito de sódio/ácido acético no meio reacional. Conforme ilustrado na Tabela 8, cargas consecutivas de clorito de sódio/ácido acético proporcionaram a remoção progressiva da lignina nos materiais estudados. No entanto, o nível de deslignificação variou de acordo com a amostra e também conforme a condição de tratamento. Para a primeira carga de clorito-ácido (15 min iniciais de reação), foram observados 22,6 %, 17,4 % e 18,7 % de remoção de lignina para as amostras dos H89, H140 e H321, respectivamente. A aplicação de uma segunda carga de clorito, após 15 min de reação (30 min totais de reação), levou à maior diferenciação entre as amostras, sendo que a remoção mais expressiva de lignina ocorreu no H89 (60,1 %), contra 49,3 % no H140 e 41,0% no H321. O tratamento com clorito-ácido proporcionou a efetiva diminuição do teor inicial de lignina das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico (diminuição de cerca de 3 e 10 pontos percentuais nos teores de lignina, independentemente do híbrido estudado, para as reações com a primeira e segunda carga de clorito, respectivamente).

Diferente do esperado, o processo de deslignificação com clorito-ácido promoveu a remoção de carboidratos presentes nas amostras pré-tratadas com ácido (Tabela 8). Siqueira et al. (2013) observaram que aproximadamente 10 % da hemicelulose do bagaço de cana *in natura* foi removida em tratamentos com clorito de sódio, mas somente após utilizarem 3 e 4 cargas de clorito de sódio/ácido acético; não havendo remoção de celulose nas condições de tratamento por eles estudadas. A maior susceptibilidade observada para os polissacarídeos das amostras dos híbridos poderia ser justificada pelo fato do estudo descrito nesta tese ter empregado matrizes lignocelulósicas previamente modificadas por um pré-tratamento ácido. A degradação oxidativa e/ou hidrólise ácida representam os possíveis meios de solubilização de polissacarídeos de materiais lignocelulósicos tratados com clorito-ácido. Porém, a via oxidativa é inespecífica para polissacarídeos, além de limitada em sistemas com pH ácido (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010). Diante disso, a

hidrólise ácida das ligações glicosídicas (após uma remoção preliminar de lignina, expondo os polissacarídeos) aparece como a mais provável causa da solubilização dos carboidratos durante o tratamento com clorito-ácido. Apesar de o balanço de massas do tratamento com clorito apontar para uma remoção detectável de glucana e hemicelulose das amostras pré-tratadas com ácido, a composição química final dos materiais não se mostrou empobrecida em polissacarídeos, já que a reação predominante foi a de deslignificação. Por outro lado, o tratamento com clorito-ácido promoveu uma diminuição expressiva da quantidade de extraíveis das amostras pré-tratadas com ácido (90 min). Em geral, as amostras dos híbridos tiveram seus teores de extraíveis diminuídos em mais de 50,0 %, alcançando valores de até 84,0 % (H321) após duas cargas de clorito de sódio/ácido acético. Estes resultados indicam que tal processo permitiu a remoção, de ao menos uma parte da lignina e dos materiais solúveis em etanol presentes no material pré-tratado com ácido.

Os rendimentos do tratamento com clorito-ácido se mostraram bem similares para as amostras dos híbridos pré-tratados com ácido (Tabela 8). Por exemplo, 15 e 30 min de tratamento resultaram em rendimentos que variaram entre 90,2–92,5 % e 79,8–81,9 %, respectivamente. A baixa variabilidade de rendimentos observada deve estar relacionada à ação seletiva do tratamento com clorito-ácido à lignina. Embora o pré-tratamento com ácido (90 min) tenha atuado similar e preferencialmente sobre a hemicelulose, diferentes e consideráveis quantidades de glucana e lignina foram removidas dos híbridos avaliados. Tal contraste acabou refletindo no resultado dos rendimentos, quando integrados o pré-tratamento ácido e o subsequente processo de deslignificação com clorito-ácido (Tabela 8 – dados entre parênteses). Assim, os menores rendimentos foram apresentados pelo H89 (47,9–42,4 %), seguido do H140 (56,4–50,6 %) e do H321 (59,6–52,7 %). Diante desses dados, vale destacar que mais de 92 % da glucana presente nos híbridos H140 e H321 não tratados foi recuperada na fração sólida, mesmo depois da sequência do pré-tratamento ácido e da deslignificação com clorito-ácido; em contrapartida, para o H89, a recuperação de toda a glucana foi menor, mas ainda acima dos 80 %.

Tabela 8 – Composição química, rendimento e remoção dos constituintes estruturais da parede celular de amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico e sequencialmente deslignificadas com clorito de sódio/ácido acético

Clorito-ácido	Composição química				Rendimento (%)	Remoção (% , g/100 g constituinte) ¹		
	Extraíveis	Glucana	Hemicelulose	Lignina		Glucana	Hemicelulose	Lignina
<i>híbrido 89*</i>								
15 min	3,7±0,1	68,7±0,3	5,1±0,1	18,7±0,3	90,2 (47,9)	3,8 (18,3)	4,2 (91,0)	22,6 (46,7)
30 min	3,3±0,1	76,3±0,6	5,3±0,3	10,9±0,1	79,8 (42,4)	5,4 (19,7)	11,8 (91,8)	60,1 (72,5)
<i>híbrido 140*</i>								
15 min	3,5±0,2	62,8±0,1	6,0±0,1	23,5±0,2	91,0 (56,4)	0 (7,3)	9,0 (87,3)	17,4 (38,3)
30 min	2,9±0,4	71,2±2,0	6,8±0,3	16,1±0,1	81,6 (50,6)	0 (5,7)	10,5 (87,5)	49,3 (62,1)
<i>híbrido 321*</i>								
15 min	4,2±0,3	64,7±0,4	5,4±0,1	21,8±0,2	92,5 (59,6)	0 (4,5)	9,2 (89,6)	18,7 (35,7)
30 min	1,6 ±0,1	71,3±2,6	5,7±0,2	15,7±0,3	81,9 (52,7)	9,8 (6,9)	13,6 (90,3)	41,0 (59,0)

* = híbridos já pré-tratados a 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, durante 90 min;

¹ = remoção dos constituintes foi calculada a partir da composição química das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico por 90 min (Tabela 3);

() = dados de rendimentos e remoção dos constituintes dos híbridos de cana integrando o pré-tratamento ácido e a subsequente deslignificação por clorito-ácido;

Os dados de composição química são valores médios de triplicatas, seguido de seus desvios padrão.

5.3.1. Hidrólise enzimática das amostras com teores diminuídos de lignina

O ensaio de hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com ácido (90 min) e sequencialmente deslignificadas (15 e 30 min) foi conduzido na ausência e presença de BSA, para evitar uma possível adsorção das celulasas à lignina ainda remanescente. No entanto, curiosamente, os rendimentos de conversão de glucana das amostras foram consideravelmente diminuídos pela adição de BSA à reação de hidrólise (Figura 8). Ao final de 72 h de hidrólise, os rendimentos obtidos foram entre 6 e 10 pontos percentuais menores na presença de BSA; fato este, nunca antes reportado na literatura. Mais próximo a isso, apenas quando a hidrólise enzimática de forragem de milho (pré-tratada com ácido sulfúrico) foi suplementada com xilanases, pectinases e β -glicosidades, o que acarretou a um aumento significativo da carga proteica no ensaio (BERLIN et al., 2007). Porém, os autores desse trabalho supõem que o decréscimo no rendimento de conversão poderia ter como origem a competição entre xilanases e celulasas por sítios de ligação da celulose. Embora demonstrada baixa capacidade adsorviva de BSA à celulose microcristalina – Avicel (YANG; WYMAN, 2006), creditamos à adsorção de BSA na glucana o motivo da diminuição dos rendimentos de conversão das amostras de híbridos parcialmente deslignificadas. Adsorvida à cadeia de glucana, BSA formaria uma espécie de “camada protetora”, a qual impediria fisicamente a interação das celulasas com o substrato, assim como reconhecido para hemicelulose e lignina.

Considerando que BSA diminuiu a eficiência da hidrólise enzimática dos materiais deslignificados, os dados discutidos a seguir estão baseados nos ensaios realizados na ausência de BSA no meio reacional. Os resultados de hidrólise enzimática indicam que os rendimentos de conversão da glucana nas amostras pré-tratadas com ácido diluído foram consequência da diminuição dos teores de lignina desses materiais. A diminuição de cerca de 3 pontos percentuais no conteúdo de lignina (carga única de clorito-ácido – 15 min) resultou em conversões que atingiram valores de 74,1 %, 63,8 % e 71,1 % para os híbridos H89, H140 e H321, respectivamente. Este aumento na eficiência de conversão da glucana significou incrementos de 11,0, 14,9 e 16,2 pontos percentuais na hidrólise dos híbridos pré-tratados somente com ácido, respectivamente (Figura 8A). Os rendimentos máximos de conversão foram observados quando os teores de lignina foram diminuídos ainda mais, por meio do tratamento com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético (Figura 8B). Nesta condição, o rendimento de conversão do H89 se aproximou do máximo teórico (98,8

%), enquanto os híbridos H140 e H321 apresentaram valores de conversão de 92,3 e 91,3 %, respectivamente. Estes resultados representam incrementos de 35,7, 43,4 e 36,4 pontos percentuais nos rendimentos de conversão dos híbridos H89, H140 e H321 pré-tratados com ácido sulfúrico diluído por 90 min. Mesmo não sendo possível traçar equações simples que correlacionassem os teores de lignina das amostras com níveis de conversão de glucana nestas amostras, os resultados permitem inferir que a lignina residual das amostras pré-tratadas com ácido impossibilitou atingir rendimentos de conversão enzimática da glucana superiores a 66%, conforme apresentado nos itens anteriores.

Figura 8 – Conversão enzimática de glucana dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul) já pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (90 min), e sequencialmente deslignificados com (A) uma e (B) duas cargas de clorito de sódio/ácido acético. Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos na presença (linhas pontilhadas) e ausência (linhas cheias) de albumina, utilizando triplicadas para determinar o rendimento médio de conversão de glucana e o seu desvio padrão (barras).

Fonte: arquivo pessoal.

Dentro deste conjunto de dados, alguns pontos observados ainda fornecem informações interessantes. Por exemplo, não houve detecção de adsorção improdutiva das celulasas à lignina residual das amostras parcialmente deslignificadas, uma vez que os rendimentos de conversão da glucana destas amostras apresentaram os mesmos valores, independentemente de haver ou não BSA nas reações de hidrólise enzimática. Os resultados indicam que a porção de lignina modificada pelo pré-tratamento ácido, a qual teria adquirido característica hidrofóbica e capacidade de adsorver enzimas, teria sido removida e/ou modificada durante os tratamentos com clorito-ácido. Outro ponto destacado seria quanto à recalcitrância dos híbridos de cana frente à hidrólise enzimática que, mesmo após uma sequência de tratamentos que incluiu a remoção de hemicelulose com ácido e a remoção de lignina com clorito de sódio, permaneceu seguindo a mesma ordem das plantas originais: H140, H321 e H89. Confirmando este comportamento para outros materiais, o prévio conhecimento da recalcitrância permitiria a rápida seleção por cultivares com maior potencialidade de aplicação em processos de bioconversão. Estes dados reforçam a relevância de se buscar materiais lignocelulósicos naturalmente menos recalcitrantes.

5.4. Influência dos tratamentos nos balanços de massa para a recuperação de glicose a partir dos híbridos de cana-de-açúcar

Os dados experimentais descritos anteriormente foram analisados sob a perspectiva de quais foram as transformações químicas responsáveis pelo aumento de digestibilidade dos híbridos de cana-de-açúcar (conversão enzimática da glucana presente nos materiais pré-tratados). Por outro lado, também é relevante avaliar como plantas originalmente distintas respondem aos tratamentos, do ponto de vista do i) ganho percentual nos rendimentos de hidrólise enzimática e ainda em relação à ii) magnitude deste ganho. O primeiro corresponde quanto o rendimento de conversão do material não tratado foi incrementado após o tratamento, em termos de pontos percentuais. Por sua vez, a magnitude do ganho equivale à proporção com que o aumento do rendimento aconteceu, baseado no resultado obtido para o material não tratado; determinada pela razão dos rendimentos de conversão da glucana da amostra tratada e não tratada.

Os híbridos responderam diferentemente aos tratamentos, considerando ambas as formas de ganho de conversão enzimática de glucana (Tabela 9). O pré-tratamento ácido conferiu maior ganho percentual ao rendimento de conversão do H321; enquanto isso, a subsequente deslignificação ocasionou maior incremento à conversão do H140. Os resultados sugerem que a eficiência de um tratamento seria dependente da característica química original do material. Por exemplo, ao remover principalmente hemicelulose, o pré-tratamento ácido proporcionou incremento superior ao rendimento de conversão do híbrido com maior teor inicial desse constituinte (H321). Nesse sentido, o H140 apresentando maior teor de lignina, obteve o maior ganho percentual de rendimento, justamente quando foi deslignificado após o pré-tratamento ácido. Por outro lado, a magnitude do ganho melhor destacou a influência dos tratamentos nos rendimentos de conversão de plantas menos (H89) e mais recalcitrantes (H140 e H321). A mesma condição de pré-tratamento ácido conferiu, aos rendimentos dos híbridos H321 e H140, aumentos de 3,9 e 3,5 vezes, respectivamente; enquanto para o H89, o aumento foi de apenas 2,5 (Tabela 9). Este padrão permaneceu quando as amostras foram subsequentemente deslignificadas, apresentando ganhos de magnitude de 3,9 (H89), 6,7 (H140) e 6,4 (H321). Os achados constataam ainda que, independente do tipo, os tratamentos levam maiores ganhos de conversão às plantas inicialmente mais recalcitrantes.

Tabela 9 – Ganhos de conversão de glucana dos híbridos de cana-de-açúcar quando pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético

Tratamento	Ganho de conversão de glucana					
	¹ Percentual			² Magnitude		
	H89	H140	H321	H89	H140	H321
³ Ácido	37,5	35,0	40,7	2,5	3,5	3,9
⁴ Clorito-ácido	73,2	78,4	76,1	3,9	6,7	6,4

¹ = diferença entre os rendimentos de conversão de glucana do híbrido quando tratado e não tratado; ² = razão entre os rendimentos de conversão de glucana do híbrido quando tratado e não tratado; ³ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, durante 90 min; ⁴ = amostras pré-tratadas com ácido e sequencialmente submetidas à duas cargas de clorito de sódio/ácido acético.

De maneira geral, os resultados mostraram que plantas mais recalcitrantes (H140 e H321) foram passíveis de maiores ganhos de conversão de glucana, quando (pré-) tratadas.

Porém, os rendimentos máximos de conversão alcançados, não foram sequer iguais aos daqueles da planta menos recalcitrante (H89). Este conjunto de dados indicaria que, dentre os híbridos estudados, o H89 se destaca como a matéria-prima mais apropriada à processos que visem uma recuperação eficiente de glicose a partir de biomassa vegetal – via conversão enzimática. Contudo, valores de produtividade em campo (biomassa/área plantada), somados aqueles de recuperação dos açúcares ao final do pré-tratamento e da hidrólise enzimática, também são fundamentais na seleção adequada de uma matéria prima vegetal. A disponibilidade de dados sobre a produtividade em campo (MASARIN et al., 2011), somada aos obtidos na presente tese, permitiram avaliar o potencial de cada híbrido como fonte de glicose. Para isso, estimou-se qual seria o balanço de massas de glicose a partir de cada híbrido, computando os dados de produtividade agrícola com os dados de rendimento de glucana, obtidos após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (90 min) e deslignificação sequencial com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético (30 min), e os níveis de conversão de glucana após 72 h de digestão enzimática (Tabela 10).

A recuperação final de glicose, a partir dos híbridos, aumentou expressivamente quando estes foram pré-tratados com ácido e sequencialmente deslignificados, mesmo computando as perdas de glucana ocorridas durante as estas etapas de (pré-) tratamento. No entanto, os dados referentes à quantidade de glicose gerada (Kg/hectare) refletiram predominantemente o contraste da produtividade em campo dos híbridos. Por este motivo, em todos os cenários propostos, o H89 se mostrou significativamente superior aos demais híbridos; do lado oposto encontra-se o H321. Por exemplo, a obtenção de glicose a partir do H89 não tratado (2042 Kg/hectare), foi superior à do H321 pré-tratado com ácido (1453 Kg/hectare). Ainda na mesma linha, o H140 tratado com ácido e deslignificado com clorito gerou uma quantidade de glicose 30 % inferior, àquela observada para o H89 pré-tratado apenas com ácido. Os resultados demonstram que para uma área delimitada, disponível para o plantio, a elevada produtividade em campo do H89 permitiria obter maior quantidade de glicose, oriunda de glucana.

Além da determinação da glicose potencialmente produzida por hectare de cana plantado, os dados também podem ser analisados de forma a determinar a potencialidade de produzir glicose, dimensionada em Kg por tonelada de híbrido de cana-de-açúcar processada (Kg/ton material) (Tabela 10). Esta abordagem, de certo modo, pondera o potencial de cada híbrido estudado com base na característica intrínseca de sua biomassa. Como esperado, o nível de recuperação de glicose dos híbridos não tratados se mostrou dependente da recalcitrância original de cada material frente à conversão enzimática, onde

seriam produzidos 115, 59 e 64 Kg de glicose/ton de cana a partir dos híbridos H89, H140 e H321, respectivamente. Porém, após o pré-tratamento ácido, os valores finais de glicose obtida se assemelham para os híbridos H89 (240 Kg/ton de cana) e H321 (232 Kg/ton de cana). Este resultado indica que a baixa perda de glucana do H321 no pré-tratamento ácido acabou compensando sua menor susceptibilidade à conversão enzimática. No caso do H140, o menor rendimento de conversão enzimática, somado à perda intermediária de glucana ocorrida no pré-tratamento ácido, resultou numa recuperação inferior de glicose (192 Kg/ton de cana). A importância da perda de glucana durante o pré-tratamento ácido tornou-se ainda mais evidente para a recuperação final de glicose, quando os híbridos foram subsequentemente deslignificados. Nesta situação, apesar de apresentarem rendimentos inferiores de conversão, o H321 (382 Kg/ton de cana), e até mesmo o H140 (362 Kg/ton de cana), superaram o H89 (355 Kg/ton de cana) como fontes de glicose. Estes dados corroboram com Yang e Wyman (2008), os quais enfatizaram sobre a necessidade de preservar o conteúdo de glucana dos materiais lignocelulósicos durante os pré-tratamentos. Caso contrário, mesmo altos rendimentos de hidrólise enzimática representariam que, na verdade, apenas uma pequena fração da glucana inicialmente processada estaria sendo convertida à glicose; o que comprometeria a rentabilidade global do processo.

A avaliação da resposta dos híbridos ao pré-tratamento ácido e à subsequente deslignificação com clorito-ácido, integrado aos dados de conversão enzimática, permitiu diferenciá-los quanto fontes potenciais de glicose. Em uma planta industrial desenhada para o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, seria mais indicada a utilização dos híbridos H89 e H321, em face da maior recuperação de glicose. Por outro lado, se o incremento na recuperação de glicose tornasse viável o custo de uma etapa adicional de deslignificação da amostra, já pré-tratada com ácido, H140 e H321 seriam as matérias-primas mais adequadas.

Tabela 10 – Recuperação de glicose a partir da integração de processo, incluindo produtividade em campo dos híbridos de cana-de-açúcar e rendimentos de pré-tratamento e conversão enzimática da glucana

Produtividade**					Amostra	Recuperação de glucana			Obtenção de glicose	
Cana-de-açúcar	Material fibroso (livre de sacarose)					Pós tratamento (Kg/100Kg)	#CG (%)	Em glicose (Kg/100Kg)	(Kg/hectare)	*(Kg/ton material)
(ton/hectare)	(Kg/ton)	(Kg/hectare)	Glucana							
			(Kg/100Kg)	(Kg/hectare)						
híbrido 89										
					Não tratado	40,3	25,6	10,3	2042	115
101,2	176,0	17811	40,3	7178	¹ Ácido	34,2	63,1	21,6	4271	240
					² Clorito-ácido	32,4	98,8	32,0	6327	355
híbrido 140										
					Não tratado	38,2	13,9	5,3	913	59
88,0	175,8	15470	38,2	5910	¹ Ácido	35,3	48,9	17,3	2967	192
					² Clorito-ácido	35,3	92,3	32,6	5601	362
híbrido 321										
					Não tratado	40,4	14,2	5,7	399	64
54,4	115,2	6267	40,4	2532	¹ Ácido	38,0	54,9	20,9	1453	232
					² Clorito-ácido	37,6	91,3	34,3	2391	382

** = dados de Masarin et al. (2011); * = não inclui dados sobre produtividade em campo ¹ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, durante 90 min; ² = amostras pré-tratadas com ácido e sequencialmente submetidas à duas cargas de clorito de sódio/ácido acético; # = conversão de glucana após 72 h de hidrólise enzimática

5.5.Efeito dos tratamentos na estrutura física dos híbridos de cana-de-açúcar

A presente tese demonstrou a susceptibilidade dos componentes estruturais dos híbridos de cana-de-açúcar frente ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e à deslignificação sequencial com clorito de sódio/ácido acético. Adicionalmente, enfatizou a influência da hemicelulose e da lignina na digestibilidade dos materiais (pré-) tratados. Contudo, os estudos de correlação já apresentados não implicam, necessariamente, em uma base mecanística para explicar os resultados alcançados. Em busca por tal compreensão, considerou-se caracterizar a microestrutura dos híbridos não tratados, determinando as possíveis alterações causadas pelo pré-tratamento ácido e pela deslignificação subsequente. Juntamente aos resultados já apresentados, o conhecimento sobre a porosidade e a área superficial acessível de glucana das amostras pode contribuir para melhor elucidar como os (pré-) tratamentos afetam os rendimentos de conversão enzimática dos três híbridos.

5.5.1. Porosidade

Para a determinação da porosidade da parede celular dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido (90 min) e sequencialmente deslignificados com clorito-ácido (30 min), optou-se pela técnica de exclusão de solutos. Desenvolvida por Stone e Scallan (1968), a técnica se baseia na acessibilidade de sondas moleculares (soluto), de diferentes tamanhos, à poros da parede celular de materiais lignocelulósicos preenchidos d'água. Ao colocar o material em contato com uma solução de sonda, os solutos se difundem acessando a água contida em poros de tamanhos superiores e/ou iguais ao seu, no sentido de estabelecer um equilíbrio da concentração de soluto na solução teste; este processo resulta na diminuição da concentração inicial da solução de sonda adicionada. Com o aumento do tamanho da sonda, a difusão torna-se menos efetiva, diminuindo a diferença entre a concentração inicial e final da solução. Quando tal diferença não pode ser mais observada, este ponto é denominado como ponto de saturação (com água) de fibra do material (*fibre saturation point*, FSP). Nesta situação, toda a água contida em poros (medida como volume) é inacessível à sonda molecular, o que permite determinar o “número” total de poros do material. A técnica de exclusão de solutos estabelece, portanto, a porosidade do material

como um perfil de distribuição do volume de poros do material (expressos em mL/g material) em função do tamanho específico das sondas empregadas.

Apesar de implementada em nosso grupo de pesquisa (SANTI-JUNIOR et al., 2013), foram realizadas algumas adaptações metodológicas à técnica de exclusão de solutos. A primeira modificação foi utilizar apenas 4 diferentes sondas moleculares, ao invés das 15 inicialmente propostas. As sondas escolhidas foram as de 44, 55 e 74 Å, pois abrangem toda região próxima ao tamanho médio das celulasas – 50 Å (GRETHLEIN, 1985; ISHIZAWA, et al., 2007; THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992), mais a sonda empregada na determinação do volume total de poros (FSP), 553 Å. A segunda adaptação refere-se à diminuição da escala experimental (10 vezes), necessária em função da escassez de amostra disponível para tal análise. Embora representem simples adaptações metodológicas, considerou-se pertinente atestar a autenticidade dos resultados posteriormente apresentados. Para isso, a estratégia encontrada, e considerada como a mais adequada, seria determinar a porosidade de materiais previamente caracterizados pelo método convencional (MC) de exclusão de solutos. Desta forma, foram selecionadas duas amostras previamente estudadas, correspondendo a uma amostra não tratada de bagaço de cana-de-açúcar e outra deslignificada com clorito de sódio/ácido acético por 4 h (SANTI-JUNIOR et al., 2013). Para permitir comparações com a metodologia adaptada (MA), foram analisados somente aqueles dados obtidos na MC, referentes às sondas de 44, 55, 74 e 553 Å. Assim, como realizado por Santi-Junior et al. (2013), os resultados experimentais de inacessibilidade das amostras à estas sondas (bem como para as de híbridos em estudo nesta tese), foram ajustados empregando modelos logarítmicos. Os dados experimentais, os dados modelados e os desvios correspondentes estão apresentados no Apêndice.

Em geral, os valores de porosidade das amostras de bagaço de cana foram reproduzidos pela técnica de exclusão de solutos adaptada (Figura 9). Por exemplo, o FSP da amostra não tratada foi de 0,83 e 0,89 mL/g, quando determinados via MA e MC, respectivamente (Figura 9A). Enquanto isso, para o bagaço deslignificado, MA e MC estabeleceram FSPs de 1,56 e 1,64 mL/g. Tal semelhança ainda pôde ser observada em relação à acessibilidade destas amostras (Figura 9B). As curvas de acessibilidade da amostra deslignificada, determinadas pelas MA e MC, praticamente se sobrepõem. Porém, os valores da acessibilidade do bagaço não tratado diferiram, embora represente uma variação inferior a 10 %. Contudo, vale destacar que o mesmo padrão foi estabelecido pela MA e pela MC, onde a acessibilidade da amostra deslignificada foi superior à não tratada em ambos os casos. De outro ponto de vista, as modificações introduzidas na metodologia

decorrentes do presente trabalho permitirão o menor consumo de amostras e de sondas moleculares (dextranas), além de permitir maior rapidez na realização de análises futuras.

Figura 9 – Determinação da distribuição do tamanho de poros (A) e da acessibilidade (B) do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e deslignificado com clorito de sódio/ácido acético, utilizando as metodologias adaptada (MA) e convencional (MC) de exclusão de solutos. Os dados experimentais de inacessibilidade da MC foram obtidos por Santi-Junior et al. (2013).

Fonte: arquivo pessoal.

As amostras de híbridos de cana-de-açúcar não tratadas, pré-tratadas com ácido sulfúrico (90 min) e sequencialmente deslignificadas (30 min) foram então caracterizadas quanto à porosidade. Primeiramente, foram determinados valores de 1,79 (H89), 1,74 (H140) e 1,53 mL/g (H321), como FSP dos híbridos não tratados (Figura 10). Estes valores apresentam-se bem superiores àquele observado (0,89 mL/g) para o bagaço de cana-de-açúcar de usina (SANTI-JUNIOR et al., 2013). A notável diferença entre o FSP dos

híbridos e do bagaço de usina poderia estar associada às etapas de processamento prévio empregado nos dois tipos de cana. O bagaço de cana, originado de uma usina sucro-alcooleira (no Brasil), resulta de uma série de etapas sequenciais de moagem e, muitas vezes, lavagem a quente para extrair a sacarose (o caldo) da cana-de-açúcar (NOGUEIRA, 2008). Por outro lado, o bagaço originário dos híbridos em estudo resultou de uma etapa de picagem, sem moenda, e de extração de sacarose por infusão em água fria sob agitação mecânica. Supõe-se que a pressão aplicada pelas moendas e a lavagem a quente possa ter afetado (colapsado) os poros inacessíveis à sonda de 553 Å presentes na parede celular do bagaço originado no processo industrial da cana-de-açúcar, gerando uma matriz menos porosa. Diferentemente, a extração da sacarose por picagem sem uso de moenda e com água fria teria proporcionado a manutenção da estrutura porosa dos híbridos.

Em geral, o volume de poros totais (FSP) das três amostras de híbridos de cana-de-açúcar diminuiu significativamente quando pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído (Tabela 11). Os poros acessíveis à moléculas de tamanhos similares às celulasas também foi diminuído pela condição de pré-tratamento ácido avaliada (Figura 11). Por sua vez, a subsequente deslignificação aumentou levemente o volume de poros acessíveis às sondas pequenas destas amostras já pré-tratadas com ácido, porém os valores não retornaram aos observados nos materiais não tratados.

Os pré-tratamentos são frequentemente descritos como capazes de tornar a parede celular de materiais lignocelulósicos significativamente mais porosas e acessíveis às enzimas celulolíticas (ALVIRA et al., 2010; CHANDRA et al., 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002). Utilizando a técnica de exclusão de solutos, alguns trabalhos envolvendo o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído relatam aumentos na porosidade de amostras de forragem de milho (ISHIZAWA et al., 2007), pinheiro branco, álamo (GRETHLEIN, 1985) e mistura de madeira de folhosas (THOMPSON; CHEN; GRETHLEIN, 1992). No entanto, o estudo realizado na presente tese empregou amostras pré-tratadas com ácido por 90 min, situação na qual quase toda a hemicelulose foi removida da parede celular. A remoção expressiva da hemicelulose pode ter tornado a parede celular bastante frágil, ocasionando o seu colapso, o que acarretaria numa diminuição de todos os poros da parede celular. Outro fenômeno já descrito na literatura que permitiria explicar a diminuição de poros acessíveis à moléculas de 50 Å, envolve a redistribuição de lignina no interior da parede celular nos processos de tratamento em meio ácido realizados em temperaturas superiores a 130 °C. A partir desta temperatura, a lignina apresenta-se na forma fluída e pode se deslocar no interior da parede

celular, ocupando espaços anteriormente formados por poros ou mesmo os espaços liberados pela remoção de hemicelulose (DONOHOE et al., 2008).

Figura 10 – Distribuição do tamanho de poros dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados (preto), pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (vermelho) e sequencialmente deslignificados (azul). Os círculos representam pontos experimentais (duplicatas), enquanto as linhas cheias representam os dados ajustados pelo modelo logarítmico.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 11 – Acessibilidade dos híbridos não tratados (preto), pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (vermelho) e sequencialmente deslignificados (azul) às sondas moleculares de diferentes tamanhos. As barras cinza destacam a região semelhante ao tamanho típico de celulases produzidas por fungos.

Fonte: arquivo pessoal.

A ausência de trabalhos com cana-de-açúcar, ou até mesmo bagaço, dificultou a compreensão sobre o fato do pré-tratamento ácido ter diminuído a porosidade dos híbridos de cana aqui avaliados. Nesse sentido, impossibilitando inferir se plantas de cana-de-açúcar apresentam estruturas de parede celular mais susceptíveis à desconstrução pelo pré-tratamento ácido, comparadas à outros tipos vegetais (citados acima). Ou ainda, saber se a diminuição na porosidade dos três híbridos destoaria de outras linhagens de cana-de-açúcar, o que indicaria certa peculiaridade dos híbridos H89, H140 e H321.

A capacidade dos materiais lignocelulósicos em reter água (*water retention value*, WRV) têm sido diretamente correlacionada com o FSP das amostras. Apesar dos resultados serem determinados por técnicas diferentes, estes parâmetros refletem as mesmas características da amostra (SANTI-JUNIOR et al., 2013; SCALLAN; CARLES, 1972). Com isso, visando “validar” a porosidade determinada para os híbridos não tratados, pré-tratados com ácido e sequencialmente deslignificados, estas amostras foram também caracterizadas quanto ao WRV. Os dados obtidos de WRV dos híbridos não tratados diminuíram após o pré-tratamento ácido, e foram mantidos quase que inalterados quando subsequentemente deslignificados (Tabela 11); comportamento bem similar ao discutido acima para o volume total de poros (FSP). Por isso, quando plotados os valores de WRV contra os de FSP, houve uma boa correlação entre esses parâmetros – R^2 de 0,92 (Figura 12). Este resultado confirma a coerência dos valores de porosidade atribuídos às amostras e, ainda, sobre o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído ter diminuído significativamente a porosidade dos três híbridos de cana.

Tabela 11 – Valores de ponto de saturação de fibra e retenção de água dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético

Híbrido	Amostra	*FSP (mL H ₂ O/g sólido seco)	**WRV (g H ₂ O/g sólido seco)
89	Não tratada	1,79	1,78±0,01
	¹ Ácido	0,54	0,80±0,05
	² Clorito-ácido	0,62	0,85±0,01
140	Não tratada	1,74	1,48±0,01
	¹ Ácido	0,48	0,94±0,01
	² Clorito-ácido	0,59	1,01±0,02
321	Não tratada	1,53	1,65±0,01
	¹ Ácido	0,51	0,89±0,01
	² Clorito-ácido	0,50	0,89±0,01

¹ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, durante 90 min; ² = amostras pré-tratadas com ácido e sequencialmente submetidas à duas cargas de clorito de sódio/ácido acético; * = dados modelados; ** = Os dados de valor de retenção de água representam a média de duplicatas, seguido de seus desvios padrão.

Figura 12 – Correlação entre os valores de ponto de saturação de fibra (FSP) e retenção de água (WRV) dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul) não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético.

Fonte: arquivo pessoal.

A literatura também aponta o volume de poro acessível do material lignocelulósico, principalmente àqueles de tamanho equivalente ao das celulasas (50 Å), como determinante para a eficiência da hidrólise enzimática. Contudo, alguns poucos estudos, de fato, têm demonstrado correlações diretas entre acessibilidade da amostra à sondas de 50 Å e rendimento de conversão enzimática da glucana (SANTI-JUNIOR et al., 2013; WONG et al., 1988). Por outro lado, Ishizawa et al. (2007) não traçaram tais correlações, quando utilizaram amostras de forragem de milho pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído. Ao invés disso, os autores descrevem que o pré-tratamento somente tendeu a elevar o volume de poro acessível à 50 Å e a conversão da glucana das amostras. Assim, os rendimentos de conversão de glucana das amostras de híbridos foram plotados em função de seus respectivos volumes de poros acessíveis à sonda de 50 Å (região destacada na Figura 11). Diante disso, não foi possível estabelecer qualquer tipo de correlação entre o volume de poros acessíveis e os rendimentos de conversão, nem mesmo determinar uma simples tendência (Figura 13). Estas observações permitem inferir que a porosidade da parede celular dos híbridos pré-tratados com ácido e posteriormente deslignificados com clorito-ácido não aparece como uma característica microestrutural limitante dos rendimentos de conversão de glucana. Enfatizando tal inferência, destaca-se o fato da amostra mais recalcitrante à conversão enzimática (H140 não tratado) apresentar a maior acessibilidade à 50 Å. Nesse sentido, os resultados apontam que o pré-tratamento ácido, bem como a

subsequente deslignificação, beneficiaram a conversão enzimática de glucana através de outro tipo de modificação microestrutural na matriz desses híbridos.

Figura 13 – Rendimentos de conversão enzimática de glucana das amostras dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul) não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados, em função do volume acessível à sonda de 50 Å.

Fonte: arquivo pessoal.

Fundamentada na teoria da técnica de exclusão de solutos, propusemos uma explicação à diminuição da porosidade dos híbridos de cana após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Considerando que poros de parede celular vegetal exibem tamanhos inferiores a 0,1 µm de raio, enquanto lumens de células mostram-se superiores a 5 µm (COSTA et al., 2013; SANJUÁN et al. 2001), a técnica procura diferenciar os poros da parede dos demais espaços celulares (lúmen, por exemplo); tal distinção é determinada pelo volume d'água na parte interna e externa dos poros. Para isso, utiliza-se uma sonda molecular de diâmetro superior ao de poros, o que certamente delimita seu acesso somente à água externa aos poros. Logo, o volume de água inacessível à sonda de 553 Å, refere-se ao volume total (quantidade) de poros da parede celular. Baseado nestas premissas, a nossa hipótese é que o pré-tratamento ácido teria promovido rachaduras/fissuras nas paredes celulares dos híbridos. Estas fissuras, por sua vez, poderiam levar a ruptura das paredes que se fragilizaram com o pré-tratamento ácido e a ação mecânica ocorrida durante o processamento do material após o tratamento (filtração e lavagem). Uma ilustração gráfica desta hipótese está mostrada na Figura 14. A hipótese considera que as fissuras formadas sobre regiões porosas acarretariam na transformação de poros de parede (< 0,1 µm de raio)

em espaços acessíveis à sonda de 553 Å; e, pela teoria da técnica de exclusão de solutos, isto implicaria na diminuição no volume de poros mensuráveis na parede celular vegetal fragmentada.

Figura 14 – Ilustração gráfica, sem escalas, da hipótese que justificaria a diminuição de poros mensuráveis na parede celular de amostras pré-tratadas com ácido. Os círculos ilustram os poros da parede celular. Os mesmos círculos cheios ilustram poros preenchidos por lignina redistribuída. As linhas representam as fissuras iniciais da parede celular que acarretariam na ruptura das paredes devido à ação mecânica.

Fonte: arquivo pessoal.

A hipótese apresentada anteriormente poderia justificar porque a parede celular, mesmo apresentando menor volume de poros acessíveis (e mensuráveis) às celulasas, foi mais facilmente digerida pelas enzimas, já que a superfície de acesso das enzimas teria sido aumentada pela fragmentação da matriz das paredes celulares.

5.5.2. Glucana acessível

Para melhorar o entendimento do fenômeno de aumento da digestibilidade dos materiais (pré-) tratados, buscou-se avaliar as amostras através de uma metodologia que fornecesse informações mais detalhadas no nível de escala molecular. Neste sentido, a considerando a premissa de que as cadeias de glucana encontram-se embebidas por

hemicelulose e que tal disposição impede fisicamente o acesso das enzimas celulolíticas ao seu substrato (CHANDRA et al., 2007), sugere que ao diminuir os teores de hemicelulose (pré-tratamento ácido) e de lignina (subsequente deslignificação com clorito-ácido) das amostras, os tratamentos tornaram a glucana residual mais exposta às celulasas. Diante disso, optou-se por caracterizar a área superficial acessível de glucana das matrizes não tratadas, pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificadas.

A área superficial acessível de glucana dos híbridos de cana foi determinada pela técnica de coloração diferencial de Simons (1950). Quando desenvolvida, esta metodologia objetivou avaliar de forma qualitativa os danos mecânicos que o processo de refino causava às fibras de polpas celulósicas, através de microscopia óptica. A técnica baseia-se no uso de dois corantes com distintas afinidades às cadeias de glucana, o corante laranja (Direct Orange, DO) e o corante azul (Direct Blue, DB). DO adsorve-se preferencialmente à glucana e exibe um raio hidrodinâmico semelhante ao das enzimas celulolíticas. Apesar de DB apresentar menor afinidade pela molécula de glucana, seu tamanho inferior possibilita sua adsorção àquela glucana não acessível ao DO. Diante de tais características, ao submeter o material em estudo à solução mista de DO e DB, as fibras intactas são coradas de azul, enquanto fibrilas, fragmentos e regiões de fibras danificadas são tingidas de laranja (YU; MINOR; ATALLA, 1995).

Ao longo dos anos, uma série de adaptações metodológicas da técnica de coloração de Simons possibilitou que a mesma fosse empregada para determinar quantitativamente a glucana acessível ao DO nos materiais lignocelulósicos. De forma indireta, se assume que a relação DO/DB estaria correlacionada com a fração da glucana mais acessível às moléculas de raio hidrodinâmico similar aos das celulasas. A determinação quantitativa dos níveis de adsorção de DO e DB se faz de forma indireta, onde o corante remanescente em solução (após se atingir o equilíbrio na presença do sólido em estudo) é determinado por espectrofotometria na região visível. A adsorção dos corantes segue a isoterma de Langmuir, utilizada no cálculo para a determinação da glucana acessível (CHANDRA et al., 2008; CHANDRA; SADDLER, 2012; ESTEGHLALIAN et al., 2001). Atualmente, a razão entre os valores de DO e DB adsorvidos ao material têm sido utilizado como uma ferramenta simples e útil para estabelecer de forma comparativa, quanto da glucana do material em estudo seria acessível às celulasas (ARANTES; SADDLER, 2011).

De fato, a utilização da técnica de Simons permitiu compreender como o pré-tratamento com ácido sulfúrico e a deslignificação sequencial com clorito-ácido proporcionaram maiores rendimentos de conversão enzimática da glucana (Tabela 12). Os

híbridos não tratados apresentaram os menores valores para a relação DO/DB (0,21–0,39), enquanto que, para as amostras pré-tratadas com ácido observou-se valores intermediários, acompanhando a mesma tendência dos respectivos rendimentos de conversão. Por sua vez, a deslignificação sequencial com clorito-ácido gerou amostras com os valores mais elevados de DO/DB (0,95–1,03). A variação encontrada entre vários lotes dos corantes e, principalmente, a demanda por uma série de etapas de preparação e purificação (purificação por ultrafiltração), dificulta a comparação direta dos dados obtidos para a relação DO/DB com os resultados de trabalhos publicados anteriormente (CHANDRA; SADDLER, 2012). Contudo, os valores da relação DO/DB obtidos com um mesmo preparado do corante, avaliando um grupo variado de amostras (híbridos no presente estudo) são passíveis de comparação. Desta forma, os dados obtidos para a relação DO/DB das amostras de híbridos de cana em estudo foram correlacionados com os respectivos rendimentos de conversão, após 72 h de hidrólise enzimática (Figura 15). A correlação observada foi linear e positiva, apresentando elevado valor de R^2 (0,9664), sugerindo que, quanto maior a relação DO/DB e, por dedução, maior a área superficial acessível de glucana às enzimas celulolíticas, mais eficiente foi a conversão enzimática desta fração à glicose.

Tabela 12 – Adsorção dos corantes laranja e azul, área superficial acessível de glucana e máximos rendimentos de conversão enzimática de glucana das amostras de híbridos de cana-de-açúcar

Híbrido	Amostra	Adsorção ao material (mg/g)		DO/DB	* CG (%)
		DO	DB		
89	Não tratada	8,3±0,3	24,9±1,3	0,33	25,6±0,4
	¹ Ácido	19,1±0,6	26,1±0,8	0,73	63,1±2,9
	² Clorito-ácido	19,4±2,0	18,9±1,1	1,03	98,8±2,4
140	Não tratada	3,2±0,0	15,0±0,5	0,21	13,9±0,4
	¹ Ácido	14,3±0,2	20,4±0,5	0,70	48,9±1,5
	² Clorito-ácido	20,3±0,7	21,3±1,8	0,95	92,3±2,7
321	Não tratada	4,9±0,6	15,7±1,4	0,39	14,2±0,5
	¹ Ácido	19,1±1,7	26,2±1,0	0,73	54,9±0,3
	² Clorito-ácido	20,6±0,9	20,5±1,7	1,01	91,3±0,9

* CG = rendimento máximo de conversão enzimática de glucana após 72 h; DO = corante laranja; DB = Corante azul; DO/DB = área superficial acessível de glucana às celulasas; ¹ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, durante 90 min; ² = amostras pré-tratadas com ácido e sequencialmente submetidas à duas cargas de clorito de sódio/ácido acético.

Figura 15 – Rendimentos de conversão enzimática em função da área superficial acessível de glucana dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul) não tratados (triângulo), pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (quadrado) e sequencialmente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético (círculo).

Fonte: arquivo pessoal.

O conjunto de dados obtidos destaca a habilidade do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, bem como o da subsequente deslignificação com clorito-ácido, em modificar a microestrutura (porosidade e glucana acessível) dos híbridos de cana-de-açúcar estudados. No entanto, os rendimentos de conversão enzimática destas amostras apresentaram uma correlação direta (e linear) somente com o aumento da relação DO/DB (área superficial acessível de glucana). Nesse sentido, pode-se corroborar que, tanto a hemicelulose, quanto a lignina promovem uma barreira física protetora, a qual impede a interação glucana-celulases. Os dados sugerem ainda que a eficiência de um pré-tratamento pode ser atribuída à sua capacidade de expor a maior área superficial de glucana possível às celulases, já que tal característica se mostra diretamente relacionada com rendimentos de conversão enzimática.

Adicionalmente, os resultados apresentados na presente tese abrem espaço para a discussão sobre a real importância da porosidade da parede celular de materiais lignocelulósicos nos rendimentos de hidrólise enzimática; visto que poucos são os trabalhos que, de fato, estabeleceram correlações diretas entre rendimento de conversão enzimática e volume total de poros de parede, ou até especificamente para o poro acessível às celulases (50 Å). Cabe enfatizar que a maior parte dos trabalhos que sugerem que o aumento de porosidade torna o material mais reativo às celulases foi realizado em condições que, simultaneamente, ocorreram remoções de hemicelulose e/ou lignina devido

à pré-tratamentos. Por isso, e por não reportarem sobre a área superficial acessível de glucana das amostras, torna-se questionável se o verdadeiro motivo dos aumentos no rendimento de conversão foi o aumento de porosidade do material. Face ao exposto, permanece uma questão merecedora de um trabalho experimental adicional: O aumento gradual da porosidade da matriz lignocelulósica, em detrimento à maior exposição de glucana, permitiria elevar os rendimentos de conversão enzimática da glucana? Esta questão demanda uma abordagem experimental que permita aumentar a porosidade do material sem um correspondente aumento na acessibilidade da glucana, o que não parece ser um processo de fácil execução. Por outro lado, o fenômeno inverso, diminuição de poros acessíveis às celulasas com aumento da glucana acessível, foi obtido através do pré-tratamento ácido realizado nesta tese. Neste caso, os dados indicam que não é necessário aumentar poros acessíveis se há fragmentação da parede celular e consequente aumento de exposição da glucana.

5.6. Parâmetro para predição de rendimentos de conversão enzimática da glucana

Anteriormente, foi estabelecido que os rendimentos de conversão enzimática da glucana dos três híbridos de cana-de-açúcar são limitados pela presença de hemicelulose e lignina, as quais impedem fisicamente que as celulasas alcancem as cadeias de glucana. Diante deste dado, avistou-se então a possibilidade de predizer a susceptibilidade da glucana à hidrólise enzimática, somente com o conhecimento da composição química da amostra. Para melhor compreender sobre o desenvolvimento do parâmetro de predição de conversão enzimática, algumas informações tornam-se relevantes. Primeiramente, se considerou o fato da área superficial acessível de glucana (DO/DB) acompanhar o aumento do teor de glucana de materiais lignocelulósicos pré-tratados (ARANTES; SADDLER, 2011), o que indicaria que amostras enriquecidas em glucana apresentariam rendimentos mais elevados de conversão. Por sua vez, para se obter amostras enriquecidas em glucana, é necessário diminuir o teor de constituintes “não-glucanas” da parede celular vegetal; o que, consequentemente, leva ao aumento da área superficial acessível de glucana, e também à maiores rendimentos de conversão. Tais observações sugerem que, ao apresentar teores de glucana proporcionalmente maiores do que a soma dos demais constituintes, as amostras seriam mais susceptíveis à conversão enzimática. Deste modo, o parâmetro de

predição denominado “Glucana Disponível”, corresponde à razão entre o teor de glucana e a soma dos constituintes não-glucana do material (hemicelulose, lignina e extrativos) – equação 8.

$$\text{Glucana Disponível} = \frac{\text{Glucana}}{(\text{Hemicelulose} + \text{Lignina} + \text{Extrativos})} \quad (8)$$

A seção anterior mostra a relação direta da área superficial acessível de glucana (DO/DB) com os rendimentos de conversão enzimática das amostras. E no parágrafo anterior, ainda foi discutido sobre amostras com teores elevados de glucana exibirem as maiores DO/DB. Tendo em vista que a Glucana Disponível procura expressar o teor proporcional de glucana, entende-se que uma correlação com a DO/DB seria o primeiro indício da potencialidade desse parâmetro em prever rendimentos de conversão. Com isso, a Glucana Disponível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e sequencialmente deslignificados com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético, foram correlacionados com os dados de DO/DB (Figura 16). A correlação observada foi positiva, porém não linear. De fato, a proporcionalidade das duas propriedades das amostras aponta para um valor limite de DO/DB quando a glucana disponível tende ao “infinito”. Este valor limite de DO/DB se aproxima do valor determinado experimentalmente para uma polpa de dissolução (polpa que contém essencialmente celulose e pequenas quantidades de hemicelulose), o qual foi de 1,04; sugerindo que a relação DO/DB responde aos maiores teores de Glucana Disponível em um material, mas que a proporcionalidade entre os valores diminui à medida que o teor de Glucana Disponível é bastante elevado. De fato, essa tendência é lógica, visto que materiais com teores de glucana acima de 65-70% (Glucana Disponível 1,8-2,3) devem apresentar a maior parte da glucana acessível à ligação com o corante DO.

Figura 16 – Área superficial acessível de glucana das diferentes amostras dos híbridos H89 (vermelho), H140 (preto) e H321 (azul), em função da Glucana Disponível.

Fonte: arquivo pessoal.

Baseado na correlação linear DO/DB e na correlação positiva entre DO/DB e os teores de Glucana Disponível, graficamos os rendimentos de conversão de glucana das diferentes amostras de híbridos em relação aos seus valores de Glucana Disponível (Figura 17). A correlação novamente se mostrou positiva e não linear, apontando para um valor limite de conversão de glucana próximo à 100 %, para valores de Glucana Disponível maiores do que 3, o que significa materiais pré-tratados com cerca de 75% de glucana. O perfil da correlação mostrada na Figura 17 sugere ainda que, inicialmente, um pequeno aumento da Glucana Disponível das amostras seria suficiente para proporcionar aumentos expressivos nos rendimentos de conversão enzimática; e, a partir de certo ponto, o inverso cabe a tal observação, quando se torna necessário um aumento considerável da Glucana Disponível para um pequeno avanço nos rendimentos de conversão. Este último comportamento indicaria sobre a proximidade do platô da curva, uma região onde não adiantaria aumentar a Glucana Disponível do substrato, pois os rendimentos de conversão já se apresentam bem próximo ao máximo teórico.

Figura 17 – Rendimentos máximos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (90 min) e sequencialmente deslignificados (30 min). Os valores de conversão enzimática representam a média de triplicadas e seus desvios padrão (barras).

Fonte: arquivo pessoal.

Adicionalmente, seria interessante utilizar resultados de hidrólise enzimática reportados na literatura, para verificar a capacidade do parâmetro em se ajustar à outros dados, inclusive de diferentes materiais lignocelulósicos. Porém, qualquer conclusão sobre esta circunstância, fosse ela positiva ou negativa, não viria da abordagem mais adequada. Ou seja, tais dados não permitiriam realizar comparações apropriadas, considerada as diferenças metodológicas de análise composicional e, principalmente, as condições de hidrólise enzimática que as amostras foram submetidas (temperatura, agitação, carga enzimática, extrato enzimático comercial, etc.). Nesse sentido, a alternativa encontrada foi utilizar os rendimentos máximos de conversão e a Glucana Disponível dos híbridos pré-tratados de 20 a 60 min com ácido sulfúrico diluído, e mais os daqueles sequencialmente deslignificados com uma carga (15 min) de clorito-ácido. Revelando um resultado bem interessante, onde mesmo adicionando mais 15 amostras diferentes, a correlação entre rendimento de conversão enzimática e Glucana Disponível manteve-se satisfatória (Figura 18).

Os dados indicam que existe um grande potencial de se prever os rendimentos de conversão enzimática através do simples conhecimento da composição química das amostras. Apesar do parâmetro Glucana Disponível não fazer qualquer distinção entre a hemicelulose e a lignina contida nas amostras, alguns estudos mostram a necessidade de

remover menos lignina para alcançar maiores rendimentos de conversão (SANTI-JUNIOR et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013), comparado a dados para a digestibilidade de amostras onde se remove hemicelulose (presente tese). Talvez, caso seja estabelecida a real influência da hemicelulose e da lignina na hidrólise enzimática, alguns ajustes numéricos à equação poderiam melhorar ainda mais a predição dos rendimentos de conversão.

Figura 18 – Rendimentos máximos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (20–90 min) e sequencialmente deslignificados (15 e 30 min). Os valores de conversão enzimática representam a média de triplicadas e seus desvios padrão (barras).

Fonte: arquivo pessoal.

O parâmetro de correlação estimado com os dados disponíveis aponta para uma situação de grande utilidade para se predizer a susceptibilidade do material à conversão enzimática. De fato, este tipo de parâmetro, ampliado para um conjunto de dados que independa da biomassa e do pré-tratamento em questão, se tornaria uma ferramenta de grande valor. Por exemplo, facilitaria a prospecção de plantas naturalmente menos recalcitrantes à hidrólise enzimática, e após um pré-tratamento, estimaria o rendimento de conversão da amostra resultante. Além disso, apontaria em direção de se obter cultivares de cana-de-açúcar com elevada proporção de glucana em sua constituição; técnicas de melhoramento genético permitiriam super-expressar os genes das plantas específicos para tal finalidade.

6. CONCLUSÕES

Os três híbridos de cana-de-açúcar, com teores contrastantes de hemicelulose e lignina, respondem diferentemente ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Tal processo afetou mais ou menos um específico constituinte estrutural da parede celular, em função da sua origem (híbrido). No entanto, para os três híbridos, houve um padrão de susceptibilidade destes constituintes ao pré-tratamento ácido: hemicelulose > lignina > glucana. Em geral, o H89 apresentou-se mais susceptível às condições de pré-tratamento avaliadas; em contra ponto, H140 e H321 exibem de maneira semelhante, maior resistência à ação desse processo. O modo com que os polissacarídeos e os grupos acetila são solubilizados pelo pré-tratamento ácido também difere dentre os híbridos. A superior estabilidade e proporção de oligômeros ($DP \geq 2$) encontrada nos hidrolisados ácidos do H321, inferem que tais constituintes foram inicialmente removidos dessa matriz, durante o pré-tratamento ácido, em fragmentos com maior grau de polimerização.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído aumentou expressivamente os rendimentos de conversão enzimática da glucana dos híbridos não tratados. Dada melhora deve-se à confirmação da influência direta que a hemicelulose exerce sobre os rendimentos de conversão. Porém, ainda que estabelecidas correlações, a interferência da hemicelulose à conversão enzimática mostra-se limitada; visto que elevadas remoções de hemicelulose não permitiram alcançar rendimentos de conversão próximos aos máximos teóricos. Além disso, a hemicelulose de cada híbrido influencia de maneira mais ou menos acentuada a conversão enzimática do seu conteúdo de glucana. Dado este que, através da remoção da fração hemicelulósica das plantas naturalmente mais recalcitrantes (H140 e H321), foram obtidos rendimentos de conversão proporcionalmente maiores.

A sequencial aplicação do tratamento com clorito de sódio/ácido acético, aos híbridos já pré-tratados com ácido sulfúrico, diminuiu efetiva e seletivamente o teor de lignina destas amostras, com pouca ação sobre a fração polissacarídica. Inicialmente, não houve correlação direta entre remoção de lignina e rendimento de conversão enzimática da glucana. Porém, os baixos rendimentos de conversão das amostras pré-tratadas com ácido foram efetivamente contornados, em virtude da diminuição do teor de lignina. De fato, a lignina residual nas amostras pré-tratadas com ácido confere importante influência nos baixos rendimentos observados de conversão de glucana. Ainda durante o tratamento com clorito-ácido, a fração de lignina responsável por adsorver improdutivamente as celulases

foi removida, o que tornou dispensável o uso de BSA aos ensaios de hidrólise enzimática das amostras parcialmente deslignificadas. Adicionalmente, vale destacar que BSA pode também subestimar os rendimentos de conversão do material, onde um estudo prévio deveria inferir sobre a real necessidade de utilizar tal aditivo.

Os híbridos de cana-de-açúcar mais recalcitrantes (H140 e H321) permanecem com rendimentos inferiores de conversão enzimática, mesmo após idênticas condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e deslignificação sequencial com clorito de sódio/ácido acético. Apesar disso, os (pré-) tratamentos conferem ganhos de conversão proporcionalmente maiores à estas plantas, comparados a planta menos recalcitrante (H89). Além disso, ao remover principalmente hemicelulose, o pré-tratamento ácido foi mais indicado para incrementar o rendimento de conversão do material com maior teor inicial desse constituinte (H321); enquanto que, para o H140 (mais lignificado), o processo de deslignificação subsequente com clorito-ácido mostra-se mais eficiente. Como fontes potenciais de glicose, recuperação via conversão enzimática da glucana, os híbridos também diferem entre si. Considerando uma mesma área disponível ao plantio, certamente a maior obtenção de glicose viria do H89 (Kg/hectare), independente do pré-tratamento empregado. Por outro lado, ao visar glicose a partir de certa quantidade de híbrido (Kg/ton de material processado), os híbridos H89 e H321 representariam as matérias-primas mais adequadas quando pré-tratadas com ácido sulfúrico. Caso a configuração do processo contasse com o pré-tratamento ácido e posterior deslignificação, os híbridos H140 e o H321 seriam as matérias-primas mais rentáveis.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído alterou significativamente a característica microestrutural da parede celular dos três híbridos de cana-de-açúcar. A porosidade inicial dos híbridos não tratados foi comprometida pelo pré-tratamento ácido, a qual não pôde ser reparada mesmo após a subsequente deslignificação com clorito-ácido. Por outro lado, o pré-tratamento ácido proporciona o aumento da área superficial acessível da glucana contida nas matrizes dos híbridos, sendo ainda incrementada pela subsequente deslignificação. Então, os rendimentos de conversão de glucana dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido e sequencialmente deslignificados puderam ser diretamente (linearmente) correlacionados à área superficial de glucana das amostras. Face o exposto, conclui-se que o pré-tratamento ácido, bem como a subsequente deslignificação, beneficiam a conversão enzimática da glucana, através de modificações estruturais que levam à maior exposição das cadeias de glucana às celulasas. De forma complementar,

tanto a hemicelulose, quanto a lignina, impedem fisicamente (barreira) a interação glucana-celulases.

Os rendimentos de conversão enzimática de diferentes amostras de híbridos de cana-de-açúcar ajustaram-se bem ao parâmetro Glucana Disponível. Embora representem apenas resultados preliminares, futuramente, estudos mais detalhados poderiam confirmar o potencial da Glucana Disponível em prever a conversão enzimática da glucana de outros materiais lignocelulósicos. Tal parâmetro, o qual considera somente a composição química das amostras, conferiu boas correlações com os rendimentos de conversão para um grande e heterogêneo grupo de amostras – química e morfológicamente contrastantes, e provenientes de dois diferentes processos de (pré-) tratamento. A Glucana Disponível infere que a conversão enzimática é aumentada segundo o enriquecimento do teor de glucana nas amostras, decorrente da diminuição indiferente dos teores de lignina, hemicelulose e extraíveis. A não distinção desses constituintes para determinar a Glucana Disponível do material, nos direciona à considerar sobre a importância de se desenvolver cultivares de cana-de-açúcar com elevada proporção de glucana, em sua composição.

REFERÊNCIAS

AACHMANN, F.L.; SØRLIE, M.; SKJÁK-BRÆK, G.; EIJSINK, V.G.H.; KOLSTAD-VAAJE, G. NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 18779-18784, 2012.

AHLGREN, P.A.; GORING, D.A.I. Removal of wood components during chlorite delignification of black spruce. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 1272-1275, 1971.

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.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4:3, 2011.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J.F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7-18, 2013a.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J.F. Optimization of dilute sulfuric acid pretreatment to maximize combined sugar yield from sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 610-630, 2013b.

BENJAMIN, Y.; GARCÍA-APARICIO, M.P.; GÖRGENS, J.F. Impact of cultivar selection and process optimization on ethanol yield from different varieties of sugarcane. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198-209, 2006.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 287-296, 2007.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1575-1588, 2012.

BRIENZO, M.; FERREIRA, S.; VICENTIM, M.P.; DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. Comparison study on the biomass recalcitrance of different tissue fractions of sugarcane culm. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 1454-1465, 2014.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

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

BUCKERIDGE, M.S.; DE SOUZA, A.P. Breaking the “glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **Bioenergy Research**, doi: 10.1007/s12155-014-9460-6, 2014.

BUCKERIDGE, M.S.; RAYON, C.; URBANOWICZ, B.; TINÉ, M.A.S.; CARPITA, N.C. Mixed linkage (1→3), (1→4)-β-D-glucans of grasses. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 115-127, 2004.

CANELLA, D.; HSIEH, C.-W.C.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

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

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1869-1876, 2008.

CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Reviews on Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 445-476, 1996.

CARPITA, N.C.; McCANN, M.C. The maize mixed-linkage (1→3), (1→4)-β-D-glucan polysaccharide is synthesized at the golgi membrane. **Plant Physiology**, v. 153, pp. 1362-1371, 2010.

CARROLL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 165-182, 2009.

CHANDRA, R.; EWANICK, S.; HSIEH, C.; SADDLER, J.N. The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, Part 1: A modified Simons' staining technique. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1178-1185, 2008.

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.

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

CHANDRA, R.P.; AU-YEUNG, K.; CHANIS, C.; ROOS, A.A.; MABEE, W.; CHUNG, P.A.; GHATORA, S.; SADDLER, J.N. The influence of pretreatment and enzyme loading on the effectiveness of batch. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 77-85, 2011.

CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. Use of the Simons' staining technique to assess cellulose accessibility in pretreated substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 8, p. 230-237, 2012.

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

CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). **Variedades CTC**. Disponível em: <www.ctcanavieira.com.br>. Acesso em: 07 nov. 2014.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Avaliação da safra brasileira: cana-de-açúcar 2014/15**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 07 nov. 2014.

DAVISON, B.H.; DRESCHER, S.R.; TUSKAN, G.A.; DAVIS, M.F.; NGHIEM, N.P. Variation of S/G ratio and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 427-435, 2006.

DIEN, B.S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J.F.; SATTLER, S.E.; CHEN, H.; FUNNEL-HARRIS, D.L.; NICHOLS, N.N.; COTTA, M.A. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines with reduced lignin contents. **Bioenergy Research**, v. 2, p. 152-164, 2009.

DING, S.-Y.; HIMMEL, M.E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.

DONOHUE, B.S.; DECKER, S.R.; TUCKER, M.P.; HIMMEL, M.E.; VINZANT, T.B. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, p. 913-925, 2008.

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

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

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 101, p. 41-60, 2002.

ESTEGHLALIAN, A.R.; BILODEAU, M.; MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N. Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulose enzymes? **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1049-1054, 2011.

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

FAN, L.T.; LEE, Y.-H.; BEARDMORE, D.R. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 419-424, 1981.

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

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

FLETCHER, K. POET-DSM, DuPont, Abengoa begin commissioning cellulosic plants. **Ethanol Producer Magazine**, June 11, 2014.

FU, C.; MIELENZ, J.R.; XIAO, X.; GE, Y.; HAMILTON, C.Y.; RODRIGUEZ JR, M.; CHEN, F.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A.; BOUTON, J.; DIXON, R.A.; WANG, Z.-Y. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 3803-3808, 2011.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, 2012.

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

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

GONÇALVES, D.S.P.O. **Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de lignina**. 2013. 130p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biotecnologia: Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

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

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

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

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

GROHMANN, K.; MITCHELL, D.J.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E.; SCHROEDER. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20-21, p. 25-61, 1989.

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

GUO, F.; SHI, W.; SUN, W.; LI, X.; WANG, F.; ZHAO, J.; QU, Y. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

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.

HARRIS, P.V.; WELNER, D.; McFARLAND, K.C.; RE, E.; POULSEN, J.-C.N.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, K.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LEGGIO, L.L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305-3316, 2010.

HEMSWORTH, G.R.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G.J.; WALTON, P.H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 122-128, 2014.

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

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and carbohydrate chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009.

HSU, T.-S.; GUO, G.-L.; CHEN, W.-H.; HWANG, W.-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, 4907-4913, 2010.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A.; GOURLAY, K.; SADDLER, J.N. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, p. 2308-2315, 2014.

HU, F.; JUNG, S.; RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 7-15, 2012.

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

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

JANSSON, M.B.; NILVEBRANT, N.-O. Wood extractives. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009.

JEOH, T.; ISHIZAWA, C.I.; DAVIS, M.F.; HIMMEL, M.E.; ADNEY, W.S.; JOHNSON, D.K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 112-122, 2007.

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

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.

KRISTENSEN, J.B.; BÖRJESSON, J.; BRUUN, M.H.; TJERNELD, F.; JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 126-131, 2009.

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

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

KUMAR, R.; WYMAN, C. The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 290-300, 2008.

LARSEN, J.; HAVEN, M. Ø.; THIRUP, L. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 36-45, 2012.

LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H.V.; AUER, M.; VOGEL, K.P.; SIMMONS, B.A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4900-4906, 2010.

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

LU, X.B.; ZHANG, Y.M.; YANG, J.; LIANG, Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, p. 938-944, 2007.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.

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

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 content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4:55, 2011.

MASARIN, F.; NEVES, A.S.; MILAGRES, A.M.F.; FERRAZ, A. Evaluation of a simple alkaline pretreatment for screening of sugarcane hybrids according to their in vitro digestibility. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 390-395, 2013.

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

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.

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

MOE, S.T.; JANGA, K.K.; HERTZBERG, T.; HÄGG, M.-B.; ØYASS, K.; DYRSET, N. Saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel and biorefinery applications – A renaissance for the concentrated acid hydrolysis? **Energy Procedia**, v. 20, p. 50-58, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MOXLEY, G.; GASPAR, A.R.; HIGGINS, D.; XU, H. Structural changes of corn stover lignin during acid pretreatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1289-1299, 2012.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y.-H.P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3684-3688, 2007.

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

OLIVEIRA, D.M.; FINGER-TEIXEIRA, A.; MOTA, T.R.; SALVADOR, V.H.; MOREIRA-VILAR, F.C.; MOLINARI, H.B.C.; MITCHELL, R.A.C.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; DOS SANTOS, W.D. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1-9, 2014.

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

PULS, J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. **Macromolecular Symposia**, v. 120, p. 183-196, 1997.

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

QUINLAN, R.J.; SWEENEY, M.D.; LEGGIO, L.L.; OTTEN, H.; POLSEN, J.-C.N.; JOHANSEN, K.S.; KROGH, K.B.R.M.; JØRGENSEN, C.I.; TOVBORG, M.; ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C.P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G.J.; WALTON, P.H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 15079-15084, 2011.

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

RIBOULET, C.; LEFÈVRE, B.; DÉNOUE, D.; BARRIÈRE, Y. Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, p-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. **Maydica**, v. 53, p. 11-19, 2007.

ROCHA, G.J.M.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C.; GONÇALVES, A.R.; NASCIMENTO, V.M.; SOUTO-MAIOR, A.M. Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. **Sugar Tech**, v. 15, p. 390-398, 2013.

RODRÍGUEZ, M.M. Lignin structure. Disponível em: <http://howaboutlignin.blogspot.com.br>, 2013. Acesso em 08 dez. 2014.

SAMMOND, D.W.; YARBROUGH, J.M.; MANSFIELD, E.; BOMBLE, Y.J.; HOBDEY, S.E.; DECKER, S.R.; TAYLOR, L.E.; RESCH, M.G.; BOZELL, J.J.; HIMMEL, M.E.; VINZANT, T.B.; CROWLEY, M.F. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 289, p. 20960- 20969, 2014.

SAMUEL, R.; PU, Y.; RAMAN, B.; RAGAUSKAS, A.J. Structural characterization and comparison of switchgrass ball-milled lignin before and after dilute acid pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 62-74, 2010.

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

SANTI-JUNIOR, C. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem**. 2012, 104p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biotecnologia: Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

SANTI-JUNIOR, C.; MILAGRES, A.M.F.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignina removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v. 20, p. 3165-3177, 2013.

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

SANTOS, V.T.O.; ESTEVES, J.E.; 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.

SASAKI, T.; TANAKA, T.; NANBU, N.; SATO, Y.; KAINUMA, K. Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbial cellulase. **Biotechnololy and Bioengineering**, v. 21, p. 1031-1042, 1979.

SCALBERT, A.; MONTES, B.; LALLEMAND, J.-Y.; GUITTET, E.; ROLANDO, C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1359-1362, 1985.

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

SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

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. 105-108, p. 69-85, 2003.

SIQUEIRA, G.A.; 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, 2011.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399-402, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO., 2008.

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

STUDER, M.H.; DeMARTINI, J.D.; DAVIS, M.F.; SYKES, R.W.; DAVISON, B.; KELLER, M.; TUSKAN, G.A.; WYMAN, C.E. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 6300-6305, 2011.

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

TAI, C.; KESHWANI, D. Impact of pretreatment with dilute sulfuric acid under moderate temperature on hydrolysis of corn stover with two enzyme systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2628-2639, 2014.

TELEMAN, A. Hemicelluloses and pectins. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009.

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

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

UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2013/2014**. Disponível em: <www.unicadata.com.br>. Acesso em: 07 nov. 2014.

UPPUGUNDLA, N.; SOUSA, L.C.; CHUNDAWAT, S.P.S.; YU, X.; SIMMONS B.; SINGH, S.; GAO, X.; KUMAR, R.; WYMAN, C.E.; DALE.; BALAN, V. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7:72, 2014.

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiatermomecânico**. 2013, 122p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biotecnologia: Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

VÄLJAMÄE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 254-257, 2003.

VANHOLME, B.; DESMET, T.; RONSSE, F.; REBAEY, K.; BREUSEGEM, V.F.; MEY, M.D.; SOETAERT, W.; BOERJAN, W. Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-17, 2013.

VÁRNAI, A.; COSTA, T.H.F; FAULDS, C.B.; MILAGRES, A.M.F.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, *p*-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

WEISS, N.D.; FARMER, J.D.; SCHELL, D.J. Impact of corn stover composition on hemicellulose conversion during dilute acid pretreatment and enzymatic cellulose digestibility of the pretreated solids. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 674-678, 2010.

WIJAYA, Y.P.; PUTRA, R.D.D.; WIDYAYA, V.T.; HA, J.-M.; SUH, D.J.; KIM, C.S. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 221-231, 2014.

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

WOOD, T.M.; BATH, M.K. In: WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.-Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, 421-450, 2011.

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

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

YOON, S.-Y.; HAN, S.-H.; SHIN, S.-J. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. **Energy**, v. 77, p. 19-24, 2014.

YU, X.; MINOR, J.L.; ATALLA, R.H. Mechanism of action of Simons' stain. **Tappi Journal**, v. 78, p. 175-180, 1995.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZHANG, T.; KUMAR, R.; TSAI, Y.-D.; ELANDER, R.T.; WYMAN, C.E. Xylose yields and relationship to combined severity for dilute Acid post-hydrolysis of xylooligomers from hydrothermal pretreatment of corn stover. **Green Chemistry**, doi: 10.1039/C4GC01283F, 2014.

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

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

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.

APÊNDICES

Figura 19 – Determinação da absorvidade molar ($L\ g^{-1}\ cm^{-1}$) em 455 nm (A) e 624 nm (B) da solução do corante laranja (DO) utilizada nos experimentos para avaliar a área superficial acessível de glucana. Os valores utilizados correspondem ao termo 'a' de cada equação: $y = ax + b$.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 20 – Determinação da absorvidade molar ($L\ g^{-1}\ cm^{-1}$) em 455 nm (A) e 624 nm (B) da solução do corante azul (DB) utilizada nos experimentos para avaliar a área superficial acessível de glucana. Os valores utilizados correspondem ao termo 'a' de cada equação: $y = ax + b$.

Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 13 – Composição química, rendimento e balanço de massa dos híbridos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e subsequente designificação com clorito de sódio/ácido acético

Híbrido	Tratamento	Tempo	Composição química (% m/m)				Rendimento (%)	Balanço de massa (g/100g original de material)		
			Extraíveis	Glucana	Hemicelulose	Lignina		Glucana	Hemicelulose	Lignina
89	Não tratado	-	7,5±0,1	40,3±0,1	27,3±0,3	16,8±0,1	100,0	40,3	27,3	16,8
		20 min	3,8±0,1	41,9±0,0	24,6±0,7	20,4±0,2	82,8	34,7	20,5	16,9
		30 min	7,5±0,1	53,8±2,2	12,8±0,4	21,1±0,2	63,0	33,9	8,1	13,3
	¹ Ácido	40 min	7,6±0,2	54,1±1,0	11,6±0,2	21,5±0,1	62,1	33,6	7,1	13,4
		60 min	7,6±0,3	58,8±0,5	7,4±0,1	22,1±0,1	59,8	35,1	4,2	13,2
		90 min	8,0±0,1	64,4±0,2	4,8±0,1	21,8±0,1	53,1	34,2	2,6	11,6
	² Clorito-ácido	15 min	3,7±0,1	68,7±0,3	5,1±0,1	18,7±0,3	47,9	32,9	2,4	9,0
		30 min	3,3±0,1	76,3±0,3	5,3±0,3	10,9±0,1	42,4	32,4	2,2	4,6
140	Não tratado	-	5,1±0,5	38,2±0,5	27,0±0,3	21,5±0,2	100,0	38,2	27,0	21,5
		20 min	3,6±0,2	39,0±0,3	24,2±0,2	24,8±0,2	88,8	34,6	21,5	22,0
		30 min	6,4±0,5	47,5±1,2	14,0±0,5	26,7±0,3	72,8	34,6	10,2	19,4
	¹ Ácido	40 min	7,0±0,3	49,8±0,3	11,2±0,1	27,0±0,2	68,5	34,1	7,7	18,5
		60 min	9,1±0,1	52,0±0,7	8,4±0,5	27,0±0,4	65,3	33,9	5,5	17,6
		90 min	8,2±0,2	57,0±1,8	6,1±0,2	25,9±0,2	62,0	35,3	3,8	16,1
	² Clorito-ácido	15 min	3,5±0,2	62,8±0,1	6,0±0,1	23,5±0,2	56,4	35,4	3,4	13,3
		30 min	2,9±0,4	71,2±5,0	6,8±0,3	16,1±0,1	50,6	36,0	3,4	8,1
321	Não tratado	-	1,6±0,3	40,4±0,5	31,0±1,0	20,2±0,4	100,0	40,4	31,0	20,2
		20 min	3,4±0,2	46,4±0,3	21,3±0,1	24,1±0,1	84,1	39,0	17,9	20,3
		30 min	5,4±0,0	49,8±0,1	16,7±0,5	24,0±0,2	78,5	39,1	13,1	18,8
	¹ Ácido	40 min	7,8±0,1	55,3±0,6	8,7±0,4	25,2±0,2	68,7	38,0	6,0	17,3
		60 min	7,6±0,0	57,7±0,1	7,9±0,1	25,1±0,2	67,7	39,1	5,3	17,0
		90 min	10,0±0,2	59,0±0,2	5,5±0,1	24,8±0,5	64,4	38,0	3,5	16,0
	² Clorito-ácido	15 min	4,2±0,3	64,7±0,4	5,4±0,1	21,8±0,2	59,6	38,6	3,2	13,0
		30 min	1,6±0,1	71,3±2,6	5,7±0,2	15,7±0,3	52,8	37,6	3,0	8,3

¹ = 150 °C e 13 g ácido sulfúrico/100 g material; ² = amostras já pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído por 90 min.

Tabela 14 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido e subsequentemente com clorito-ácido

Híbrido	Tratamento	Tempo	Conversão de glucana (%)									
			Ausência de albumina					Presença de albumina				
			4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
89	Não tratado	-	17,0±0,4	19,1±0,3	23,0±0,3	23,4±0,1	25,6±0,4	16,1±0,4	18,9±0,6	21,5±0,4	22,0±0,4	24,5±0,6
		20 min	15,4±1,4	17,6±1,3	21,0±2,3	22,4±2,0	25,7±3,3	15,5±0,6	17,6±1,2	21,3±1,0	23,0±1,0	25,9±1,5
		30 min	25,3±1,5	29,6±2,5	37,2±1,8	41,1±1,6	46,7±2,1	24,9±0,9	30,7±0,1	38,3±0,7	42,0±0,9	46,2±0,6
	¹ Ácido	40 min	27,3±0,3	33,1±1,5	41,0±0,4	45,1±1,3	50,4±0,5	27,3±1,2	33,0±0,4	39,0±0,6	44,4±0,7	49,5±1,3
		60 min	28,0±0,3	33,0±0,7	42,4±0,9	48,4±0,3	53,7±0,5	28,0±0,2	35,0±0,6	43,4±0,2	49,9±0,9	56,1±0,3
		90 min	26,9±0,5	34,2±1,0	45,0±0,8	51,0±0,6	55,5±0,9	30,6±0,6	38,0±0,5	50,1±0,9	57,6±2,1	63,1±2,9
	² Clorito-ácido	15 min	32,4±0,8	40,9±2,3	56,4±4,3	67,6±3,4	74,1±1,6	25,0±0,4	32,8±1,3	49,2±2,5	58,4±1,7	65,8±1,2
		30 min	37,8±1,8	54,2±0,8	80,5±2,5	90,7±1,6	98,8±2,4	28,5±0,2	41,2±0,8	65,8±1,5	79,1±0,7	92,6±3,8
140	Não tratado	-	6,9±0,2	7,8±0,2	10,4±0,2	11,8±0,1	13,3±1,0	6,9±0,1	7,8±0,5	10,2±0,7	11,2±0,2	13,9±0,4
		20 min	11,4±0,3	12,9±0,4	15,9±0,8	17,9±0,6	20,8±0,9	11,2±0,2	12,4±0,3	15,1±0,2	17,4±0,3	20,6±0,6
		30 min	17,9±0,1	20,5±0,7	25,5±0,5	30,8±0,6	34,4±0,2	18,4±0,5	21,0±0,5	26,2±0,2	29,3±0,3	34,2±0,2
	¹ Ácido	40 min	20,4±0,3	23,7±0,7	30,3±0,6	35,1±0,4	38,6±0,8	20,4±0,1	24,0±0,7	29,7±1,1	34,0±1,4	39,0±1,1
		60 min	20,8±0,7	26,1±1,1	34,4±0,7	40,6±1,5	46,3±0,9	22,2±0,7	27,0±1,4	35,1±1,1	41,2±0,4	48,0±2,0
		90 min	20,6±0,3	25,5±0,2	33,6±0,9	43,2±0,4	44,3±0,1	21,6±0,9	27,3±0,8	36,3±1,2	46,3±0,6	48,9±1,5
	² Clorito-ácido	15 min	27,6±1,8	32,6±2,2	50,6±2,4	57,6±1,0	63,8±1,2	19,5±0,4	25,8±0,6	40,3±1,1	45,8±1,1	54,2±1,6
		30 min	36,2±0,7	49,9±1,8	73,9±0,9	83,5±0,6	92,3±2,7	25,4±0,5	35,4±2,1	60,9±1,5	73,0±2,1	81,9±0,8
321	Não tratado	-	8,3±0,2	9,4±0,2	11,4±0,3	12,7±0,2	14,2±0,3	8,4±0,2	9,4±0,3	11,6±0,3	12,7±0,4	14,2±0,5
		20 min	13,2±0,3	15,0±0,4	18,9±0,3	21,7±0,1	24,3±0,7	12,6±0,1	14,6±0,4	18,1±0,1	21,6±0,8	22,9±0,3
		30 min	16,7±0,8	19,3±0,5	24,5±0,4	28,2±0,6	31,6±0,7	15,9±0,8	18,7±0,1	23,4±0,1	27,3±0,3	29,6±0,6
	¹ Ácido	40 min	21,6±0,7	25,6±0,5	34,4±0,6	41,2±0,4	45,2±0,7	22,1±0,5	27,0±0,3	36,9±0,9	42,7±1,1	47,1±1,0
		60 min	21,0±1,1	26,2±0,5	33,8±1,7	41,0±1,2	44,5±0,3	21,4±0,5	26,9±0,2	36,0±0,4	42,6±0,7	47,5±0,3
		90 min	22,0±0,4	27,5±0,1	37,9±0,7	44,7±0,5	49,5±0,6	23,1±0,5	29,4±0,2	41,7±0,3	49,8±0,5	54,9±0,3
	² Clorito-ácido	15 min	27,1±0,5	34,2±0,1	55,0±1,6	62,8±1,3	71,1±1,5	17,7±0,8	24,4±0,4	41,7±2,2	50,1±2,4	60,6±0,4
		30 min	34,6±1,1	48,3±0,9	73,8±1,5	83,4±2,0	91,3±0,9	23,5±0,7	30,9±2,4	58,0±1,7	73,0±0,5	84,6±1,3

¹ = 150 °C e 13 g ácido sulfúrico/100 g material; ² = amostras já pré-tratadas com ácido sulfúrico por 90 min; * = Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos na ausência e presença de 1 % de albumina (m/v), utilizando triplicadas para determinar a conversão média de glucana e o seu desvio padrão.

Tabela 15 – Valores ajustados com modelo logarítmico (Model) e das duplicatas experimentais (Exp) do volume inacessível do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e designificado com 4 cargas de clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos

Volume inacessível (mL/g)																				
* Bagaço de cana-de-açúcar	44 Å					55 Å					74 Å					553 Å				
	Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio
	A	B	Média			A	B	Média			A	B	Média			A	B	Média		
	¹ Não tratado	0,22	0,37	0,30	0,34	-13,9	0,52	0,64	0,58	0,39	48,3	0,29	0,31	0,30	0,46	-34,5	0,78	1,04	0,91	0,89
¹ Clorito-ácido	0,89	0,91	0,90	1,00	-9,9	1,02	1,26	1,14	1,05	8,6	1,13	1,17	1,15	1,13	1,8	1,68	1,58	1,63	1,64	-0,7
² Não tratado	0,35	0,38	0,37	0,38	-3,3	0,44	0,50	0,47	0,42	11,8	0,41	0,45	0,43	0,47	-8,9	0,84	0,84	0,84	0,83	0,5
² Clorito-ácido	0,92	0,86	0,89	0,92	-3,8	0,94	1,00	0,97	0,98	-1,2	1,03	1,19	1,11	1,05	5,5	1,62	1,48	1,55	1,56	-0,7

* = amostras cedidas por Santi-Junior et al. (2013); ¹ = dados extraídos de Santi-Junior et al. (2013), gerados com a metodologia convencional (MC) da técnica de exclusão de solutos; ² = dados gerados na presente tese, utilizando a metodologia adaptada (MA) da técnica de exclusão de solutos.

Tabela 16 – Valores experimentais (Exp) e ajustados com modelo logarítmico (Model) do volume acessível do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e deslignificado com 4 cargas de clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos

* Bagaço de cana-de-açúcar	Volume acessível (mL/g)								
	44 Å			55 Å			74 Å		
	Exp	Model	Desvio	Exp	Model	Desvio	Exp	Model	Desvio
¹ Não tratado	0,61	0,55	11,8	0,33	0,50	-34,1	0,61	0,43	42,1
¹ Clorito-ácido	0,73	0,65	13,0	0,49	0,59	-17,2	0,48	0,52	-7,1
² Não tratado	0,47	0,45	4,4	0,37	0,41	-9,8	0,41	0,36	13,9
² Clorito-ácido	0,66	0,64	3,1	0,58	0,58	0	0,44	0,51	-13,7

* = amostras cedidas por Santi-Junior et al. (2013); ¹ = dados extraídos de Santi-Junior et al. (2013), gerados com a metodologia convencional (MC) da técnica de exclusão de solutos; ² = dados gerados na presente tese, utilizando a metodologia adaptada (MA) da técnica de exclusão de solutos.

Tabela 17 – Valores ajustados com modelo logarítmico (Model) e das duplicatas experimentais (Exp) do volume inacessível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos

		Volume inacessível (mL/g)																			
Híbrido	Amostra	44 Å					55 Å					74 Å					553 Å				
		Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio	Exp			Model	Desvio
		A	B	Média			A	B	Média			A	B	Média			A	B	Média		
89	Não tratado	1,04	1,02	1,03	1,09	-5,8	1,12	1,18	1,15	1,15	0,1	1,28	1,34	1,31	1,23	6,3	1,75	1,80	1,78	1,79	-0,9
	¹ Ácido	0,20	0,21	0,20	0,28	-27,4	0,35	0,35	0,35	0,30	17,1	0,38	0,36	0,37	0,33	11,2	0,53	0,53	0,53	0,54	-2,2
	² Clorito-ácido	0,17	0,18	0,17	0,25	-30,8	0,32	0,33	0,33	0,28	16,9	0,35	0,38	0,37	0,32	12,6	0,59	0,63	0,61	0,62	-2,1
140	Não tratado	0,97	0,96	0,97	0,96	0,5	1,04	1,01	1,02	1,03	-0,7	1,14	1,11	1,12	1,12	0,2	1,75	1,74	1,74	1,74	0,0
	¹ Ácido	0,19	0,19	0,19	0,30	-36,0	0,36	0,36	0,36	0,32	14,5	0,42	0,42	0,42	0,34	24,7	0,46	0,46	0,46	0,48	-4,4
	² Clorito-ácido	0,21	0,23	0,22	0,33	-33,0	0,41	0,43	0,42	0,35	18,9	0,45	0,44	0,44	0,38	15,8	0,57	0,58	0,57	0,59	-3,1
321	Não tratado	1,05	1,06	1,06	1,03	2,8	1,07	1,07	1,07	1,07	-0,4	1,09	1,10	1,10	1,13	-2,8	1,51	1,56	1,53	1,53	0,4
	¹ Ácido	0,20	0,20	0,20	0,34	-41,9	0,44	0,44	0,44	0,35	23,9	0,45	0,45	0,45	0,37	21,7	0,48	0,49	0,48	0,51	-4,8
	² Clorito-ácido	0,04	0,04	0,04	0,19	-77,5	0,25	0,27	0,26	0,21	20,9	0,38	0,38	0,38	0,25	51,6	0,47	0,48	0,47	0,50	-6,2

¹ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, por 90 min; ² = amostras já pré-tratadas com ácido sulfúrico por 90 min e subsequentemente deslignificadas com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético;

Tabela 18 – Valores experimentais (Exp) e ajustados com modelo logarítmico (Model) do volume acessível dos híbridos não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e subsequente deslignificados com clorito de sódio/ácido acético às sondas de diferentes tamanhos

Híbrido	Amostra	Volume acessível (mL/g)								
		44 Å			55 Å			74 Å		
		Exp	Model	Desvio	Exp	Model	Desvio	Exp	Model	Desvio
89	Não tratado	0,75	0,70	6,6	0,62	0,64	-2,7	0,46	0,56	-16,8
	¹ Ácido	0,33	0,26	24,6	0,18	0,24	-26,6	0,16	0,21	-23,7
	² Clorito-ácido	0,44	0,38	16,9	0,28	0,34	-17,6	0,24	0,30	-18,0
140	Não tratado	0,78	0,78	-0,6	0,72	0,71	1,0	0,62	0,62	-0,3
	¹ Ácido	0,27	0,18	47,8	0,10	0,17	-40,5	0,04	0,14	-72,6
	² Clorito-ácido	0,35	0,26	34,7	0,15	0,24	-35,6	0,13	0,21	-38,0
321	Não tratado	0,48	0,50	-4,4	0,47	0,46	2,4	0,44	0,40	9,5
	¹ Ácido	0,29	0,17	69,4	0,05	0,15	-70,6	0,03	0,13	-78,3
	² Clorito-ácido	0,43	0,32	35,9	0,21	0,29	-26,3	0,09	0,25	-64,0

¹ = 150 °C, 13 g ácido sulfúrico/100 g material, por 90 min; ² = amostras já pré-tratadas com ácido sulfúrico por 90 min e subsequentemente deslignificadas com duas cargas de clorito de sódio/ácido acético.

Figura 21 – Rendimentos de conversão enzimática da glucana em função da Glucana Disponível dos híbridos de cana-de-açúcar não tratados, pré-tratados com ácido sulfúrico diluído (20–90 min) e sequencialmente deslignificados (15 e 30 min). Os valores de conversão enzimática representam a média de triplicadas e seus desvios padrão (barras), conduzidos na presença (azul) e ausência (preto) de albumina.

Fonte: arquivo pessoal.