UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VICTOR TABOSA DE OLIVEIRA SANTOS

**Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar
pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**

Lorena – SP
2010

VICTOR TABOSA DE OLIVEIRA SANTOS

**Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar
pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**

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

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Lorena – SP

2010

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

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

Santos, Victor Tabosa de Oliveira

Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático / Victor Tabosa de Oliveira Santos ; orientador Walter de Carvalho. – Lorena: 2010.

101 p. : il.

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

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Celulases 3. Hidrólise enzimática 4. Planejamento experimental. I. Título

664.113 - CDU

*Dedico este trabalho à toda
minha família. Em especial, ao meu sobrinho - Leonardo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Walter de Carvalho, pela extrema dedicação, confiança, apoio, ensinamento, oportunidade e paciência durante todo o período de trabalho.

À FAPESP e a CAPES, pelo auxílio financeiro concedido.

Aos amigos de laboratório, Paula, Cecéu, Robson, Michel, Germano, Thiago, Joseana, Renato, Débora, Jéssica, Sérgio, Dani Gurpilhares, Dani Cortez, Fernanda, Djalma e a Prof^a Adriane Milagres, por todos os momentos de convivência e respeito.

À Larissa e Patrícia pela enorme contribuição nos resultados experimentais.

Ao Kristen(Celso), pela paciência e empenho na obtenção das micrografias das amostras de bagaço de cana.

Ao Prof. Durval Rodrigues Jr., que gentilmente nos disponibilizou o Microscópio Eletrônico de Varredura e também ao Jorge Rosa (DEMAR) pela metalização das amostras de bagaço.

Aos amigos do Departamento de Biotecnologia, pelos vários momentos de descontração.

Aos meus pais, Wagner e Ema, pela imensurável contribuição no cumprimento de mais uma 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, Victório e Tabosa, *in memoriam*, pelo carinho. SAUDADES.

Aos meus amigos de infância, pelas amizades eternamente sinceras.

RESUMO

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 (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2010.

O presente trabalho teve como principal objetivo correlacionar a composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído com a eficiência da sacarificação enzimática da celulose presente no material. Primeiramente, o bagaço *in natura* foi extraído com água, etanol ou água seguida de etanol, e as composições químicas determinadas. Posteriormente, o bagaço *in natura* foi pré-tratado com H_2SO_4 diluído em êmbolos de 200 mL, utilizando 15% de teor de sólidos (m/v). A temperatura (112,5-157,5 °C), o tempo de residência (5-35 min) e a concentração ácida (0-3,0% m/v) variaram de acordo com um planejamento fatorial 2^3 completo. Após o pré-tratamento, as amostras foram caracterizadas quimicamente. Em seguida, dois extratos enzimáticos comerciais foram caracterizados quanto às atividades de enzimas hidrolíticas e fenoloxidasas, e aos teores de proteínas. As condições adequadas de sacarificação enzimática da celulose para a amostra de bagaço pré-tratada com H_2SO_4 diluído (15% sólidos, 2% ácido, a 150°C por 30 min) foram determinadas através de planejamentos fatoriais 2^3 completos, variando teor de sólidos (1,19-4,81% m/v), carga enzimática (1,91-38,09 FPU/g de bagaço) e carga de surfactante (0-0,1 g/g de bagaço), para os dois extratos enzimáticos. As amostras de bagaço pré-tratadas sob diferentes condições de temperatura, tempo de residência e concentração de H_2SO_4 (primeiro planejamento fatorial) foram submetidas à sacarificação enzimática com um dos extratos. Por fim, amostras selecionadas foram caracterizadas quanto às alterações morfológicas provocadas pelo pré-tratamento e pela hidrólise enzimática, por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que água seguida de etanol extraiu maior quantidade de extrativos do bagaço. Os extrativos apresentaram absorção de luz apenas na região do ultravioleta. A porcentagem de lignina nos bagaços extraídos com água, etanol e água seguida de etanol foi menor que aquela encontrada no bagaço *in natura*. De acordo com a condição de pré-tratamento, os teores de celulose, hemicelulose e lignina nos bagaços pré-tratados diferiram substancialmente. A maior variação foi observada para hemicelulose (3,67-27,27%). Os três fatores avaliados no pré-tratamento influenciaram na composição química do bagaço pré-tratado. Por sua vez, os dois extratos enzimáticos apresentaram um complexo celulolítico completo e considerável atividade de xilanases, porém não foi observada atividade de fenoloxidasas. O extrato II apresentou maior quantidade de proteínas (152,45±10,0 mg/mL), comparado ao extrato I (105,2±6,6 mg/mL). Para 24 horas de hidrólise enzimática com o extrato I, as três variáveis independentes influenciaram na digestão do bagaço pré-tratado. Somente os efeitos das cargas de enzima e surfactante foram significantes, utilizando o extrato II. Posteriormente, foi possível aumentar o teor inicial de sólidos sem comprometer o rendimento de sacarificação com o extrato II. Não foi possível correlacionar a conversão de celulose com o fator de severidade do pré-tratamento. Por outro lado, foi observada correlação negativa entre o conteúdo de hemicelulose e a conversão enzimática de celulose, enfatizando a influência da composição química do bagaço de cana na hidrólise enzimática da celulose. Observaram-se diferenças morfológicas entre o bagaço *in natura* e amostras pré-tratadas sob condições branda e severa, bem como após suas respectivas hidrólises enzimáticas.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, celulasas, hidrólise enzimática, planejamento experimental.

ABSTRACT

SANTOS, V. T. O. **Composition and enzymatic digestibility of sugarcane bagasse pretreated with dilute sulfuric acid in static reactor**. 2010. 101 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2010.

This study aimed to correlate the chemical composition of a sugarcane bagasse pretreated with dilute H_2SO_4 with the efficiency of cellulose enzymatic saccharification of this material. First, the sugarcane bagasse was extracted with water, ethanol or water followed by ethanol, and its chemical composition was determined. Subsequently, the sugarcane bagasse was pretreated with dilute H_2SO_4 in 200 mL stainless steel containers, using 15% of solids loading (w/v). The temperature (112.5-157.5°C), time of residence (5-35 min) and acid concentration (0-3.0% w/v) varied according to a 2^3 full factorial design. After the pretreatments, the chemical compositions of the pretreated bagasses were determined. Then, two commercial enzymatic extracts were characterized regarding the activities of hydrolytic enzymes and phenoloxidases, and protein contents. The enzymatic saccharification conditions for the bagasse sample pretreated with dilute H_2SO_4 (15% solids, 2% acid, 150°C for 30 min) were determined through 2^3 full factorial designs, varying the solids loading (1.19-4.81% w/v), enzyme loading (1.91-38.09 FPU/g of bagasse) and surfactant loading (0-0.1 g/g of bagasse) for the two enzymatic extracts. The bagasse samples pretreated under the different conditions of temperature, time of residence and H_2SO_4 concentration (first factorial design) were subjected to enzymatic saccharification using one of the extracts. Finally, selected samples were analyzed for morphological changes caused by pretreatment and enzymatic hydrolysis, by scanning electron microscopy. The results showed that water followed by ethanol extracted the highest amount of extractives. The extractives showed light absorption only in the ultraviolet region. The percentage of lignin in the bagasse samples extracted with water, ethanol and water followed by ethanol was lower than that found in the raw material. According to the pretreatment conditions, the amount of cellulose, hemicellulose and lignin in the pretreated bagasse differed substantially. The greatest variation was observed for the hemicellulose content (3.67-27.27%). All the three factors evaluated in the pretreatment affected the chemical composition of the pretreated bagasse. In turn, the two enzymatic extracts showed complete cellulolytic complexes and considerable activities of xylanases, without activities of phenoloxidases. The extract II showed higher protein content (152.45 ± 10.0 mg/mL) when compared with the extract I (105.2 ± 6.6 mg/mL). For 24 hours of enzymatic hydrolysis using the extract I, all the three independent variables influenced the saccharification of pretreated bagasse. Only the enzyme and surfactant loadings were significant, when using the extract II. Later, it was possible to increase the initial solids content without hindering the saccharification yield, using the extract II. It was not possible to correlate the cellulose conversion with the pretreatment severity. On other hand, it was possible to observe a negative correlation between the hemicellulose content and the efficiency of enzymatic conversion, emphasizing the influence of the sugarcane bagasse chemical composition in the enzymatic hydrolysis of cellulose. Morphological differences were observed between the raw material and sugarcane bagasse samples pretreated under high or low severity, as well as after their corresponding enzymatic hydrolysis.

Keywords: Sugarcane bagasse. Cellulases. Enzymatic hydrolysis. Statistical design.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.	Cana-de-açúcar	13
2.1.1.	Celulose	14
2.1.2.	Hemicelulose	16
2.1.3.	Lignina	18
2.1.4.	Componentes não estruturais	19
2.2.	Obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos	20
2.2.1.	Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	21
2.3.	Celulases	22
2.3.1.	Endoglucanases	24
2.3.2.	Exoglucanases	25
2.3.3.	β -glicosidases	26
2.4.	Hemicelulases	26
3.	OBJETIVO	28
3.1.	Metas	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1.	Bagaço de cana-de-açúcar	29
4.1.1.	Extração do bagaço de cana-de-açúcar	29
4.1.2.	Análise dos extrativos	29
4.1.3.	Caracterização química do bagaço	30
4.2.	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído	31
4.2.1.	Condições de pré-tratamento do bagaço com H_2SO_4 diluído	31
4.2.2.	Cálculo do fator de severidade combinada	33
4.2.3.	Caracterização das amostras de bagaço pré-tratado	33
4.2.4.	Análise estatística dos resultados experimentais	33
4.3.	Extratos enzimáticos	34
4.3.1.	Caracterização dos extratos enzimáticos	34
4.3.1.1.	Determinação da atividade de Celulases Totais	35
4.3.1.2.	Determinação da atividade de Endoglucanase	36
4.3.1.3.	Determinação da atividade de Exoglucanase	36
4.3.1.4.	Determinação da atividade de Celobiase	37
4.3.1.5.	Determinação da atividade de β -glicosidase	38
4.3.1.6.	Determinação da atividade de Xilanase	38
4.3.1.7.	Determinação da atividade de Manganês Peroxidase	39
4.3.1.8.	Determinação da atividade de Lacase	39
4.3.1.9.	Determinação da atividade de Lignina Peroxidase	40
4.3.1.10.	Determinação da concentração de proteínas	40
4.4.	Definição das condições de hidrólise enzimática	41
4.4.1.	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído	41
4.4.2.	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído	41
4.4.2.1.	Condições experimentais	42
4.4.2.2.	Cálculo da digestibilidade enzimática da celulose	43
4.4.2.3.	Análise estatística dos resultados experimentais	43

4.4.2.4.	Uso de maiores teores de sólidos na hidrólise enzimática	44
4.5.	Hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com H ₂ SO ₄ diluído.....	44
4.5.1.	Análise estatística dos resultados experimentais	45
4.6.	Caracterização morfológica de amostras selecionadas, por microscopia eletrônica de varredura.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	46
5.2.	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H ₂ SO ₄ diluído.....	50
5.2.1.	Elaboração do modelo empírico para predição do teor de celulose.....	53
5.2.2.	Elaboração do modelo empírico para predição do teor de hemicelulose.....	55
5.2.3.	Elaboração do modelo empírico para predição do teor de lignina.....	58
5.2.4.	Validação dos modelos propostos.....	61
5.2.5.	Superposição das curvas de nível descritas pelos modelos propostos.....	62
5.3.	Definição das condições de hidrólise enzimática	63
5.3.1.	Caracterização dos extratos enzimáticos.....	63
5.3.2.	Uso dos extratos enzimáticos para a hidrólise de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada com H ₂ SO ₄ diluído.....	66
5.3.2.1.	Validação dos modelos propostos.....	72
5.3.2.2.	Uso de maiores teores de sólidos	74
5.4.	Efeito das condições de pré-tratamento na sacarificação enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H ₂ SO ₄ diluído.....	76
5.4.1.	Elaboração do modelo empírico para predição da eficiência de sacarificação enzimática de celulose em glicose	78
5.4.2.	Validação do modelo proposto	80
5.4.3.	Influência do fator de severidade combinada na eficiência de conversão enzimática de celulose em glicose	81
5.4.4.	Influência do teor de hemicelulose na eficiência de conversão enzimática da celulose em glicose.....	82
5.5.	Caracterização morfológica de amostras selecionadas, por microscopia eletrônica de varredura.....	83
6.	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma fonte de energia não renovável, de origem fóssil, utilizada principalmente na forma de combustível. Entretanto, muitos dos produtos utilizados no nosso cotidiano são sintetizados a partir do petróleo, como os plásticos, por exemplo. Devido a demanda excessiva por petróleo e pelas atuais preocupações ambientais, o uso de fontes energéticas renováveis tem sido o foco de discussões e grandes investimentos, no que diz respeito à pesquisa e desenvolvimento.

Atualmente, o etanol combustível é apontado como uma fonte de energia renovável muito promissora. Basicamente, a sua produção é realizada pelo processo de fermentação alcoólica de açúcares hexoses, por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No Brasil, a matéria-prima utilizada na produção desse combustível é o caldo da cana-de-açúcar (rico em sacarose), obtido no processo de moagem da cana-de-açúcar.

No processo de moagem da cana-de-açúcar são geradas milhões de toneladas/ano de bagaço de cana-de-açúcar. Embora parte do bagaço seja queimada pelas próprias usinas sucro-alcooleiras, para a geração de energia, ainda há um excedente considerável deste material. Assim, a utilização do bagaço da cana, bem como outros materiais de natureza lignocelulósica, tem sido apontada como uma alternativa interessante para aumentar significativamente a produção de etanol.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por frações polissacarídicas, celulose e hemicelulose, representando aproximadamente 75 % de sua massa seca, além de uma macromolécula de origem fenólica denominada lignina. Do ponto de vista tecnológico, os açúcares derivados da celulose (glicose) e da hemicelulose (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) poderiam ser utilizados como substratos para a produção de etanol, permitindo às usinas aumentar sua capacidade de produção sem, entretanto, demandar uma maior área de cultivo de cana-de-açúcar.

Seguindo a linha de raciocínio supramencionada, o presente trabalho inseriu-se em um projeto de pesquisa intitulado: “Aproveitamento integral do bagaço de cana-de-açúcar: composição e digestibilidade enzimática da celulignina obtida após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído”, desenvolvido no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Em uma primeira etapa, estudou-se a composição química de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. A amostra de bagaço foi submetida à pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, onde se otimizou a remoção da

fração hemicelulósica em função da concentração de ácido, da temperatura e do tempo de hidrólise. Uma amostra de bagaço pré-tratada sob condição padrão foi utilizada para determinar as condições de hidrólise enzimática utilizadas posteriormente. Estabelecida a condição de hidrólise enzimática, a digestibilidade enzimática das amostras de bagaço pré-tratadas sob diferentes condições experimentais foi avaliada para se estabelecer uma correlação entre a composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e a sua digestibilidade enzimática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea pertencente a classe Liliopsida, ordem Poales e família Poaceae (WEBER; NELSON, 1985). Atualmente, cerca de 140 variedades de cana-de-açúcar estão sendo utilizadas para plantio comercial no Brasil, as quais foram desenvolvidas por técnicas de hibridação, seleção e de engenharia genética. As modificações genéticas são realizadas, visando diminuir a susceptibilidade dessas linhagens a determinadas doenças, possibilitar o manejo da cana sem a queima prévia, adaptação às condições edafoclimáticas, entre outras. Com essa abordagem, tem sido possível aumentar o rendimento e a capacidade de produção por área plantada de cana-de-açúcar, diminuindo o custo final da produção de etanol e açúcar no Brasil (CTC, 2010).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido por Índia e Austrália. Em média, 55% da cana-de-açúcar produzida no Brasil é destinada à produção de álcool e 45% para a produção de açúcar (CONAB, 2010). No Brasil, planta-se cana do Centro-Sul ao Norte-Nordeste, o que permite dois períodos de safra e produção de álcool e açúcar durante o ano todo (UNICA, 2006). Com isso, estima-se uma produção de 651,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2010/2011 (CONAB, 2010). Tendo em vista que cada tonelada de cana processada gera em torno de 140 Kg de massa seca de bagaço (CENBIO, 2003), pode-se, por exemplo, estimar que mais de 91,2 milhões de toneladas de bagaço de cana serão geradas na safra de 2010/2011.

De natureza lignocelulósica, o bagaço da cana-de-açúcar é constituído por três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) que, juntas, perfazem mais de 90% da massa total desse material fibroso. Em geral, o teor de cinzas presente no bagaço é pequeno, mas pode representar acima de 5% da massa total (CUNHA, 1999; PANDEY et al., 2000). Além disso, o bagaço também apresenta, em menores proporções, compostos não constituintes da parede celular, os quais podem ser extraídos com diferentes solventes (BROWNING, 1967).

2.1.1. Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante encontrado no planeta terra e sua biossíntese anual é estimada entre 10^{10} e 10^{11} toneladas (SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). Como o principal constituinte da biomassa vegetal, a celulose é encontrada quase que exclusivamente na parede celular de vegetais. Entretanto, a celulose também pode ser sintetizada por alguns animais (tunicados, por exemplo) e algumas bactérias (LYND et al., 2002).

De estrutura homopolissacarídica e não-ramificada, a molécula de celulose é constituída exclusivamente por monômeros de D-glicose (Figura 1). As moléculas de D-glicose são unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4). As ligações glicosídicas são resultantes da condensação entre as hidroxilas do carbono 1 (C1) e do carbono 4 (C4) das moléculas de D-glicose adjacentes, onde dessa reação há como produto uma molécula de água (ZHANG; LYND, 2004).

Figura 1 – Estrutura linear da molécula de celulose, formada por monômeros de D-glicose (RAMOS, 2003).

A extensão ou tamanho da cadeia de celulose é expresso em relação ao seu grau de polimerização (GP), isto é, o número de unidades de D-glicose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), que formam uma determinada cadeia celulósica. Na natureza, o grau de polimerização das cadeias celulósicas pode variar de menos de 100 até mais de 15.000 unidades de resíduos de glicose. As cadeias de celulose podem ter seu grau de polimerização diminuído significativamente por tratamento com solução 20% de ácido sulfúrico, devido à hidrólise das ligações glicosídicas. O grau de polimerização da cadeia de celulose está diretamente relacionado à solubilidade desse polímero, uma vez que cadeias com 7 – 13 resíduos de anidroglicose ainda são pouco solúveis em água (FENGEL; WEGENER, 1989; ZHANG; LYND, 2004).

As ligações glicosídicas conferem linearidade estrutural à cadeia celulósica, possibilitando a formação de pontes de hidrogênio e forças de van der Waals intra e intermoleculares. As pontes de hidrogênio formadas intra e intermoleculares resultam na associação entre diversas cadeias celulósicas (Figura 2). A celulose sintetizada por plantas é denominada como fibrila elementar, resultante da associação de 36 diferentes cadeias de celulose, aproximadamente. Entretanto, a celulose sintetizada por algas são denominadas como macrofibrilas, pois essas possuem um maior número de cadeias de celulose agregadas, podendo chegar a mais de 1.200. As fibrilas de celulose conferem elevada resistência à tensão e tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes, e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (DING; HIMMEL, 2006; MATTHEWS et al., 2006).

Figura 2 – Fibrila elementar de celulose sintetizada por plantas, como resultado da interação entre diferentes cadeias lineares (RAMOS, 2003).

A celulose é constituída por regiões ordenadas, devido numerosas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, e regiões não ordenadas, onde esses domínios são chamados cristalinos e amorfos, respectivamente. O grau ou índice de cristalinidade é determinado de acordo com a proporção da região cristalina presente nas fibrilas de celulose. Para determinação da cristalinidade das fibrilas de celulose, a difração de raios-X é o método mais recomendado e freqüentemente utilizado (LYND et al., 2002). Entretanto, para a utilização dessa metodologia, necessita-se de alguns cuidados ao determinar a cristalinidade da celulose contida em materiais lignocelulósicos, pois a lignina e a hemicelulose presentes no material podem interferir significativamente nos resultados (ZHANG; LYND, 2004).

Por sua vez, o índice de cristalinidade na molécula de celulose varia de acordo com a sua origem, estágio de maturação e, no caso de celulose sintetizada por vegetais, o tecido

vegetal estudado. A celulose sintetizada por *Acetobacter xylinum*, *Oocystis apiculata*, *Valonia ventricosa*, *Boergesenia forbesii* e *Glaucozystis nostochinearum* são exemplos clássicos de celulose com alto índice de cristalinidade, enquanto que a celulose intumescida com ácido fosfórico e a celulose processada em moinho de bolas são consideradas altamente amorfas (DELMER, 1987; ZHANG; LYND, 2004).

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo, composto por açúcares pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e grupos acetilas. Altamente ramificada e amorfa, a fração hemicelulósica é geralmente mais reativa do que a molécula de celulose. Em média, apresenta grau de polimerização entre 100 e 200, dependendo da espécie do vegetal, podendo ou não ser acetilada. A fração hemicelulósica pode representar cerca de 30% da massa seca total dos vegetais (CARVALHO et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1989; JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992; LYND, 1996).

Os constituintes estruturais da hemicelulose e suas respectivas proporções diferem entre coníferas e folhosas. Por exemplo, a hemicelulose de coníferas é constituída principalmente de glucomananas e galactoglucomananas, parcialmente acetiladas, onde a xilana corresponde somente uma pequena fração desse material. Por outro lado, heteroxilanas altamente acetiladas, geralmente classificadas como 4-O-metil-glucuronoxilanas, são os principais constituintes da hemicelulose de madeiras de folhosas. E as gramíneas, por sua vez, apresentam as glucoronoarabinoxilanas como principais constituintes hemicelulósicos (CARPITA, 1996; RAMOS, 2003).

Independentemente da região do vegetal em que a hemicelulose esteja localizada, existem as interações com componentes estruturais, principalmente com as fibrilas elementares de celulose, outros polissacarídeos não-celulósicos e, na maioria dos casos, com a molécula de lignina (Figura 3). As ligações não-covalentes entre as cadeias de xilana e outros polissacarídeos envolvem essencialmente pontes de hidrogênio. Porém, ligações covalentes também são responsáveis por conectarem xilanas com lignina e alguns ácidos fenólicos (JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992).

Figura 3 – Interação entre os constituintes estruturais da parede celular de vegetal (adaptado de BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992).

2.1.3. Lignina

A lignina corresponde à fração não polissacarídica mais abundante presente nos materiais lignocelulósicos. Com grande complexidade molecular (Figura 4), a lignina é sintetizada por via radicalar, a partir de três alcoóis *p*-hidróxi-cinâmílicos precursores (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Por sua vez, esses alcoóis são unidos entre si por ligações alquil-aril, alquil-alquil e aril-aril. De acordo com o grau de metoxilação do anel aromático, a unidade básica é o *p*-hidróxi-fenil (não metoxilada, derivada do álcool *p*-cumarílico), guaiacil (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) ou siringil (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico) (CARVALHO et al., 2009; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

A proporção encontrada entre as unidades constituintes da lignina varia de acordo com a espécie estudada, onde essa diversidade tem sido utilizada até para fins taxonômicos. As ligninas oriundas de madeiras de coníferas são compostas por, quase que exclusivamente, unidades guaiacil, sendo denominadas de ligninas tipo G. Já as ligninas de folhosas são mais ricas em unidades siringil, sendo denominadas de ligninas tipo GS. Diferentemente das demais, as ligninas de gramíneas possuem os três tipos de precursores - ligninas do tipo HGS (CARVALHO et al., 2009; RAMOS, 2003).

Em geral, o teor lignina em madeiras de coníferas é superior (25-35%) àqueles encontrados em madeiras de folhosas (18-25%), enquanto as paredes celulares de gramíneas apresentam os menores teores de lignina. A lignina possui grande importância para os vegetais, uma vez que envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção quanto à degradação química e/ou biológica. Além disso, pode formar ligações covalentes com a fração hemicelulósica, evitando o colapso dos vasos condutores dos vegetais (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; RAMOS, 2003).

Figura 4 – Macromolécula de lignina do tipo guaiacil (ADLER, 1977).

2.1.4. Componentes não estruturais

Os componentes não estruturais da parede celular vegetal correspondem a uma variedade de compostos, das mais diversas características químicas. Entretanto, geralmente, esses compostos são prontamente solúveis em diversos solventes orgânicos neutros ou em água (BROWNING, 1967; FENGEL; WEGENER, 1989).

A proporção e a natureza desses componentes não estruturais da madeira variam amplamente entre as espécies vegetais. Além disso, a quantidade desses compostos extraíveis varia também de acordo com a região do vegetal, como raízes, caules e folhas. De acordo com os diferentes estágios de maturação do vegetal, principalmente os compostos insaturados e os ácidos graxos, os compostos sofrem alterações. Alguns desses compostos extraíveis das madeiras podem ser tóxicos, agindo como agentes antimicrobianos, conferindo proteção aos vegetais (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2. Obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos

A obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos, atualmente é um assunto de muito interesse. O uso de açúcares obtidos de lignocelulósicos tem sido apontado como uma alternativa para o aumento significativo da produção de etanol combustível, uma fonte de energia renovável (CARROLL; SOMERVILLE, 2009).

Com isso, inúmeros trabalhos reportados na literatura têm como principal objetivo obter glicose a partir de resíduos agro-industriais, para a posterior fermentação e produção de etanol. O bagaço de cana-de-açúcar (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), a forragem de milho (HAN; CHEN, 2010), as palhas de trigo (KOOTSTRA et al., 2009) e de arroz (ABEDINIFAR et al., 2009), além de algumas madeiras (YU et al., 2009), são alguns exemplos de materiais lignocelulósicos freqüentemente utilizados em estudos de sacarificação enzimática da celulose.

Contudo, alguns fatores são responsáveis por diminuir a eficiência da hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo: a baixa acessibilidade das enzimas às fibras de celulose (juntas, a hemicelulose e a lignina formam uma barreira física), a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (ZHANG; LYND, 2004). Assim, estratégias para aumentar o rendimento da conversão enzimática de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve o pré-tratamento do material lignocelulósico, o que torna essencial para o aumento da eficiência da hidrólise enzimática da celulose (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

2.2.1. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Devido à estrutura complexa da biomassa lignocelulósica, um pré-tratamento torna-se pré-requisito para que a hidrólise enzimática dos polissacarídeos a açúcares fermentescíveis seja realizada de maneira eficaz. Um pré-tratamento realizado com sucesso deve 1) maximizar os rendimentos de convertibilidade enzimática; 2) minimizar a perda de açúcares; 3) maximizar a produção de co-produtos com valor agregado; 4) não exigir a adição de substâncias químicas que possam prejudicar as enzimas hidrolíticas ou agentes fermentativos; 5) minimizar o uso de energia, substâncias químicas e equipamentos; e 6) permitir a ampliação para escala industrial. Na realidade, é muito difícil alcançar todos os itens descritos acima em um único processo. Entretanto, os dois últimos itens são especialmente importantes para a viabilidade econômica e prática de um dado processo industrial (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Tecnologias variadas de pré-tratamento empregam estratégias diversas para aumentar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico. Em comum, estas tecnologias buscam alterar ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, aumentando a área superficial, permitindo maior acessibilidade das enzimas celulolíticas ao seu substrato (MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005). Atualmente, diversos métodos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos estão utilizados, como por exemplo: pré-tratamento com fungos basidiomicetos (YU et al., 2009), pré-tratamento com irradiação de micro-ondas (NAKAYAMA; OKAMURA, 1989), pré-tratamento com ácidos diluídos (CARA et al., 2008), explosão à vapor (auto-hidrólise) (KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998), explosão à vapor catalisada por ácidos (TUCKER et al., 2003), solubilização com água quente (PÉREZ et al., 2007), pré-tratamentos com álcalis (CARRILLO et al., 2005), incluindo *Ammonia fiber explosion*, processo conhecido também como AFEX (ALIZADEH et al., 2005), pré-tratamentos oxidativos (LEE; CHUNG; DAY, 2009), entre outros. Importante também salientar que cada pré-tratamento exerce o seu próprio efeito sobre as frações de celulose, hemicelulose e lignina do material lignocelulósico (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Na literatura, é facilmente encontrada uma diversidade de ácidos utilizados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Entre eles, citam-se o ácido fosfórico, o ácido sulfúrico, o ácido nítrico, o ácido clorídrico e o ácido fluorídrico (RAMOS, 2003). Contudo, os ácidos, as suas respectivas concentrações e as condições empregadas durante o

pré-tratamento (teor de sólidos, tempo de residência e temperatura, entre outros) variam amplamente de material para material (ABEDINIFAR et al., 2009; SINGH et al., 2009).

No entanto, a hidrólise com ácido sulfúrico diluído é certamente a forma de pré-tratamento mais utilizada (GAMÉZ et al., 2006), sendo que os principais efeitos causados nos materiais lignocelulósicos são a quebra das ligações entre lignina, hemicelulose e celulose, a dissolução da hemicelulose, a alteração estrutural da lignina e a diminuição no tamanho das partículas do material. A hemicelulose solubilizada durante o pré-tratamento pode continuar a sofrer reações hidrolíticas, produzindo alguns monômeros e também furfural e hidroximetilfurfural, os quais correspondem à produtos de degradação das pentoses e hexoses, respectivamente. A lignina solubilizada durante este tipo de pré-tratamento é rapidamente condensada durante o abaixamento da temperatura e precipita em ambientes ácidos. Os efeitos exercidos por este pré-tratamento, como a solubilização da hemicelulose e a redistribuição da lignina solubilizada, podem melhorar significativamente os rendimentos da hidrólise enzimática da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; LYND, 1996; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

A utilização de ácidos diluídos tem mostrado algumas vantagens em relação ao pré-tratamento por explosão à vapor, um método bastante utilizado para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (HAN et al., 2010; KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998). A principal vantagem de se utilizar o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído está na solubilização e recuperação dos açúcares hemicelulósicos, cerca de 80%, enquanto que o pré-tratamento por explosão à vapor pode recuperar em média 65% dos açúcares hemicelulósicos contidos no material (LYND, 1996).

2.3. Celulases

As celulases são enzimas sintetizadas por diferentes grupos de seres vivos, sendo que os fungos seus principais produtores, seguidos pelas bactérias aeróbias e anaeróbias (LYND et al., 2002). Entretanto, também existem relatos que confirmam a capacidade de alguns animais, como artrópodes, nemátodos e moluscos, de sintetizarem suas próprias enzimas celulolíticas (WATANABE; TOKUDA, 2001).

As celulases são proteínas, podendo ou não apresentar unidades glicosídicas em suas estruturas (GOTO, 2007). Essas enzimas são representadas basicamente por três

diferentes classes: as endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- β -D-glicosidases (EC 3.2.1.21). Juntas, essas enzimas formam o que é conhecido como complexo celulolítico, o qual é responsável pela hidrólise da molécula de celulose (LYND et al., 2002).

Sabe-se que essas três classes de celulases atuam em sinergismo para hidrolisar a cadeia de celulose de forma eficaz. Tal sinergismo acontece da seguinte maneira: as endoglucanases atuam de maneira aleatória na cadeia celulósica, diminuindo o grau de polimerização da cadeia de celulose, produzindo os celuoligossacarídeos e, conseqüentemente, aumentando o número de sítios de ataque para as exoglucanases. As exoglucanases hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando principalmente moléculas de celobiose. As β -glicosidases, por sua vez, promovem a hidrólise da celobiose à glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligossacarídeos, aliviando problemas de inibição para as outras enzimas (Figura 5) (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002; LYND et al., 2002; VÄLJAMÄE et al., 2003).

Figura 5 – Mecanismo de hidrólise da celulose por celulases de *Trichoderma* sp. (adaptado de ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

2.3.1. Endoglucanases

As endo-1,4- β -D-glucanases hidrolisam randomicamente ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) intramoleculares da cadeia celulósica, principalmente em regiões com baixo grau de organização (celulose amorfa) e também são responsáveis por diminuir consideravelmente o grau de polimerização das cadeias de celulose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Além disso, as endoglucanases são capazes de atuarem sobre celulosas modificadas estruturalmente, como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC), as quais são os substratos recomendados para a determinação da atividade enzimática de endoglucanases (GHOSE, 1987).

Estruturalmente, as endoglucanases são compostas por um domínio catalítico (DC) e um domínio de ligação ao carboidrato (DLC). O DC é responsável por romper as ligações glicosídicas da cadeia celulósica e, por outro lado, o DLC tem como sua principal função a adsorção (enzima-substrato) e reconhecimento da cadeia celulósica. A adsorção da enzima ao substrato acontece devido a interações dos aminoácidos aromáticos presentes no DLC da enzima com a cadeia celulósica. Nas endoglucanases, o DLC é encontrado em arranjos estruturais semelhantes a fendas ou sulcos, conforme pode ser observado na Figura 6 (BORASTON et al., 2004).

Figura 6 – Representação de uma Endoglucanase. A região destacada em roxo representa os aminoácidos aromáticos presentes no domínio de ligação ao carboidrato (adaptado de BORASTON et al., 2004).

2.3.2. Exoglucanases

As exo-1,4- β -D-glucanases, também conhecidas como celobiohidrolases (CBHs), são responsáveis por atuarem principalmente em regiões cristalinas da molécula de celulose. A celobiose é o principal produto de hidrólise da cadeia de celulose por essas enzimas, porém podem gerar alguns oligossacarídeos ou até mesmo moléculas de glicose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

São conhecidos dois tipos de celobiohidrolases: as CBHs I e CBHs II, as quais se diferenciam pelo local em que se adsorvem na molécula de celulose. As CBHs I e II iniciam a hidrólise da molécula de celulose a partir dos terminais redutores e não-redutores, respectivamente (ZHANG; LYND, 2004; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Porém, a proporção em que essas isoenzimas são sintetizadas pode variar substancialmente de acordo com a linhagem. Por exemplo, no complexo celulolítico produzido por *Trichoderma reesei*, as CBHs I representaram 60% das celulasas totais encontradas (PALONEN et al., 2004).

Assim como as endoglucanases, as exoglucanases também são compostas por um domínio de ligação ao carboidrato (DLC) e um domínio catalítico (DC). O domínio catalítico das exoglucanases, assim como nas endoglucanases, também é responsável pela quebra das ligações glicosídicas da cadeia de celulose (PALONEN et al., 2004). No entanto, atribui-se ao DLC das exoglucanases, um aumento da concentração dessas enzimas na superfície dos substratos (LINDER; TEERI, 1997). Diferentemente ao observado nas endoglucanases, o DC e o DLC das exoglucanases são conectados por uma cadeia polipeptídica e, mesmo quando separados, essas enzimas ainda apresentam capacidade catalítica, porém, essa capacidade catalítica é significativamente reduzida (SUURNÄKKI et al., 2000).

A capacidade em hidrolisar a celulose de materiais lignocelulósicos também pode ser comprometida simplesmente pelo nível de glicosilação dessas enzimas. O aumento no nível de glicosilação das exoglucanases acarretam no aumento significativo de adsorção improdutiva à molécula de lignina (JEOH et al., 2008), com um conseqüente decréscimo nos rendimentos da sacarificação dos materiais lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005).

2.3.3. β -glicosidases

As β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, são responsáveis pela produção de moléculas de glicose a partir da hidrólise de celobiose e de celoligossacarídeos solúveis, gerados pelas enzimas supramencionadas (endo e exoglucanases). As β -glicosidases diferem das endo e exoglucanases por atuarem única e exclusivamente sobre fragmentos solúveis de celulose. Entretanto, as β -glicosidases exercem um importante papel na sacarificação da celulose, uma vez que o acúmulo de celobiose pode inibir fortemente a ação enzimática das endo e exoglucanases (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Devido ao efeito inibitório que a molécula de celobiose exerce sobre as endo e exoglucanases, alguns extratos enzimáticos comerciais utilizados na sacarificação de materiais lignocelulósicos já estão sendo prioritariamente suplementados com β -glicosidases. Com isso, aumentos significativos nos rendimentos de sacarificação da celulose foram alcançados, após a suplementação de extratos comerciais com β -glicosidases, justamente por essas enzimas eliminarem a celobiose que se acumulavam no meio reacional (BERLIN et al., 2006).

2.4. Hemicelulases

A hidrólise enzimática da fração hemicelulósica requer um conjunto específico de enzimas, mais complexo do que aquele necessário para total hidrólise da celulose. O sistema hemicelulolítico é composto basicamente pelas endo- β -1,4-xilanases, β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana-esterases, α -D-galactosidases e feruloil-esterases (BEG et al., 2001; CARVALHO et al., 2009).

As xilanases são as principais enzimas envolvidas na hidrólise da fração hemicelulósica. Devido essa importância, as xilanases são rotineiramente aplicadas em diversos setores industriais, tais como na melhoria da qualidade da ração animal, no biobranqueamento e biopolpação, durante a produção de papel e celulose, no processamento da farinha utilizada na indústria de panificação, na clarificação de sucos e vinhos em indústrias alimentícias, entre outras aplicações (BHAT, 2000; SHALLOM;

SHOHAM, 2003). Segundo Shallom e Shoham, (2003), a efetiva aplicação de xilanases à um processo de produção de etanol que, a partir de materiais lignocelulósicos, seja economicamente viável é um grande desafio. Nesse contexto, é importante mencionar que atividades expressivas de xilanases são normalmente encontradas em extratos enzimáticos destinados a sacarificação de celulose (MARTINS et al., 2008), e que um estudo prévio demonstrou que essas enzimas possuem um papel importante na sacarificação dos açúcares encontrados em forragem de milho pré-tratada por explosão a vapor (ÖHGREN et al., 2007).

3. OBJETIVO

Correlacionar a composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído com a eficiência de sacarificação enzimática da celulose presente no material.

3.1. Metas

- Caracterizar uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar quanto a sua composição química;
- Submeter o bagaço de cana-de-açúcar a pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído em reator estático, sob diferentes condições de temperatura, tempo de residência e concentração ácida;
- Definir condições de hidrólise enzimática adequadas para avaliar a digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ou não com H_2SO_4 diluído;
- Avaliar os efeitos provocados pelos pré-tratamentos na composição, estrutura e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo foi obtido da Usina Vale do Rosário, localizada na cidade de Morro Agudo - S.P. O bagaço foi moído em moinho de facas e posteriormente peneirado, onde apenas a fração que ultrapassou a malha de 20 *mesh* foi utilizada nesse estudo.

4.1.1. Extração do bagaço de cana-de-açúcar

Em aparelho Soxhlet, o bagaço foi extraído com água, etanol e água seguida de etanol. As amostras de bagaço (4,5 g) foram mantidas em contato com os solventes (800 mL) durante 24 horas (os solventes foram substituídos a cada 12 horas). Após a extração, as amostras foram secas a temperatura ambiente, transferidas quantitativamente para pesa-filtros previamente tarados e deixadas em estufa a 105 °C até massa constante. O cálculo de porcentagem de extrativos do bagaço foi baseado na massa seca inicial do material (CUNHA, 1999).

4.1.2. Análise dos extrativos

Os extratos aquosos e alcoólicos foram analisados quanto ao perfil de absorção de luz nas regiões ultravioleta (UV) e visível (VIS) do espectro. Os extratos foram diluídos e, posteriormente, submetidos a uma varredura na região entre 200 e 700 nm. Assim, os resultados foram plotados em gráficos como absorbância relativa, após correção pelo fator de diluição.

4.1.3. Caracterização química do bagaço

As diferentes amostras de bagaço foram caracterizadas quanto à suas composições químicas (teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas). Para isso, aproximadamente 2 g de bagaço foram transferidas para um béquer contendo 15 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). Essa mistura foi continuamente agitada com bastão de vidro em banho termostático a 45 °C, por 7 min. Após o tempo de 7 min, foram adicionados à reação de hidrólise 275 mL de água destilada, e esse conteúdo transferido para um Erlenmeyer, para ser autoclavado a 121 °C por 30 min. Após resfriamento a temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada em papel de filtro e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL, então completado com água destilada e homogeneizado.

O resíduo sólido (lignina insolúvel + cinzas) retido no papel de filtro foi lavado com água destilada até pH neutro, seco a temperatura ambiente e levado a estufa (105 °C) até massa constante. Para determinação das cinzas, o material seco a 105 °C foi aquecido em mufla elétrica a 800 °C durante 2 horas. Após resfriamento, o material calcinado foi quantificado gravimetricamente. A partir da diferença entre a massa do resíduo seco e a massa das cinzas foi possível determinar a percentagem de lignina insolúvel.

Para a determinação da lignina solúvel, 40 gotas de NaOH 6,5M e 5 mL do hidrolisado foram transferidos para um balão de 100 mL, completado com água destilada. Em seguida, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 280 nm. Para determinar a concentração de lignina solúvel, utilizou-se as equações 1 e 2 (GOUVEIA et al., 2009).

$$A_{pd} = (C_F \times \epsilon_F + C_{HMF} \times \epsilon_{HMF}) \times L \quad (1)$$

$$\text{Lignina solúvel (g/L)} = 0,04187 \times (A - A_{pd}) - 0,0003279 \quad (2)$$

Nas equações 1 e 2, A: absorbância da solução em 280 nm, A_{pd} : absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) em 280 nm, C_F e C_{HMF} : concentração de furfural e HMF determinadas por HPLC, ϵ_F e ϵ_{HMF} : absorvidade do furfural (146,85 L/g.cm) e HMF (114,00 L/g.cm), e L: caminho ótico da cubeta.

Para determinação do teor de cinzas, aproximadamente 2 g de amostra de bagaço foram transferidas para cadinhos, previamente tarados, e mantidos em mufla à 800 °C durante 2 horas, caracterizando a quantidade de materiais inorgânicos que constituem as amostras de bagaço.

O hidrolisado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). A determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético foi realizada nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45 °C, solução de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e volume de 20 µL de amostra injetada. Para a determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, foram utilizadas as seguintes condições: coluna Resolve 5µm Spherical C18 (3,9 x 300 mm), temperatura da coluna de 25 °C, detector de ultra-violeta SPD-10A UV-VIS (280 nm), solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min e volume da amostra injetada de 20 µL.

Para o cálculo dos teores de celulose e hemicelulose contidos no bagaço, utilizou-se as equações 3 e 4, respectivamente:

$$\% \text{ celulose} = \% \text{ celobiose} \times 0,95 + \% \text{ glicose} \times 0,90 + \% \text{ HMF} \times 1,29 \quad (3)$$

$$\% \text{ hemicelulose} = \% \text{ xilose} \times 0,88 + \% \text{ arabinose} \times 0,88 + \% \text{ furfural} \times 1,38 + \% \text{ ácido acético} \times 0,70 \quad (4)$$

4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em êmbolos de aço de 200 mL, mantidos em banho de silicone termostatizado. O teor de sólidos (bagaço) utilizado no pré-tratamento foi de 15% (m/v).

4.2.1. Condições de pré-tratamento do bagaço com H₂SO₄ diluído

Com a intenção de otimizar o pré-tratamento do bagaço, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 completo. A temperatura (112,5 - 157,5 °C), o tempo de residência (5 - 35 min) e a concentração de ácido sulfúrico (0 - 3,0%, m/v) empregadas no pré-tratamento variaram de acordo com a matriz experimental (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores reais e codificados das variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 completo, com 6 pontos centrais, empregados no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Exp.	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ácido (% m/v)	Temperatura	Tempo	Ácido
1	120	10	0,5	-1	-1	-1
2	150	10	0,5	1	-1	-1
3	120	30	0,5	-1	1	-1
4	150	30	0,5	1	1	-1
5	120	10	2,5	-1	-1	1
6	150	10	2,5	1	-1	1
7	120	30	2,5	-1	1	1
8	150	30	2,5	1	1	1
9	135	20	1,5	0	0	0
10	135	20	1,5	0	0	0
11	135	20	1,5	0	0	0
12	112,5	20	1,5	-1,5	0	0
13	157,5	20	1,5	1,5	0	0
14	135	5	1,5	0	-1,5	0
15	135	35	1,5	0	1,5	0
16	135	20	0	0	0	-1,5
17	135	20	3,0	0	0	1,5
18	135	20	1,5	0	0	0
19	135	20	1,5	0	0	0
20	135	20	1,5	0	0	0

4.2.2. Cálculo do fator de severidade combinada

O fator de severidade combinada ($\log R_0$) foi calculado de acordo com a equação 5, conforme proposto por SCHELL et al. (2003).

$$FSC = \log_{10} (t \cdot \exp[T - 100/14,75]) - pH \quad (5)$$

Onde t é o tempo de residência, T é a temperatura e pH refere-se ao pH do respectivo hidrolisado hemicelulósico.

4.2.3. Caracterização das amostras de bagaço pré-tratado

Após a etapa de pré-tratamento, as amostras obtidas de acordo com o planejamento experimental foram caracterizadas quimicamente, seguindo metodologia descrita no item 4.1.3.

4.2.4. Análise estatística dos resultados experimentais

Os experimentos foram realizados de acordo com metodologia de superfície de resposta (BOX et al., 1978), empregando-se um planejamento fatorial completo, com a finalidade de permitir a elaboração de modelos empíricos para predição dos teores de celulose, hemicelulose e lignina em função das condições de pré-tratamento (temperatura, tempo de residência e concentração de ácido). Os modelos empíricos foram elaborados através do ajuste de modelos quadráticos (equação 6) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados.

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j \quad (6)$$

A significância dos coeficientes de regressão do modelo foi avaliada considerando-se como coeficientes estatisticamente significativos aqueles que apresentaram significância ao nível de 5% ($p < 0,05$). A validação dos modelos obtidos foi feita levando-se em consideração a significância estatística, a capacidade de predição, a falta de ajuste e a análise gráfica da distribuição dos resíduos. As influências das variáveis independentes sobre as variáveis resposta (teores de celulose, hemicelulose e lignina) foram avaliadas de acordo com conceitos de estatística descritiva e multivariada, utilizando-se os softwares *Design Expert 5.0* e *Statgraphics Plus 6.0*, e as superfícies de resposta descritas por estes modelos foram plotadas com o software *Statistica 5.0*.

Os valores reais e codificados das variáveis independentes avaliadas nos ensaios para o pré-tratamento do bagaço estão expressos na Tabela 1. Para a realização das análises estatísticas, estes valores foram codificados em níveis de acordo com a equação 7.

$$VC = (VR - V0) / (\Delta VR / 2) \quad (7)$$

Onde VC é o valor codificado da variável independente; VR é o valor real da variável independente; $V0$ é o valor real da variável independente no nível central e ΔVR é a diferença entre o valor real máximo e o valor real mínimo da variável independente.

4.3. Extratos enzimáticos

Os extratos utilizados nesse estudo são preparados enzimáticos produzidos para o processamento completo de materiais lignocelulósicos. Um dos extratos utilizados foi obtido a partir de uma linhagem de *Trichoderma reesei* modificada geneticamente. O outro consistiu na mistura de um complexo celulásico obtido a partir de *Trichoderma reesei* com um extrato β -glicosidásico obtido a partir de *Aspergillus* sp., na proporção 9:1 (v/v), respectivamente.

4.3.1. Caracterização dos extratos enzimáticos

Os diferentes extratos enzimáticos foram caracterizados quanto às atividades de celulasas totais, endoglucanases, exoglucanases, celobiases, β -glicosidases, xilanases, manganês peroxidases, lacases e lignina peroxidases, e aos teores de proteínas totais. As atividades das enzimas hidrolíticas e as soluções utilizadas em seus respectivos ensaios foram realizadas em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), uma vez que os experimentos de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foram conduzidos com esse mesmo tampão.

4.3.1.1. Determinação da atividade de Celulasas Totais

A metodologia adotada para a determinação da atividade de celulasas totais foi aquela proposta por Ghose (1987). Em tubos de ensaio, adicionou-se tiras de 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão para pré-incubação à 50 °C. Para dar início a reação, foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas responsáveis por liberar cerca de 2 mg de glicose (açúcares redutores como glicose). Nas mesmas condições experimentais, foram submetidos os respectivos brancos (enzima e substrato) e diferentes diluições do padrão de glicose (10 mg/mL), para construção da curva de calibração. Transcorrido o tempo de 60 min, as reações foram interrompidas com 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e fervidas durante 5 min. Logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a leitura da absorbância feita à 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de glicose liberada no meio foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose.

Para o cálculo da atividade de celulasas totais (FPU), primeiramente é necessário estimar a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose. Para isso, foi plotado um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático em relação a massa de glicose liberada na reação. Após encontrar a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose, a atividade enzimática foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{\text{concentração enzimática que libera 2 mg de glicose}} \quad (8)$$

4.3.1.2. Determinação da atividade de Endoglucanase

Uma solução de carboximetilcelulose 2% (m/v) foi utilizada como substrato na determinação da atividade endoglucanásica (GHOSE, 1987). Primeiramente, os tubos de ensaio com 0,5 mL da solução de substrato foram pré-incubados a 50 °C. E então, foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas capazes de produzirem por volta de 0,5 mg de glicose. Nessas mesmas condições experimentais, foram submetidos os respectivos brancos (enzima e substrato) e diferentes diluições do padrão de glicose (2 mg/mL), para construção da curva padrão. Ao término de 30 min, a reação foi interrompida com 3 mL de DNS (MILLER, 1959). Em seguida, os tubos de ensaio foram fervidos por 5 min e imediatamente resfriados em água gelada. Após esse resfriamento, adicionou-se 20 mL de água destilada nos tubos e assim, feita leitura da absorbância em espectrofotômetro à 540 nm. A concentração de glicose liberada no meio reacional foi determinada com o auxílio de uma curva padrão de glicose.

Para calcular a atividade endoglucanásica, necessita-se estimar a concentração enzimática que produza exatamente 0,5 mg de glicose. Para isso, foi plotado um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose liberada. Encontrada a concentração enzimática responsável por produzir 0,5 mg de glicose, a atividade endoglucanásica foi calculada (equação 9).

$$\text{UCMC/mL} = \frac{0,185}{\text{concentração enzimática que libera 0,5 mg de glicose}} \quad (9)$$

4.3.1.3. Determinação da atividade de Exoglucanase

Utilizou-se solução de Avicel 1% (m/v) como substrato para a determinação da atividade de exoglucanase (WOOD; BATH, 1988). Tubos de ensaio com 1 mL de substrato e 0,5 mL de tampão foram pré-incubados à 50 °C. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas nos tubos. Nas mesmas condições experimentais,

foram feitos também os respectivos brancos (enzima e substrato) e os padrões de glicose (para construção da curva padrão). A fim de obter uma cinética enzimática, foi observada a produção de glicose nos tempos de 30, 60 e 120 min. E para que as reações fossem paralisadas exatamente nos tempos supramencionados, os tubos eram colocados em água fervente por 5 min. Após serem resfriadas, as amostras eram centrifugadas por 30 min à 12.000 g. A concentração de açúcares solúveis nos sobrenadantes foram determinadas pelo método de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro à 490 nm. Utilizando-se de uma curva padrão de glicose, a concentração de glicose liberada no meio reacional foi determinada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μ mol de produto gerado por minuto (UI).

4.3.1.4. Determinação da atividade de Celobiase

A determinação da atividade de celobiase foi conduzida segundo a metodologia proposta por Ghose (1987), com modificação. Como substrato para esse ensaio, foi utilizada uma solução 15 mM de celobiose. Os tubos de ensaio com 1 mL da solução de celobiose foram pré-incubados à 50 °C. Passada a pré-incubação, adicionou-se 1 mL de diferentes diluições enzimáticas, as quais com a capacidade de produzir cerca de 1 mg de glicose. Sob mesmas condições experimentais, também foram realizados os brancos das diluições enzimáticas, branco do substrato e os padrões de glicose (para construção da curva padrão). Transcorridos 30 min, os tubos foram colocados em água fervente por 5 min para que as reações fossem interrompidas. Após centrifugação (12.000 g por 30 min), os sobrenadantes foram analisados por CLAE, para quantificação de glicose produzida. A concentração de glicose no meio reacional foi determinada contra uma curva padrão de glicose.

Para calcular atividade de celobiase, primeiramente multiplicou-se por 2 a concentração de glicose encontrada no meio reacional, convertendo assim em quantidade absoluta de glicose (mg). Construindo um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose gerada, estimou-se a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 1 mg de glicose. Encontrada a concentração enzimática desejada, utilizou-se a equação 10 para determinar a atividade de celobiase.

$$\text{UCB/mL} = \frac{0,0926}{\text{concentração enzimática que libera 1 mg de glicose}} \quad (10)$$

4.3.1.5. Determinação da atividade de β -glicosidase

A metodologia utilizada para determinação da atividade de β -glicosidase foi proposta por Wood e Bath (1988), a qual se utiliza uma solução de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo 5 mM como substrato. Para iniciar o ensaio enzimático, tubos de ensaio com 1 mL de substrato e 1,8 mL de tampão foram pré-incubados à 50 °C. Após esse tempo, foram adicionados 0,2 mL de diferentes diluições enzimáticas. Com o intuito de se obter uma cinética enzimática, a produção de *p*-nitrofenol foi monitorada nos tempos de 10, 20 e 30 min. Nessas mesmas condições experimentais, foram também conduzidos os brancos das diluições enzimáticas e do substrato. As reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 4 mL de tampão glicina (0,4 M, pH 10,8) e a leitura das absorbâncias feitas em espectrofotômetro, à 430 nm. A concentração de *p*-nitrofenol liberada no meio reacional foi determinada contra uma curva padrão previamente construída. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μ mol de *p*-nitrofenol formado por minuto (UI).

4.3.1.6. Determinação da atividade de Xilanase

Para determinação da atividade de xilanases, utilizou-se como substrato uma solução de xilana de birchwood 1 % (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Iniciou-se com a pré-incubação de 1,8 mL de solução de substrato à 50 °C; em seguida, foram adicionados 0,2 mL de diluições enzimáticas. Nas mesmas condições experimentais, foram realizados os brancos das diluições enzimáticas, o branco do substrato e os padrões de xilose (para construção da curva padrão). Após 5 minutos, as reações foram interrompidas com a adição de 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e, na sequência, fervidas durante

5 min. As amostras foram resfriadas e, assim, adicionou-se 20 mL de água destilada em cada tubo. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, à 540 nm. Para a quantificação de xilose gerada nas amostras, foi utilizada uma curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de xilose liberado por minuto (UI).

4.3.1.7. Determinação da atividade de Manganês Peroxidase

A atividade de manganês peroxidase (MnP) foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 % (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste contínuo do pH em 7,4) em 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,25 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; LUNDELL et al., 1990). Em intervalos de tempo definidos entre 1 e 5 minutos, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removida e foi feita a adição de 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada medindo-se a absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ($\epsilon_{610} = 22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (LUNDELL et al., 1990). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de produto formado por minuto (UI).

4.3.1.8. Determinação da atividade de Lacase

A atividade de lacase (Lac) foi determinada utilizando-se como substrato 0,1 mL de uma solução de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] em concentração de 1 mM (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998). A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 5,0), 0,1 mL de água e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi monitorada entre 10 s e 5 min pela leitura da absorbância em 420 nm, em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi calculada com

base na absorvidade molar do ABTS ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de produto formado por minuto (UI).

4.3.1.9. Determinação da atividade de Lignina Peroxidase

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada de acordo com o método de Tien e Kirk (1988). A mistura reacional foi composta por 0,22 mL de ácido tartárico 50 mM, 0,2 mL de álcool veratrílico 10 mM, 0,08 mL de peróxido de hidrogênio 5 mM e 0,5 mL de extrato enzimático. Monitorou-se a oxidação do substrato a 310 nm ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de produto formado por minuto (UI).

4.3.1.10. Determinação da concentração de proteínas

Inicialmente, as proteínas foram precipitadas para serem quantificadas posteriormente, conforme proposto por Ghose (1987). Aliquota de 1 mL de extrato enzimático e 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram misturados e mantidos em refrigerador por 60 min. Após centrifugação (30 min, 12.000 g), o sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado no Reagente A.

Para determinação do teor de proteínas, os reagentes foram preparados da seguinte forma: Reagente A – 20g de Na_2CO_3 e 4 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 1000 mL. Reagente B1 – dissolveu-se 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água destilada e o volume completado para 100 mL. Reagente B2 – dissolveu-se em água destilada 2 g de tartarato de sódio e potássio e o volume completado para 100 mL. Na preparação do Reagente C, foram misturados na seguinte ordem: 1 mL do Reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do Reagente A.

Para quantificação de proteínas, foi misturado 0,5 mL de solução de proteína à 5 mL do Reagente C. Após 10 min, foi adicionado 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteu (1 N). Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro à 750 nm. As concentrações

de proteínas foram determinadas contra uma curva padrão de albumina bovina construída anteriormente.

4.4. Definição das condições de hidrólise enzimática

4.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado na hidrólise enzimática foi pré-tratado com H_2SO_4 diluído, nas seguintes condições: 15% de teor de sólidos (m/v), temperatura de 150 °C, solução de H_2SO_4 (2,0%, m/v) e 30 min de tempo de residência. Após o pré-tratamento, a composição química do bagaço pré-tratado foi determinada (vide item 4.1.3) quanto ao teor de celulose (54,8%), hemicelulose (13,3%), lignina (32,7%) e cinzas (1,1%).

4.4.2. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído

Foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^3 completos, com 6 pontos centrais (um para cada extrato enzimático), para correlacionar os níveis das variáveis com a eficiência de sacarificação da celulose. As variáveis foram: teor de sólidos (1,19 – 4,81%, m/v), carga enzimática (1,91 – 38,09 FPU/g de bagaço) e carga do surfactante, Tween 20 (0 – 0,1 g/g de bagaço).

A matriz dos planejamentos experimentais, com os valores reais das variáveis independentes, é ilustrada na Tabela 2. Para a realização das análises estatísticas, estes valores foram codificados em níveis de acordo com a equação 7, anteriormente mencionada, sendo também apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores reais e codificados das variáveis independentes dos planejamentos fatoriais 2³ completos, com 6 pontos centrais, dos experimentos de hidrólise enzimática.

Exp.	Sólidos (% m/v)	Enzima (FPU/g)	Surfactante (g/g)	Sólidos	Enzima	Surfactante
1	2	10	0,02	-1	-1	-1
2	4	10	0,02	1	-1	-1
3	2	30	0,02	-1	1	-1
4	4	30	0,02	1	1	-1
5	2	10	0,08	-1	-1	1
6	4	10	0,08	1	-1	1
7	2	30	0,08	-1	1	1
8	4	30	0,08	1	1	1
9	3	20	0,05	0	0	0
10	3	20	0,05	0	0	0
11	3	20	0,05	0	0	0
12	1,19	20	0,05	-1,81	0	0
13	4,81	20	0,05	1,81	0	0
14	3	1,91	0,05	0	-1,81	0
15	3	38,09	0,05	0	1,81	0
16	3	20	0,00	0	0	-1,81
17	3	20	0,10	0	0	1,81
18	3	20	0,05	0	0	0
19	3	20	0,05	0	0	0
20	3	20	0,05	0	0	0

4.4.2.1. Condições experimentais

Os ensaios de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se aos frascos 12,5 mL de tampão citrato de sódio (100 mM, pH 4,8) com azida sódica 0,02%. O volume de extrato enzimático, a

quantidade de surfactante (Tween 20) e a massa de bagaço pré-tratado nos ensaios variaram de acordo com as condições empregadas no planejamento experimental (Tabela 2). O volume final dos experimentos (25 mL) foi completado com água destilada. A umidade do bagaço pré-tratado foi determinada por balança de infravermelho, durante 30 min à 105 °C. Para cada condição de hidrólise do planejamento, os respectivos brancos dos substratos e das enzimas foram realizados. A hidrólise enzimática foi conduzida à 45 °C, em shaker à 70 rpm. Nos tempos de 24, 72 e 168 horas de hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas de 1 mL. Em seguida, essas amostras foram fervidas por 5 minutos (para desnaturação das enzimas, interrompendo a hidrólise do material), e centrifugadas por 30 min, à 12.000 g.

4.4.2.2. Cálculo da digestibilidade enzimática da celulose

Para a determinação da concentração de açúcares fermentescíveis (glicose e xilose), os sobrenadantes foram previamente filtrados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm) à 45 °C, solução de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e volume da amostra injetada de 20 µL.

A digestibilidade enzimática da celulose foi calculada de acordo com a equação 11:

$$D_C = (((C_G \times V_R) \times 0,90)/M_I) \times 100 \quad (11)$$

Onde C_G é a concentração de glicose no meio reacional; V_R é o volume reacional e M_I é a massa inicial de celulose adicionada à reação.

4.4.2.3. Análise estatística dos resultados experimentais

As influências das variáveis independentes (teor de sólidos, carga enzimática e carga de surfactante) sobre o percentual de sacarificação da celulose foram avaliadas de acordo com conceitos de estatística descritiva e multivariada. Os modelos empíricos foram

elaborados através do ajuste de modelos quadráticos (equação 6) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados, como descrito anteriormente no item 4.2.3.

4.4.2.4. Uso de maiores teores de sólidos na hidrólise enzimática

Para complementar os resultados obtidos previamente nos planejamentos experimentais, avaliou-se o efeito provocado pelo uso de concentrações crescentes de sólidos (valores iniciais de 4, 6, 8, 10 e 12 %) na digestibilidade enzimática da celulose do bagaço pré-tratado. As cargas de enzima (extrato II) e de surfactante (Tween 20) foram fixadas em 10 FPU/g e 0,05 g/g de bagaço pré-tratado, respectivamente. As condições de hidrólise enzimática foram as mesmas descritas no item 4.4.2.1, à exceção de que as amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A porcentagem de conversão de celulose do bagaço pré-tratado em glicose foi calculada conforme descrito no item 4.4.2.2. Os experimentos foram realizados em duplicatas, e os valores médios obtidos foram comparados entre si utilizando-se análise de variância.

4.5. Hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com H_2SO_4 diluído

As amostras de bagaço pré-tratado obtidas no planejamento experimental descrito na Tabela 1 foram submetidas à hidrólise enzimática. O experimento foi conduzido com 10% de sólidos, carga enzimática (extrato II) igual a 10 FPU/g de bagaço pré-tratado e carga de surfactante (Tween 20) de 0,05 g/g de bagaço pré-tratado. As condições de hidrólise enzimática foram as mesmas descritas no item 4.4.2.1, à exceção de que as amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A porcentagem de conversão de celulose do bagaço pré-tratado foi calculada conforme descrito no item 4.4.2.2.

4.5.1. Análise estatística dos resultados experimentais

As influências das variáveis independentes (temperatura, tempo de residência e concentração de ácido sulfúrico) sobre o percentual de sacarificação da celulose das amostras obtidas no planejamento experimental (item 4.2.1) foram avaliadas de acordo com conceitos de estatística descritiva e multivariada. O modelo empírico foi elaborado através do ajuste de modelos quadráticos (equação 6) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados, como descrito anteriormente no item 4.2.4.

4.6. Caracterização morfológica de amostras selecionadas, por microscopia eletrônica de varredura

As micrografias das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas com fator de severidade ($\log R_0$) de -1,76 e 1,91, antes e após suas respectivas hidrólises enzimáticas (72 horas), foram obtidas à baixo vácuo, utilizando o microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP. As amostras foram congeladas em ultrafreezer à -65 °C e posteriormente liofilizadas, seguindo metodologia proposta por Pathan, Bond e Gaskin (2008), modificada. Fixaram-se as amostras em suporte de alumínio ("stub") com fita de carbono e, em seguida, estas foram submetidas ao recobrimento metálico com 25 nm de ouro. Para a obtenção das imagens foi utilizado o detector de elétrons secundários de baixo vácuo (VPSE) e uma intensidade de feixe de elétrons de 20 kV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O bagaço de cana-de-açúcar foi extraído com água, etanol ou água seguida de etanol. Os valores obtidos desses compostos extraíveis variaram de acordo com o solvente utilizado (Tabela 3). O bagaço extraído com água apresentou 6,0% de extrativos na sua composição. A extração com etanol resultou em um valor semelhante (5,7%) de extrativos, comparado aquele obtido em extração com água. Por outro lado, a maior quantidade de extrativos (9,1%) foi resultante do processo de extração do bagaço com água seguida de etanol.

O teor de extrativos parece variar com relação a origem do bagaço e com o solvente utilizado no processo de extração. Por exemplo, Sanjuán et al. (2001) obtiveram maior valor de extrativos (10,3%) em uma amostra de bagaço extraída apenas com água. Entretanto, Martin et al. (2007) obtiveram valor semelhante (6,1%) de extrativos, comparado ao resultado obtido no presente estudo, em uma amostra de bagaço extraída com etanol. Porém, utilizando benzeno e etanol como solventes, apenas 3,2% de extrativos foi encontrado em uma amostra de bagaço de cana (ZHAO; WANG; LIU, 2007).

Tabela 3 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e extraído com diferentes solventes.

Componentes (%)	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço extraído		
		<i>água</i>	<i>etanol</i>	<i>água + etanol</i>
<i>Celulose</i>	46,4 ± 0,3	44,6 ± 2,0	46,2 ± 0,4	45,0 ± 0,1
<i>Hemicelulose</i>	27,2 ± 0,2	26,2 ± 1,5	27,8 ± 0,3	25,8 ± 0,1
<i>Lignina</i>	24,8 ± 1,0	22,0 ± 0,6	19,3 ± 0,2	19,1 ± 0,2
<i>Cinzas</i>	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>Extrativos</i>	-	6,0	5,7	9,1

* O desvio padrão foi calculado a partir de duplicatas.

Acredita-se que a sacarose pode representar uma parcela expressiva dos extrativos obtidos no presente estudo, uma vez que as concentrações desse açúcar no bagaço de cana podem ser encontradas entre 0,2 e 5,0% (TEWARY; MALIK, 2007). Entretanto, deve-se salientar que os açúcares são mais solúveis em água do que em etanol (ALVES et al., 2007; BOUCHARD; HOFLAND; WITKAMP, 2007), assim, provavelmente a sacarose estaria presente em maior quantidade nos extratos aquosos.

Os extratos aquosos e alcoólicos, resultantes das diferentes extrações do bagaço, foram analisados quanto a absorção de luz nas regiões ultravioleta e visível do espectro. Em geral, a absorção de luz foi mais intensa nas primeiras 12 horas de extração (primeira extração) e apenas na região do ultravioleta, independentemente do extrato (Figura 7). Embora o uso de espectrofotômetro não permita a identificação precisa dos compostos solubilizados durante a extração, a intensa absorção de luz na região do ultravioleta é um forte indicativo da presença de moléculas aromáticas derivadas da lignina nos extratos avaliados (LIN; DENCE, 1992). Um pico de absorção de luz em 280 nm foi observado para o extrato aquoso (Figura 7A). O extrato alcoólico, por sua vez, apresentou maior número de picos de absorção de luz, em 220, 290 e 315 nm (Figura 7B). O ácido ferúlico, encontrado em materiais lignocelulósicos, pode estar sendo solubilizado durante a extração do bagaço com etanol, uma vez que esse composto possui absorção de luz máxima em 315 nm (HIGUCHI et al, 1967; IEMMA et al., 2010).

Interessantemente, a extração prévia do bagaço com água não influenciou qualitativa e quantitativamente os perfis de absorção de luz dos extratos alcoólicos subsequentes (Figura 7C), indicando que os dois solventes extraíram, pelo menos em parte, compostos estruturalmente distintos. Segundo Browning (1967), solventes orgânicos podem solubilizar ácidos graxos e seus ésteres, resinas, ceras e compostos coloridos. A água, por sua vez, solubiliza sais inorgânicos, açúcares, polissacarídeos e alguns compostos fenólicos.

Os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e extraídos com os diferentes solventes tiveram suas composições químicas determinadas, tendo sido observadas algumas diferenças em relação ao percentual dos seus constituintes (Tabela 3). No bagaço *in natura* foi encontrado 46,4% de celulose, 27,2% de hemicelulose, 24,8% de lignina e 1,6% de cinzas. Os teores de celulose e hemicelulose nos bagaços extraídos não apresentaram grandes diferenças quando comparados àqueles do bagaço *in natura*.

Figura 7 – Espectro de absorção de luz na região do ultravioleta e visível dos extratos do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando como solventes (A) água, (B) etanol e (C) água seguida de etanol.

Entretanto, os teores de lignina encontrados nos bagaços extraídos com água, etanol e água seguida de etanol foram consideravelmente menores (22,0%, 19,3% e 19,1%, respectivamente), comparado aquele do bagaço *in natura* (24,8%). Semelhante aos resultados observados por Tamaki e Mazza (2010), a diminuição dos valores percentuais de lignina encontrado nos bagaços extraídos pode estar relacionada à condensação dos

extrativos durante a análise composicional e sua quantificação como lignina insolúvel em meio ácido.

Os teores de cinzas nos bagaços extraídos com água, etanol e água seguida de etanol (1,2%, 1,0% e 1,0%, respectivamente) também foram menores do que aquele quantificado no bagaço *in natura* (1,6%), evidenciando que parte destes constituintes são prontamente solubilizados durante a extração. Zhao, Wang e Liu (2009) observaram 1,4% de cinzas em uma amostra de bagaço de cana de uma província da China. Como pode ser observado, as cinzas representam uma pequena fração do bagaço de cana-de-açúcar.

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar extraído com água seguida de etanol e valores já reportados por outros autores foram compilados na Tabela 4. Em uma amostra de bagaço extraído com ciclohexano:água (1:1) e água quente, Rocha (2000) observou 47,1%, 28,8%, 22,2% e 1,0% de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, respectivamente. Entretanto, Moriya (2003) encontrou maior quantidade de celulose (55,7%) e menor teor de hemicelulose (20,1%) em bagaço extraído apenas com etanol. O menor teor de celulose (42,1%) e a maior concentração de lignina (31,4%) foram encontrados por Pitarelo (2007), em uma amostra de bagaço extraída sucessivamente com diclorometano, etanol:tolueno (1:2), etanol e água quente. A amostra de bagaço utilizada por Brienzo, Siqueira e Milagres (2009) apresentou o menor teor de lignina, 19,6%.

Estudos realizados em outros países também mostram diferenças na composição química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar. Por exemplo, o bagaço utilizado por Sasaki, Adschiri e Arai (2002) continha 35,0% de celulose, 35,8% de hemicelulose e 16,1% de lignina. Sun et al. (2004), por outro lado, encontraram 43,6% de celulose, 33,5% de hemicelulose e 18,1% de lignina. Os resultados reportados na literatura demonstram claramente que a composição do bagaço de cana-de-açúcar varia amplamente em função da sua origem.

O bagaço extraído com água seguida de etanol teve sua composição química também determinada pela metodologia proposta pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos da América (SLUITER et al., 2008). A composição química do bagaço extraído com água seguida de etanol foi de 44,9% de glucana, 22,2% de xilana, 1,1% de arabinana, 2,6% de grupos acetila, 14,1% de lignina insolúvel, 5,2% de lignina solúvel, 1,4% de cinzas e 8,5% de extrativos. Assim, quando a composição química do bagaço é expressa como celulose (44,9%), hemicelulose (25,9%), lignina (19,3%), cinzas (1,4%) e extrativos (8,5%), é observada similaridade com a

composição química determinada utilizando a metodologia validada por Gouveia et al. (2009), apresentada na Tabela 3.

Tabela 4 – Composição mássica de diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar

Componentes (%)	Referências				
	Presente estudo ¹	Rocha (2000) ²	Moriya (2003) ³	Pitarelo (2007) ⁴	Brienzo (2009) ⁵
<i>Celulose</i>	49,5	47,1	55,7	42,1	42,4
<i>Hemicelulose</i>	28,4	28,8	20,1	22,9	25,2
<i>Lignina</i>	21,0	22,2	23,1	31,4	19,6
<i>Cinzas</i>	1,1	1,0	2,2	2,4	1,6

Solventes extratores: 1) água e etanol; 2) ciclohexano:água (1:1) e água quente; 3) etanol; 4) diclorometano, etanol:tolueno (1:2), etanol e água quente; 5) etanol.

5.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído

A composição química das 20 amostras de bagaço pré-tratado, obtidas sob as diferentes condições de hidrólise com H₂SO₄ diluído, estão descritas na Tabela 5. Primeiramente, vale destacar que os 20 balanços de massa das análises composicionais dos bagaços pré-tratados com H₂SO₄ diluído ficaram entre 95,32% e 102,59%, evidenciando que os métodos analíticos empregados mostraram-se adequados para a análise composicional das amostras de bagaço.

A composição química dos bagaços pré-tratados variou em função das condições empregadas para o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído (temperatura, tempo de residência e concentração do catalisador). Claramente, a hemicelulose foi o componente estrutural do bagaço que sofreu maior ação do pré-tratamento com H₂SO₄ diluído. Este tipo de comportamento já era esperando, uma vez que o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído visa, principalmente, a solubilização e remoção seletiva da fração hemicelulósica contida em materiais lignocelulósicos (NEUREITER et al., 2002; NGUYEN et al., 1998).

Como pode ser observado na Tabela 5, o bagaço com o menor teor de hemicelulose (3,67%) foi aquele submetido à condição de pré-tratamento mais severa (log R₀ de 1,91). Por outro lado, o valor mais elevado de hemicelulose (27,27%) foi encontrado naquele bagaço em que as condições de pré-tratamento foram mais brandas (log R₀ de -1,76). Com

os dados obtidos, fica claro que a eficiência da remoção da fração hemicelulósica está diretamente relacionada à condição de pré-tratamento em que o bagaço foi submetido.

Em um trabalho publicado recentemente (RODRIGUES et al., 2010), o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído foi realizado com sucesso em escala piloto (350 L). Devido ao pré-tratamento, aproximadamente 73% da fração hemicelulósica contida inicialmente no bagaço foi removida (121 °C, 10 min e 100 mg de H_2SO_4 /g de bagaço). Assim, após o pré-tratamento, o bagaço teve como seus constituintes principais a celulose (54,5%) a lignina (32,0%), e um baixo conteúdo de hemicelulose (11,5%). O objetivo principal dos autores foi obter um hidrolisado hemicelulósico a partir do bagaço e reduzir a geração de produtos da degradação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) neste hidrolisado.

Também em função das condições de pré-tratamento empregadas, foi observada variação no teor de celulose (44,36 - 60,37%) e lignina (23,87 - 33,76%) na composição final dos bagaços pré-tratados no presente estudo (Tabela 5). A variação nos valores percentuais dos teores de celulose e lignina deve-se prioritariamente à remoção da hemicelulose das amostras de bagaço, alterando assim a proporção dos constituintes estruturais avaliados. O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácido sulfúrico diluído não remove a celulose e a lignina desses materiais de forma efetiva. Porém, esse tipo de pré-tratamento pode aumentar significativamente o rendimento da digestibilidade enzimática de materiais lignocelulósicos (GROHMANN; TORGET; HIMMEL, 1986).

Do ponto de vista biotecnológico, para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, torna-se interessante um material rico em celulose e baixo teor de lignina. A celulose é um homopolímero e quando hidrolisada a monômeros de glicose, via enzimática, pode ser fermentada por leveduras e aumentar significativamente a produção final de etanol combustível (BALAT; BALAT, 2009). Um material com altos teores de lignina não é interessante para a hidrólise enzimática da celulose, pois as celulasas podem adsorver improdutivamente à lignina, diminuindo a eficiência na conversão da celulose presente no material pré-tratado (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; TU; PAN; SADDLER, 2009).

Tabela 5 – Condições empregadas de pré-tratamento e porcentagem dos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar

Exp.	Condições de pré-tratamento				Composição Química				Balanço (%)
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ácido (% m/v)	Fator de severidade (Log R ₀)	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)	
1	120	10	0,5	- 0,21	44,36	25,4	25,78	0,96	96,5
2	150	10	0,5	0,66	53,81	18,98	26,59	1,15	100,52
3	120	30	0,5	0,73	49,68	21,65	25,89	1,12	98,33
4	150	30	0,5	1,75	53,67	11,35	29,06	1,26	95,34
5	120	10	2,5	0,52	49,11	24,91	25,1	1,19	100,31
6	150	10	2,5	1,44	59,75	10,18	29,77	1,24	100,94
7	120	30	2,5	0,99	52,13	17,47	26,87	1,31	97,78
8	150	30	2,5	1,91	59,33	3,67	33,76	1,2	97,96
9	135	20	1,5	1,17	60,37	8,79	30,91	1,55	101,61
10	135	20	1,5	1,13	53,39	10,26	30,19	1,49	95,32
11	135	20	1,5	1,11	58,61	8,34	31,87	1,95	100,74
12	112,5	20	1,5	0,48	45,43	25,31	23,87	1,19	95,8
13	157,5	20	1,5	1,86	54,21	11,15	28,64	2,36	96,36
14	135	5	1,5	0,52	52,71	20,66	27,95	1,28	102,59
15	135	35	1,5	1,38	59,40	10,11	30,77	1,44	101,72
16	135	20	0	- 1,76	44,83	27,27	24,15	1,06	97,3
17	135	20	3,0	1,42	55,27	8,75	31,06	1,44	96,53
18	135	20	1,5	1,19	53,68	11,68	28,85	1,34	95,55
19	135	20	1,5	1,20	54,91	11,46	30,26	1,8	98,43
20	130	20	1,5	1,23	51,67	12,13	30,08	1,69	95,58

5.2.1. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de celulose

Os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o teor de celulose com as variáveis que o influenciam durante o pré-tratamento, bem como seus respectivos níveis de significância estão expressos na Tabela 6. De acordo com os dados apresentados nesta tabela, o modelo que relaciona o teor de celulose com as variáveis independentes que o influenciam é fornecido pela equação 12. Assim, pode ser observado que as três variáveis independentes influenciam significativamente o teor de celulose no bagaço pré-tratado, sendo os efeitos por elas determinados decrescentes na seguinte ordem: temperatura > concentração de ácido > tempo de residência.

Tabela 6 – Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do teor de celulose em função das condições de pré-tratamento

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
<i>Constante</i>	55,62	0,89		
<i>A</i>	3,56	0,71	4,99	0,0002
<i>B</i>	1,43	0,71	2,00	0,0668
<i>C</i>	2,76	0,71	3,87	0,0019
A^2	-2,03	0,79	-2,58	0,0230
C^2	-1,92	0,79	-2,45	0,0294

A: temperatura; B: tempo de residência; C: concentração de ácido; A^2 e C^2 : termos quadráticos.

$$T_C = 55,62 + 3,56A - 2,03A^2 + 1,43B + 2,76C - 1,92C^2 \quad (12)$$

Onde T_C é o teor de celulose obtido em função dos valores codificados de temperatura (A), tempo de residência (B) e concentração de ácido (C).

A análise de variância do modelo supramencionado (equação 12) mostra que o modelo é significativo, não apresenta falta de ajuste e possui boa capacidade de predição (Tabela 7). Além disso, o plote dos resíduos em função dos valores preditos apresenta uma distribuição aleatória, não sendo identificadas tendências que poderiam invalidar o modelo proposto (Figura 8).

Tabela 7 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de celulose em função das condições de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	F _{calc}	p
<i>Bloco</i>	1	7,72	7,72		
<i>Modelo</i>	5	359,65	71,93	11,34	0,0002
<i>Resíduo</i>	13	82,47	6,34		
<i>Falta de ajuste</i>	9	30,24	3,36	0,26	0,9578
<i>Erro puro</i>	4	52,23	13,06		
<i>Total</i>	19	449,84			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. $R^2: 0,81$.

Figura 8 – Resíduos em função dos valores preditos pelo modelo quadrático proposto para a predição do teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar.

Para elaboração do gráfico de superfície de resposta do teor de celulose em função da temperatura e concentração de ácido, a equação 12 foi reduzida, fixando o tempo de residência em seu nível superior (+1), resultando na equação 10. A superfície de resposta descrita pela equação 13 é apresentada na Figura 9. Pode-se observar que teores de celulose superiores a 55% (m/m) poderiam ser obtidos aumentando a temperatura e a concentração de ácido durante o pré-tratamento do bagaço. As condições de pré-tratamento que levariam a estes maiores teores de celulose no bagaço são ilustradas pela região demarcada em branco na Figura 9.

$$T_C = 57,05 + 3,56A - 2,03A^2 + 2,76C - 1,92C^2 \quad (13)$$

Figura 9 – Teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar em função da concentração de ácido e temperatura empregada durante o pré-tratamento.

5.2.2. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de hemicelulose

A Tabela 8 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o teor de hemicelulose contido no bagaço com as variáveis que o influenciam durante o pré-tratamento, bem como seus respectivos níveis de significância. De acordo com os dados apresentados nesta tabela, o modelo que relaciona o teor de hemicelulose com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela equação 14. As três variáveis independentes influenciam significativamente o teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado, sendo os efeitos por elas determinados decrescentes na seguinte ordem: temperatura > concentração de ácido > tempo de residência.

Tabela 8 – Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose em função das condições de pré-tratamento

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
<i>Constante</i>	10,82	0,87		
<i>A</i>	-5,32	0,62	-8,59	<0,0001
<i>B</i>	-3,29	0,62	-5,32	0,0002
<i>C</i>	-3,91	0,62	-6,32	<0,0001
A^2	2,78	0,68	4,07	0,0018
B^2	1,52	0,68	2,22	0,0481
C^2	2,69	0,68	3,93	0,0023
<i>AC</i>	-1,48	0,77	-1,91	0,0828

A: temperatura; B: tempo de residência; C: concentração de ácido; A^2 , B^2 e C^2 : termos quadráticos; AC interação entre fatores.

$$T_H = 10,82 - 5,32A + 2,78A^2 - 3,29B + 1,52B^2 - 3,91C + 2,69C^2 - 1,48AC \quad (14)$$

Onde T_H é o teor de hemicelulose obtido em função dos valores codificados de temperatura (A), tempo (B) e concentração de ácido (C).

Pode-se observar com a análise de variância do modelo supramencionado (equação 14), que o modelo é significativo, não apresenta falta de ajuste e possui boa capacidade de predição (Tabela 9). Além disso, o plote dos resíduos em função dos valores preditos apresenta uma distribuição aleatória, não sendo identificadas tendências que poderiam invalidar o modelo proposto de teor de hemicelulose em função das condições de pré-tratamento (Figura 10).

Para a elaboração da superfície de resposta em função da temperatura e da concentração de ácido, a equação 14 foi reduzida. Para esta redução, a variável tempo de residência foi fixada em seu nível superior (+1), resultando na equação 15. A superfície de resposta descrita por esta equação é apresentada na Figura 11. Um bagaço com teores de hemicelulose inferiores à 10% (m/m), poderiam ser obtidos aumentando a temperatura e a concentração de ácido durante o pré-tratamento. As condições experimentais que levariam a estes menores teores de hemicelulose são ilustradas na região experimental demarcada com o cinza escuro na Figura 11.

Tabela 9 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose em função das condições de pré-tratamento.

CV	GL	SQ	MQ	F _{calc}	p
<i>Bloco</i>	1	9,03	9,03		
<i>Modelo</i>	7	879,61	125,66	26,25	<0,0001
<i>Resíduo</i>	11	52,66	4,79		
<i>Falta de ajuste</i>	7	43,87	6,27	2,85	0,1640
<i>Erro puro</i>	4	8,79	2,20		
<i>Total</i>	19	941,30			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. $R^2: 0,94$.

$$T_H = 9,05 - 5,32A + 2,78A^2 - 3,91C + 2,69C^2 - 1,48AC \quad (15)$$

Figura 10 – Resíduos em função dos valores preditos pelo modelo quadrático proposto para a predição do teor de hemicelulose no bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 11 – Teor de hemicelulose no bagaço de cana-de-açúcar em função da concentração de ácido e temperatura empregada durante o pré-tratamento.

5.2.3. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de lignina

Os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o teor de lignina com as variáveis que o influenciam no pré-tratamento, bem como seus respectivos níveis de significância, estão representados na Tabela 10. De acordo com os dados apresentados nesta tabela, o modelo que relaciona o teor de lignina com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela equação 16. As três variáveis independentes avaliadas influenciam significativamente o teor de lignina no bagaço pré-tratado, sendo os efeitos por elas determinados decrescentes na seguinte ordem: temperatura > concentração de ácido > tempo de residência.

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do teor de lignina em função das condições de pré-tratamento.

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
<i>Constante</i>	30,10	0,36		
<i>A</i>	1,82	0,29	6,25	<0,0001
<i>B</i>	1,01	0,29	3,46	0,0047
<i>C</i>	1,48	0,29	5,11	0,0003
A^2	-1,59	0,32	-4,97	0,0003
C^2	-0,99	0,32	-3,10	0,0092
<i>AC</i>	0,95	0,36	2,61	0,0228

A: temperatura; B: tempo de residência; C: concentração de ácido; A^2 e C^2 : termos quadráticos; AC interação entre fatores.

$$T_L = 30,10 + 1,82A - 1,59A^2 + 1,01B + 1,48C - 0,99C^2 + 0,95AC \quad (16)$$

Onde T_L é o teor de lignina obtido em função dos valores codificados de temperatura (A), tempo de residência (B) e concentração de ácido (C).

A análise de variância do modelo supramencionado (equação 16) está expressa na Tabela 11. Pode-se observar que o modelo é significativo, não apresenta falta de ajuste e possui boa capacidade de predição. Além disso, o plote dos resíduos em função dos valores preditos apresenta uma distribuição aleatória, não sendo identificadas tendências que poderiam invalidar o modelo proposto (Figura 12).

Tabela 11 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de lignina em função das condições de pré-tratamento.

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	p
<i>Bloco</i>	1	1,90	1,90		
<i>Modelo</i>	6	125,15	20,86	19,79	<0,0001
<i>Resíduo</i>	12	12,65	1,05		
<i>Falta de ajuste</i>	8	9,61	1,20	1,58	0,3462
<i>Erro puro</i>	4	3,04	0,76		
<i>Total</i>	19	139,69			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. R^2 : 0,91.

Figura 12 – Resíduos em função dos valores preditos pelo modelo quadrático proposto para a predição do teor de lignina.

Para elaboração da superfície de resposta em função da temperatura e da concentração de ácido a equação 16 foi então reduzida. Para esta redução, a variável tempo foi fixada em seu nível superior (+1), resultando na equação 17. A superfície de resposta descrita pela equação 17 é apresentada na Figura 13. É possível observar que teores superiores a 30% (m/m) de lignina no bagaço poderiam ser obtidos aumentando a temperatura e a concentração de ácido durante o pré-tratamento. As condições experimentais que levariam a estes maiores teores de lignina no bagaço são ilustradas pela região demarcada em branco na Figura 13.

$$T_L = 31,11 + 1,82A - 1,59A^2 + 1,48C - 0,99C^2 + 0,95AC \quad (17)$$

Figura 13 – Teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar em função da concentração de ácido e temperatura empregada durante o pré-tratamento.

5.2.4. Validação dos modelos propostos

Em pré-tratamento do bagaço de cana *in natura* nas condições de 2% (m/v) de ácido sulfúrico e temperatura de 150 °C por 30 minutos, os modelos propostos mencionados anteriormente (equações 13, 15 e 17) predisseram a obtenção de uma amostra de bagaço pré-tratado com os teores de celulose, hemicelulose e lignina variando entre 53,2 e 65,2% (m/m), 0 e 10,0% (m/m) e 29,6 e 34,6% (m/m), respectivamente.

Com a finalidade de comprovar estas previsões e concluir as análises estatísticas, foram realizados dois experimentos adicionais nas condições supramencionadas. Conforme pode ser observado na Tabela 12, os resultados obtidos nestes dois experimentos adicionais validaram os modelos propostos, uma vez que os teores de celulose, hemicelulose e lignina nos bagaços pré-tratados foram compatíveis com os valores preditos pelos modelos empíricos.

Tabela 12 – Composição química dos bagaços, obtidos após o pré-tratamento com 2% (m/v) de ácido sulfúrico, por 30 minutos à 150 °C

Exp.	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ácido (% m/v)	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)	Balanço (%)
1	150	30	2,0	56,52	8,79	29,93	1,73	96,98
2	150	30	2,0	56,70	8,34	30,67	2,37	98,09

5.2.5. Superposição das curvas de nível descritas pelos modelos propostos

As curvas de nível descritas pelas equações que relacionam os teores de hemicelulose, celulose e lignina no bagaço pré-tratado, com a temperatura, tempo de residência e concentração de ácido foram sobrepostas (Figura 14). O aumento da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico maximiza a solubilização da hemicelulose e, conseqüentemente, enriquece a fração sólida resultante do pré-tratamento em celulose e lignina. Estima-se que estas condições mais drásticas de pré-tratamento também favorecerão a hidrólise enzimática da celulose devido à remoção da hemicelulose; e à redistribuição da lignina (HIMMEL et al., 2007; KABEL et al., 2007; LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007; LLOYD; WYMAN, 2005; SCHELL et al., 2004).

Face ao exposto, é importante ressaltar que o teor de hemicelulose está inversamente relacionado com a eficiência de sacarificação enzimática da celulose contida em materiais lignocelulósicos pré-tratados com ácidos diluídos. Por exemplo, Grohmann, Torget e Himmel (1986) observaram que, quanto maior a eficiência na remoção da fração hemicelulósica da palha de trigo pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, maior foi a digestibilidade enzimática da celulose do material. Porém, nenhuma das condições de pré-tratamento empregadas por estes autores foi capaz de remover completamente a hemicelulose da palha de trigo.

Figura 14 – Superposição das curvas de nível que relacionam os teores de hemicelulose, celulose e lignina do bagaço pré-tratado com a temperatura e com a concentração de ácido utilizadas no pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 30 minutos.

5.3. Definição das condições de hidrólise enzimática

5.3.1. Caracterização dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos comerciais, denominados extrato I e extrato II, foram caracterizados quanto às atividades de enzimas hidrolíticas, fenoloxidativas e quanto ao teor de proteínas (Tabela 13). Em geral, as atividades enzimáticas encontradas nos extratos I e II diferiram substancialmente. Porém, ambos os extratos avaliados apresentaram um complexo celulolítico completo, além de atividades expressivas de xilanases, sendo então recomendados para a sacarificação de materiais lignocelulósicos pré-tratados com ácido sulfúrico diluído.

Primeiramente, pode ser observado que atividade de celulase total no extrato II foi de $93,5 \pm 9,2$ FPU/mL, enquanto que o extrato I apresentou atividade bem inferior ($54,0 \pm 0,6$ FPU/mL). É facilmente encontrado na literatura uma vasta quantidade de extratos enzimáticos destinados à sacarificação de materiais lignocelulósicos, os quais exibem

valores distintos de atividade enzimática de celulase total. Como por exemplo, Kovacs et al. (2009) encontraram atividade de celulase total similar à do extrato I no extrato Celluclast 1.5L (56,2 FPU/mL). No entanto, em comparação com os dados mencionados anteriormente, Martins et al. (2008) observaram atividade enzimática superior (110,2 FPU/mL) no extrato Celluclast 1.5L FG. Por outro lado, estes autores também encontraram menores atividades de endoglucanase, β -glicosidase e celobiase, quando comparadas àquelas determinadas em ambos os extratos usados no presente estudo. No extrato enzimático I foi observada atividades de 2.643,0 UCMC/mL de endoglucanase, 38,4 UI/mL de exoglucanase, 93,0 UCB/mL de celobiase e 395,0 UI/mL de β -glicosidase, enquanto que o extrato II exibiu atividades de 925,0 UCMC/mL, 98,0 UI/mL, 115,8 UCB/mL e 139,0 UI/mL para as mesmas enzimas, respectivamente.

Tabela 13 – Determinação das atividades enzimáticas e teor de proteínas dos extratos enzimáticos I e II.

	Extrato I	Extrato II
<i>Celulase total (FPU/mL)</i>	54,0 $\pm$ 0,6*	93,5 $\pm$ 9,2*
<i>Endoglucanase (UCMC/mL)</i>	2643,0	925,0
<i>Exoglucanase (UI/mL)</i>	38,4	98,0
<i>Celobiase (UCB/mL)</i>	93,0	115,8
<i>β-Glicosidase (UI/mL)</i>	395,0	139,0
<i>Xilanase (UI/mL)</i>	1280,6	1249,0
<i>Manganês Peroxidase (UI/mL)</i>	-	-
<i>Lacase (UI/mL)</i>	-	-
<i>Lignina peroxidase (UI/mL)</i>	-	-
<i>Proteínas (mg/mL)</i>	105,2 $\pm$ 6,6*	152,45 $\pm$ 10,0*

* desvio padrão foi calculado a partir de triplicatas; - = atividade enzimática não detectada.

Pode-se observar que os diferentes extratos comerciais caracterizados apresentam maiores atividades de β -glicosidase, em comparação às atividades de celobiase (Tabela 13). Porém, no extrato enzimático I fica evidente a maior diferença entre as atividades de β -glicosidase e celobiase (4,25 vezes), comparada aquela encontrada no extrato enzimático II (1,20 vezes). A diferença entre atividades de β -glicosidase e celobiase nos extratos enzimáticos pode ser explicada pela existência de três classes de β -glicosidases: i) celobiase strictu sensu, essa enzima que cliva apenas celobiose e não possui ação em aril- β -glicosídeos, ii) β -glicosidases, as que possuem ampla especificidade em relação ao grupo não sacarídeo da molécula, e iii) aril- β -glicosidases, que clivam apenas β -glicosídeos nos quais o grupo não sacarídeo é um aril-álcool (por exemplo, fenol, *p*-nitrofenol, saligenina e

6-bromo-2-naftol) (SHARROCK, 1988). Na hidrólise enzimática da celulose contida em materiais lignocelulósicos, entretanto, a atividade celobiásica é realmente a mais importante já que apenas a molécula de celobiose é o substrato naturalmente encontrado.

Como mencionado anteriormente, foram encontradas atividades expressivas de xilanases nos dois extratos enzimáticos comerciais. Atividades de 1.280,6 e 1.249,0 UI/mL de xilanases, foram observadas nos extratos I e II, respectivamente. No extrato enzimático comercial Celluclast 1.5L FG, foi possível observar atividade similar de xilanase (1.232,88 UI/mL) (MARTINS et al., 2008). A suplementação de xilanases aos complexos celulásicos tem se mostrado uma alternativa com potencial para aumentar os rendimentos de conversão enzimática da celulose de materiais lignocelulósicos pré-tratados com ácidos diluídos; as xilanases atuam na hidrólise da hemicelulose remanescente no material após o pré-tratamento, aumentando a acessibilidade das enzimas celulolíticas à celulose (ÖHGREN et al., 2007; SAHA et al., 2005).

A quantidade de proteínas nos extratos enzimáticos I e II diferiu consideravelmente; o extrato II apresentou um maior teor de proteínas, em relação aquele encontrado no extrato I ($152,45 \pm 10,0$ mg/mL e $105,2 \pm 6,6$ mg/mL, respectivamente). Por sua vez, um extrato enzimático amplamente utilizado para a sacarificação de materiais lignocelulósicos apresentou um teor de proteínas muito inferior (27,0 mg/mL) aos extratos utilizados no presente estudo (MUSSATTO et al., 2008).

A atividade de fenoloxidasas (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase) não foi observada em nenhum dos extratos avaliados. Os fungos do gênero *Trichoderma*, em geral, não são conhecidos como potenciais e/ou grandes produtores de fenoloxidasas (SAPARRAT et al., 2002; TANAKA; ITAKURA; ENOKI, 2000). Entretanto, alguns trabalhos relatam a capacidade de linhagens de *Trichoderma* sp. em produzir enzimas oxidativas, principalmente lacases, em baixas quantidades (ASSAVANIG et al., 1992; GOCHEV; KRASTANOV, 2007; HOLKER; DOHSE; HÖFER, 2002). Por outro lado, muitos trabalhos da literatura reportam diferentes espécies do gênero *Aspergillus* como produtoras de lacases (LAW; TIMBERLAKE, 1980), manganês peroxidases (KANAYAMA; SUZUKI; KAWAI, 2002) e lignina peroxidases (AHAMMED; PREMA, 2002). Esse gênero também tem sido frequentemente utilizado na expressão heteróloga de genes, principalmente de fungos basidiomicetos, responsáveis pela síntese dessas fenoloxidasas (CONESA; HONDEL; PUNT, 2000; TÉLLEZ-JURADO et al., 2006).

5.3.2. Uso dos extratos enzimáticos para a hidrólise de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada com H_2SO_4 diluído

Os dois extratos enzimáticos comerciais, previamente caracterizados, foram utilizados para hidrolisar uma amostra do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada com H_2SO_4 diluído. Com o objetivo de correlacionar o teor de sólidos, a carga enzimática e a carga de surfactante (Tween 20) com a conversão de celulose, foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^3 completos.

A conversão de celulose variou de acordo com a condição de hidrólise empregada e com o extrato enzimático utilizado (Tabela 14). Como pode ser observado, em 24 horas de hidrólise enzimática a conversão de celulose variou entre 27,5 e 47,7%, utilizando o extrato enzimático I. Para o extrato II a variação observada na digestão da celulose foi ainda maior devido à variação nas condições de hidrólise, entre 15,9 e 48,8%. Os menores valores de conversão da celulose, independente do extrato enzimático, foram obtidos na condição de hidrólise em que se empregou a menor carga enzimática (1,91 FPU/g de bagaço pré-tratado). Esses resultados demonstram a importância da carga enzimática na sacarificação da celulose contida em materiais lignocelulósicos.

Em média, a conversão de celulose não diferiu substancialmente quando os extratos I ou II foram utilizados, durante os respectivos tempos de hidrólise. É possível observar que a maior parte da conversão total de celulose alcançada durante o experimento de hidrólise (superior a 66,0%), acontece nas primeiras 24 horas. Por exemplo, ao final das 168 horas de hidrólise, foi observada uma média de 57,3% de conversão de celulose, sendo que uma média de 38,0% foi obtida nas primeiras 24 horas utilizando o extrato I. Enquanto que o extrato II apresentou uma conversão média de 53,7% após 168 horas, e 37,3% nas 24 horas iniciais de hidrólise.

Semelhante aos resultados obtidos em 24 horas, as maiores variações na conversão de celulose em 72 e 168 horas de hidrólise foram exibidas pelo extrato II (23,9-54,5% e 29,1-63,6%, respectivamente). Enquanto que a conversão de celulose pelo extrato I apresentou variação na faixa de 37,8 a 54,7% em 72 horas; em 168 horas, a amplitude observada foi entre 41,5 e 63,0%.

Tabela 14 – Digestibilidade enzimática da celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nos períodos de 24, 72 e 168 horas, pelos extratos enzimáticos I e II

Exp.	<i>Conversão de Celulose (%)</i>					
	Extrato I			Extrato II		
	24h	72h	168h	24h	72h	168h
1	29,3	45,2	47,3	30,2	39,9	46,1
2	34,5	42,8	58,0	28,8	36,8	44,4
3	30,2	48,7	58,7	37,8	43,9	46,5
4	42,5	49,2	62,0	40,8	46,2	55,1
5	38,9	44,9	55,2	38,1	45,8	55,4
6	36,7	41,1	58,9	36,8	46,6	57,6
7	36,6	54,2	62,4	48,8	53,1	63,6
8	47,7	54,7	61,9	48,1	54,4	62,9
9	43,5	52,7	60,7	38,6	47,0	55,4
10	35,6	47,4	60,6	36,7	45,8	53,8
11	30,0	50,0	50,6	41,1	41,5	56,4
12	33,2	47,9	61,6	41,6	50,7	65,0
13	44,6	51,2	63,0	37,0	48,0	57,1
14	27,5	37,8	47,1	15,9	23,9	29,1
15	44,7	50,5	62,9	40,4	48,0	56,1
16	30,8	38,0	41,5	34,5	41,6	48,8
17	45,0	53,9	62,7	40,1	47,1	57,1
18	41,3	49,2	55,1	36,2	45,3	55,0
19	42,9	50,7	53,8	38,1	46,2	54,6
20	44,1	54,0	61,1	35,4	46,8	53,5

Devido ao comportamento observado e discutido anteriormente, escolheu-se analisar estatisticamente os resultados de conversão de celulose obtidos pelos dois extratos enzimáticos em 24 horas de hidrólise, e assim correlacionar a digestibilidade enzimática da celulose com as variáveis independentes propostas na matriz do planejamento fatorial.

As análises de variância dos modelos propostos para explicar a conversão de celulose em 24 horas pelos extratos enzimáticos I e II estão expressas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Tendo a conversão de celulose como resposta, os três fatores avaliados no planejamento experimental foram significativos, quando o extrato enzimático I foi

utilizado. Por outro lado, o teor de sólidos não foi significativo para o planejamento experimental utilizando o extrato II.

Tabela 15 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da conversão de celulose pelo extrato enzimático I em 24 horas.

CV	GL	SQ	MQ	F _{calc}	p
Modelo	3	481,30	160,43	9,12	0,0009
<i>A</i>	1	151,84	151,84	8,64	0,0096
<i>B</i>	1	163,0	163,0	9,27	0,0077
<i>C</i>	1	166,45	166,45	9,47	0,0072
Resíduo	16	281,35	17,58		
<i>Falta de ajuste</i>	11	124,06	11,27	0,36	0,9274
<i>Erro padrão</i>	5	157,28	31,45		
Total	19	762,64			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; A: teor de sólidos; B: carga enzimática; C: carga de surfactante. R²: 0,63.

Tabela 16 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da conversão de celulose pelo extrato enzimático II em 24 horas

CV	GL	SQ	MQ	F _{calc}	p
Modelo	3	766,84	255,61	28,57	<0,0001
<i>B</i>	1	509,54	509,54	56,96	<0,0001
<i>C</i>	1	134,92	134,92	15,08	0,0013
<i>B</i> ²	1	122,38	122,38	13,68	0,0019
Resíduo	16	143,13	8,95		
<i>Falta de ajuste</i>	11	122,16	11,11	2,65	0,1462
<i>Erro padrão</i>	5	20,97	4,19		
Total	19	909,97			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; B: carga enzimática; C: carga de surfactante; B²: termo quadrático. R²: 0,84.

A carga enzimática utilizada influencia diretamente nos rendimentos de sacarificação de materiais lignocelulósicos. Kaar e Holtzaple (1998) observaram diferenças consideráveis na sacarificação de forragem de milho pré-tratada em função da carga enzimática (entre 1 e 15 FPU/g de biomassa) e que também torna-se necessário explorar o efeito da carga enzimática a ser utilizada, pois existe um limite a partir do qual a maior adição de enzimas não implica em maior sacarificação. Por exemplo, esses autores

obtiveram percentuais de sacarificação semelhantes com 10 e 15 FPU/g de material. Comportamento semelhante também foi apresentado por Zheng et al. (2009), os quais não observaram diferença significativa na sacarificação de *Leymus triticoides* (gramínea selvagem) pré-tratada com ácido sulfúrico diluído utilizando 60, 100 ou 150 FPU/g de material.

Com madeira de oliva pré-tratada por explosão a vapor ou autohidrólise, o teor de sólidos (2-10%) não influenciou na conversão da celulose contida no material, nas primeiras 48 horas de hidrólise enzimática (CARA et al., 2007). De acordo com estes autores, o aumento da concentração inicial de substrato na hidrólise enzimática levaria a uma solução com maior concentração de glicose, o que tornaria possível aumentar a concentração de etanol na mistura após a fermentação. Entretanto, é preciso cuidado ao aumentar o teor de sólidos durante a digestão enzimática, uma vez que concentrações excessivas de substrato podem dificultar a homogeneização do material durante a hidrólise. Outro fator muito importante é que a alta concentração de glicose liberada no meio reacional, pode resultar na inibição das enzimas celulolíticas.

A adição de surfactantes durante a hidrólise enzimática tem se mostrado benéfica no processo de conversão da celulose, devido a redução na adsorção improdutiva das enzimas celulolíticas à lignina (BERLIN et al., 2005; LU et al., 2002) e ao aumento da estabilidade das enzimas contra desnaturação (KAAR; HOLTZAPPLE, 1998). Eriksson, Börjesson e Tjerneld (2002) observaram um aumento de 63% na conversão da celulose de madeira de abeto pré-tratada por explosão a vapor ao suplementarem a mistura reacional com 5 g/L de Tween 20. Estes autores também mostraram que foi possível reduzir em 50% a carga enzimática e obter os mesmos rendimentos na presença de 2,5 g/L Tween 20. Yang e Wyman (2006) demonstraram o aumento na hidrólise enzimática da forragem de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído, de 82,3% para 91,7%, apenas com a adição de albumina bovina à mistura reacional. O aumento no percentual de sacarificação foi atribuído à adsorção da albumina bovina à molécula de lignina, o que acarretou na diminuição da adsorção improdutiva das celulasas. Em uma recente análise econômica realizada no contexto que envolve a produção de etanol a partir de um tipo de pinheiro, o uso de surfactante durante a hidrólise enzimática foi apontado como uma boa estratégia para a redução no custo do processo, devido a vantagem de permitir reciclar as enzimas (TU; SADDLER, 2010).

Os modelos propostos para explicar o efeito das variáveis independentes na digestão enzimática da celulose em 24 horas pelos extratos enzimáticos I e II estão

expressos nas equações 18 e 19, respectivamente. O modelo proposto para conversão de celulose em 24 horas pelo extrato I é significativo e não apresenta falta de ajuste, porém não possui uma capacidade de predição muito boa (Tabela 15). Por outro lado, o modelo proposto para explicar a eficiência de conversão de celulose pelo extrato II é significativo, não apresenta falta de ajuste e possui capacidade de predição mais apurada (Tabela 16).

$$ICc_{24h} = 37,98 + 3,23A + 3,35B + 3,38C \quad (18)$$

$$IICc_{24h} = 39,11 + 5,92B - 2,55B^2 + 3,04C \quad (19)$$

Onde ICc_{24h} e $IICc_{24h}$ representam as conversões de celulose em glicose obtidas em 24 horas de hidrólise com os extratos I e II, respectivamente, em função dos valores codificados de teor de sólidos (A), carga enzimática (B) e carga de Tween 20 (C).

Para elaboração dos gráficos de superfície de resposta, foram utilizadas as equações 19 e 20. A equação 20 corresponde a redução da equação 18, onde o teor de sólidos foi fixado em seu nível superior (+1,81). Por outro lado, não foi preciso reduzir a equação 19, uma vez que o teor de sólidos não influenciou na conversão de celulose, quando o extrato enzimático II foi utilizado. As superfícies de resposta correspondentes a conversão de celulose pelos extratos I e II estão respectivamente apresentadas nas Figuras 15 e 16.

Os comportamentos de hidrólise enzimática foram completamente diferentes entre os dois extratos enzimáticos avaliados (24 horas). Quando o extrato I é utilizado, fica evidente que é possível aumentar a conversão de celulose com o aumento da carga enzimática e de Tween 20, pois o gráfico de superfície de resposta não apresentou curvatura (Figura 15). Entretanto, pode ser observada uma curvatura na região de estudo (Figura 16), quando se utilizou o extrato enzimático II. Ou seja, em determinado ponto do gráfico, pode se observar que o aumento na carga enzimática não acarretaria em aumento na conversão de celulose. Os dados são similares aqueles, comentados anteriormente (KAAR; HOLTZAPPLE, 1998; ZHENG et al., 2009), onde observou-se que a partir de uma dada carga de enzima não se consegue aumentar a sacarificação de materiais lignocelulósicos, mesmo com o aumento da carga enzimática. Contudo, o gráfico mostra que o percentual de conversão de celulose poderia ser aumentado se a carga de Tween 20 fosse aumentada ainda mais.

$$ICc_{24h} = 43,82 + 3,35B + 3,38C \quad (20)$$

Figura 15 – Superfície de resposta mostrando o efeito da carga enzimática e carga de Tween 20 na conversão de celulose em 24 horas pelo extrato enzimático I.

Figura 16 – Superfície de resposta mostrando o efeito da carga enzimática e carga de Tween 20 na conversão de celulose em 24 horas pelo extrato enzimático II.

Independentemente do extrato enzimático utilizado, do tempo e das condições de hidrólise empregadas, não foi observada a presença de celobiose no meio reacional. Com isso, pode-se dizer que os extratos comerciais I e II possuem atividade enzimática suficiente de celobiase, a ponto de não acumular celobiose. Esse comportamento torna-se muito interessante, pois sabe-se que a molécula de celobiose é responsável por inibir fortemente a atividade das celulasas, prejudicando significativamente os rendimentos de sacarificação (ZHAO et al., 2004).

Durante a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, a presença de xilose no meio reacional foi observada independentemente do tempo, das condições de hidrólise e do extrato enzimático (dados não apresentados). A solubilização da xilose está relacionada com a ação das xilanases presentes nos extratos enzimáticos, as quais atuam sobre a fração de hemicelulose remanescente no bagaço pré-tratado. As máximas concentrações de xilose foram obtidas após 168 horas de hidrólise enzimática, com os valores de 2,0 g/L e 2,3 g/L, pelos extratos enzimáticos I e II, respectivamente.

Tendo em vista que a busca por linhagens de leveduras com capacidade de fermentar diferentes açúcares tem sido bastante intensa, a xilose obtida na digestão enzimática do bagaço pré-tratado pode ser uma fonte adicional de açúcar fermentável para incrementar a produção de etanol. Como um exemplo, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, geneticamente modificadas, possuem capacidade de fermentar xilose a etanol (MATSUSHIKA et al., 2009). Além disso, uma linhagem de *Kluyveromyces* sp. isolada de amostras de solo (aterro de uma usina de açúcar) mostrou ser capaz de produzir etanol a partir de diferentes fontes de carbono, como: glicose, xilose, manose, galactose, lactose, sacarose e celobiose (KUMAR et al., 2009).

5.3.2.1. Validação dos modelos propostos

Experimentos adicionais foram realizados com intuito de validar os modelos propostos para a sacarificação enzimática da celulose do bagaço pré-tratado com H₂SO₄ diluído, em 24 horas de hidrólise. Para isso, utilizando os extratos enzimáticos I e II, três experimentos em duplicatas foram realizados (Tabela 17). Conforme pode ser observado, os resultados obtidos nestes experimentos adicionais validaram os respectivos modelos, pois os valores obtidos de digestão de celulose foram compatíveis aos valores preditos.

Tabela 17 – Níveis das variáveis independentes, valores preditos pelos modelos, e valores de conversão de celulose do bagaço de cana pré-tratado com H₂SO₄ diluído, em 24 horas de hidrólise

	Sólido (% m/v)	Enzima (FPU/g)	Surfactante (g/g)	Conversão de celulose (%) *	Intervalo de predição (%)
<i>Extrato I</i>	1,19	1,91	0	9,3±0,6	8,27 - 31,63
	3	20	0,05	34,2±0,0	28,87 - 47,09
	4,81	38,09	0,1	44,5±0,2	44,33 - 67,68
<i>Extrato II</i>	1,19	1,91	0	7,6±0,2	5,93 - 23,16
	3	20	0,05	33,1±0,2	32,52 - 45,69
	4,81	38,09	0,1	43,4±3,8	38,38 - 55,6

* desvio padrão foi calculado a partir de duplicatas.

Paralelamente à determinação do percentual de conversão de celulose, foi monitorada a concentração de açúcares fermentescíveis (glicose + xilose), ao longo de 7 dias de hidrólise. Conforme pode ser observado na Figura 17, independentemente do extrato enzimático utilizado e das condições experimentais, a maior parcela dos açúcares fermentescíveis foi obtida nas primeiras 24 horas de hidrólise. Contudo, os incrementos obtidos prolongando-se as hidrólises até 72 horas foram apreciáveis. Após as 168 horas de sacarificação conduzidas com maiores níveis das variáveis independentes (+1,81), a produção média de açúcares fermentescíveis chegou a 20,8 e 21,3 g/L, respectivamente, para os extratos I e II.

Por sua vez, as concentrações de xilose determinadas nos experimentos de validação dos modelos foram relativamente baixas. Por exemplo, as máximas concentrações de xilose foram observadas nos experimentos em que os níveis superiores (+1,81) das variáveis independentes foram empregados, apenas 3,9 e 3,7 g/L (168 horas de hidrólise; extratos I e II, respectivamente). Além de poder ser destinada à produção de etanol combustível, essa pentose também poderia ser utilizada para a produção de insumos com maior valor agregado. Um exemplo é o xilitol (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007), um adoçante (SILVA et al., 1994) eficiente na prevenção de cáries (MÄKINEN, 2000) e no combate à otite aguda (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2001).

Figura 17 – Produção de açúcares fermentescíveis (glicose + xilose) determinadas durante os experimentos de validação dos modelos propostos para a sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com os extratos enzimáticos I e II. As variáveis de hidrólise tiveram os seus níveis simultaneamente fixados nos níveis inferiores (-1,81), médios (0) ou superiores (+1,81).

5.3.2.2. Uso de maiores teores de sólidos

Adicionalmente, um experimento foi conduzido para avaliar o efeito do aumento do teor de sólidos para valores ainda mais elevados, comparados com aqueles previamente avaliados nos planejamentos experimentais 2³. Assim, o teor de sólidos no início da sacarificação foi variado de 4 a 12%, e a conversão de celulose e a concentração de açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) foram as variáveis resposta. Para este experimento, o extrato enzimático II foi utilizado (10 FPU/g de bagaço, equivalente a 16,3 mg proteína/g bagaço), uma vez que o modelo proposto para explicar os resultados obtidos de conversão de celulose com esse extrato apresentou melhor capacidade de predição, com um R^2 de 0,84. A carga de surfactante foi fixada em 0,05 g/g de bagaço pré-tratado.

De acordo com os resultados (Figura 18A), a conversão de celulose variou entre 25,9 e 28,6% em 24 horas de hidrólise, não sendo observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os rendimentos médios de sacarificação em função dos teores de sólidos avaliados. Similar aos resultados obtidos anteriormente (item 5.3.2), a maior fração da conversão de celulose em glicose também aconteceu nas primeiras 24 horas de hidrólise. Entretanto, para 48 horas de hidrólise, a conversão de celulose foi significativamente

menor no experimento com o máximo teor de sólidos avaliado. Considerando que, após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, o bagaço foi exaustivamente lavado com água destilada, a menor conversão de celulose não poderia ser explicada pela presença de inibidores gerados durante o pré-tratamento (PANAGIOTOU; OLSSON, 2007). Desta forma, o decréscimo na conversão de celulose do bagaço poderia estar relacionado com a menor homogeneização da mistura reacional, comprometendo a agitação e consequentemente a ação das enzimas hidrolíticas (CARA et al., 2007). Em relação a conversão de celulose em 72 horas de hidrólise, não foram observadas diferenças significativas entre os rendimentos médios de celulose quando o teor inicial de sólidos foi variado entre 4, 6, 8 e 10%; porém a conversão no meio com 12% de sólidos foi significativamente menor. Zheng et al. (2009), por exemplo, observaram uma queda de 16% na hidrólise enzimática de uma gramínea selvagem pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, em função do aumento de 4 para 12% no teor inicial de sólidos.

Figura 18 – Influência do teor de sólidos na eficiência da conversão de celulose (A) e na concentração de açúcares fermentescíveis (B).

5.4. Efeito das condições de pré-tratamento na sacarificação enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ diluído

Como mostrado e discutido anteriormente (item 5.2), as diferentes condições de pré-tratamento do bagaço *in natura* com ácido sulfúrico diluído geraram amostras com variações nos seus percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas (Tabela 5). Para avaliar a existência de uma possível correlação entre as condições de pré-tratamento e a digestibilidade do material pré-tratado, essas amostras foram submetidas à hidrólise enzimática (Tabela 18). O presente experimento foi conduzido com 10% de teor inicial de sólidos, tendo em vista que essa condição de hidrólise enzimática não comprometeu a eficiência da conversão de celulose em glicose e levou a um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, glicose e xilose (item 5.3.2.2).

A conversão de celulose das amostras de bagaço diferiu de acordo com as condições empregadas de pré-tratamento (Tabela 18). Em 24 horas de hidrólise, a conversão de celulose nas amostras pré-tratadas variou de 16,5 a 33,9%. Por sua vez, os rendimentos de sacarificação enzimática observados nos tempos de 48 e 72 horas variaram, respectivamente, entre 18,1 e 40,7%, e entre 18,4 e 45,4%. É importante enfatizar também que o bagaço de cana *in natura* foi menos susceptível à hidrólise enzimática do que as amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído.

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é uma importante etapa na obtenção de açúcares fermentescíveis via sacarificação enzimática, pois é responsável por alterar as características estruturais, aumentando significativamente a digestibilidade enzimática desses materiais (ALVIRA et al., 2010). Além disso, sabe-se que o rendimento da sacarificação enzimática é afetado pela composição e proporção dos constituintes estruturais desses materiais (MUSSATTO et al., 2008). Contudo, os rendimentos de sacarificação enzimática da celulose obtidos no presente estudo foram modestos quando comparados com os resultados apresentados por Wang et al. (2010) e Redding et al. (2010), que demonstraram a possibilidade de se atingir rendimentos superiores a 90% após pré-tratamentos tanto em meio alcalino quanto em meio ácido.

Tabela 18 – Conversão de celulose e concentração de açúcares fermentescíveis (glicose + xilose) obtidos durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após as diferentes condições de pré-tratamento com H₂SO₄ diluído

Exp.	Conversão de celulose (%)			Açúcares fermentescíveis (g/L)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1	16,5	18,2	18,4	10,7	12,1	12,4
2	24,1	26,9	29,6	17,6	19,6	21,6
3	20,9	24,3	25,0	14,6	17,5	17,8
4	30,0	38,9	43,8	20,1	26,1	29,4
5	16,7	18,1	19,4	12,1	13,4	14,5
6	29,8	34,5	38,8	21,9	25,4	28,7
7	24,1	27,4	29,8	17,3	19,7	21,6
8	33,0	40,0	45,4	22,6	27,3	31,0
9	31,1	38,2	41,6	22,7	28,0	30,4
10	32,6	34,1	43,1	21,9	22,8	28,9
11	33,2	40,7	43,4	23,3	28,7	30,8
12	16,7	22,0	22,1	11,6	15,3	15,5
13	29,0	37,7	42,5	19,8	25,9	29,2
14	24,0	27,0	29,7	17,6	19,9	21,9
15	30,2	36,2	40,0	22,1	26,5	29,5
16	18,5	19,7	20,9	12,1	12,9	13,8
17	33,9	38,8	42,1	23,2	26,6	28,9
18	32,1	37,6	40,7	21,8	25,8	27,8
19	31,1	36,1	39,4	20,9	25,0	27,5
20	25,5	38,5	43,6	17,1	25,9	29,6
<i>in natura</i>	10,6	12,0	12,6	10,6	12,2	12,9

Para a obtenção de uma maior eficiência na sacarificação enzimática da celulose contida em materiais pré-tratados com ácidos diluídos, frequentemente são utilizadas condições mais drásticas de pré-tratamento. Tais condições resultam, entretanto, em maior degradação dos açúcares solubilizados no hidrolisado hemicelulósico. Nesse contexto, a suplementação dos extratos celulásicos com xilanases durante a hidrólise enzimática é considerada uma estratégia de grande potencial, pois tais enzimas atuam removendo a hemicelulose residual presente nos sólidos pré-tratados em condições operacionais mais

brandas, aumentando o rendimento de recuperação dos açúcares totais (ÖHGREN et al., 2007).

A Tabela 18 apresenta também as concentrações dos açúcares fermentescíveis resultantes da hidrólise enzimática do bagaço *in natura* e das amostras de bagaço pré-tratadas sob as diferentes condições experimentais. Como pode ser observado, a menor concentração de açúcares fermentescíveis foi obtida na hidrólise enzimática do bagaço *in natura* (10,6 g/L) em 24 horas. Em contrapartida, a máxima concentração desses açúcares (glicose + xilose) foi de 31,0 g/L, ao final de 72 horas de hidrólise enzimática do bagaço proveniente do experimento 8. Teoricamente, se os rendimentos de sacarificação enzimática fossem próximos de 100%, poderiam ser obtidos hidrolisados com concentrações de açúcares fermentescíveis superiores a 60 g/L.

5.4.1. Elaboração do modelo empírico para predição da eficiência de sacarificação enzimática de celulose em glicose

Os resultados de conversão de celulose obtidos no tempo de 24 horas foram analisados estatisticamente para correlacionar, por meio de um modelo empírico, a eficiência da digestibilidade enzimática da celulose com as variáveis independentes de pré-tratamento, temperatura, tempo de residência e concentração de ácido. A análise de variância do modelo proposto está expressa na Tabela 19, podendo-se observar que a conversão de celulose foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelas três variáveis avaliadas no planejamento experimental; os efeitos determinados por elas foram decrescentes na seguinte ordem: temperatura > concentração de ácido > tempo de residência. Salienta-se que o modelo proposto é significativo, não apresenta falta de ajuste e possui boa capacidade de predição.

Tabela 19 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da conversão enzimática de celulose em função das condições de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	F _{calc}	p
Modelo	4	553,65	138,41	13,97	<0,0001
<i>A</i>	1	260,93	260,93	26,34	0,0001
<i>B</i>	1	72,94	72,94	7,36	0,0160
<i>C</i>	1	99,45	99,45	10,04	0,0064
<i>A</i> ²	1	120,32	120,32	12,15	0,0033
Resíduo	15	148,60	9,91		
<i>Falta de ajuste</i>	10	109,33	10,93	1,39	0,3757
<i>Erro padrão</i>	5	39,27	7,85		
Total	19	702,25			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; A: temperatura; B: tempo de residência; C: concentração de ácido; A²: termo quadrático. R²: 0,79.

O modelo que explica o efeito das variáveis independentes na conversão enzimática da celulose em 24 horas de hidrólise (equação 21) teve o tempo de residência fixado em seu nível superior (+1), dando origem à equação 22.

$$C_{C24h} = 28,78 + 4,57A - 3,42A^2 + 2,42B + 2,82C \quad (21)$$

$$C_{C24h} = 31,20 + 4,57A - 3,42A^2 + 2,82C \quad (22)$$

Onde C_{C24h} é a eficiência de conversão enzimática de celulose em glicose obtida em 24 horas de hidrólise, em função dos valores codificados de temperatura (A), tempo de residência (B) e concentração de ácido (C) empregados no pré-tratamento.

O gráfico de superfície de resposta que mostra a conversão enzimática de celulose em 24 horas de hidrólise como função das condições de pré-tratamento empregadas foi elaborado a partir da equação 22, sendo apresentado na Figura 19. Nesta Figura, pode-se observar um aumento considerável na conversão de celulose com o aumento da temperatura e da concentração de ácido utilizadas durante o pré-tratamento do bagaço. Como discutido anteriormente no item 5.2, o aumento da temperatura e da concentração de ácido no pré-tratamento também resultou em maior remoção da hemicelulose no bagaço (Figura 11).

Figura 19 – Superfície de resposta mostrando o efeito das condições de pré-tratamento (temperatura e concentração de ácido sulfúrico) na eficiência de conversão de celulose em glicose em 24 horas.

5.4.2. Validação do modelo proposto

O modelo proposto para conversão de celulose em função das condições de pré-tratamento (equação 22) prediz uma digestibilidade enzimática entre 30,5 e 37,1%, caso a amostra de bagaço de cana *in natura* seja pré-tratada com 2% (m/v) de ácido sulfúrico, à 150 °C, por 30 min. Para a validação desse modelo, duas amostras de bagaço pré-tratadas nas condições supramencionadas foram submetidas a 24 horas de hidrólise enzimática. O modelo proposto foi validado, uma vez que os valores obtidos de sacarificação da celulose (33,7 e 30,7%) foram compatíveis aos valores preditos pelo modelo empírico para conversão de celulose em 24 horas.

Além disso, a Tabela 20 também mostra os resultados de conversão de celulose e de açúcares fermentescíveis nos tempos de 48 e 72 horas de hidrólise enzimática. Por exemplo, em 48 horas de hidrólise foram obtidas 24,2 e 24,1 g/L de açúcares fermentescíveis, com os respectivos valores de conversão de celulose, 38,5 e 36,7%. Como

pode ser observado, os maiores rendimentos de sacarificação enzimática (42,9 e 41,4%) e produção de açúcares fermentescíveis (27,0 e 27,3 g/L) foram obtidos ao final de 72 horas.

Tabela 20 – Conversão de celulose e açúcares fermentescíveis obtidos após hidrólise enzimática de amostras de bagaço *in natura* pré-tratadas com 2% (m/v) de ácido sulfúrico, por 30 minutos à 150 °C

Exp.	Conversão de celulose (%)			Açúcares fermentescíveis (g/L)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1	33,7	38,5	42,9	21,2	24,2	27,0
2	30,7	36,7	41,5	20,2	24,1	27,3

5.4.3. Influência do fator de severidade combinada na eficiência de conversão enzimática de celulose em glicose

Os resultados percentuais de conversão de celulose obtidos no planejamento experimental foram plotados em função do fator de severidade combinada ($\log R_0$) a que a amostra foi submetida no pré-tratamento (Figura 20). Tais resultados concordam com dados apresentados na literatura (EWANICK; BURA; SADDLER, 2007; KÁLMÁN; VARGA; RÉCZEY, 2002; SCHELL et al., 2003), ao apontar a dificuldade em se estabelecer uma correlação entre a eficiência de digestibilidade enzimática da celulose e a severidade do pré-tratamento à que o material lignocelulósico foi submetido. Por exemplo, em 24 horas de hidrólise foram observadas eficiências de conversão de celulose iguais a 16,7 e 24,0% em amostras pré-tratadas sob condições que resultaram no mesmo valor de $\log R_0$, 0,52 (experimentos 5 e 14); por outro lado, para amostras pré-tratadas sob condições que resultaram em valores de $\log R_0$ iguais a 1,23 e 1,86 (experimentos 20 e 13, respectivamente), foram observadas eficiências de conversão de celulose iguais a 43,6 e 42,5%, respectivamente, em 72 horas de hidrólise (Tabela 19).

Figura 20 – Conversão de celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar em função do fator de severidade combinada do pré-tratamento.

5.4.4. Influência do teor de hemicelulose na eficiência de conversão enzimática da celulose em glicose

A conversão enzimática de celulose foi plotada em função do teor de hemicelulose residual contido nas diferentes amostras de bagaço de cana pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído. Conforme ilustrado na Figura 21, foi possível estabelecer boas correlações entre a conversão enzimática de celulose em glicose com o teor de hemicelulose residual presente no bagaço após o pré-tratamento, em 24, 48 e 72 horas de hidrólise enzimática. A conversão enzimática de celulose foi inversamente proporcional ao teor de hemicelulose residual presente no bagaço.

A remoção efetiva da fração hemicelulósica do material lignocelulósico previamente à sacarificação enzimática torna-se necessária, uma vez que a hemicelulose age como uma barreira física para as celulasas, diminuindo a acessibilidade dessas enzimas às fibras de celulose (CHANDRA et al., 2007). De fato, estudos comprovam que a hemicelulose contida no material influencia na digestibilidade enzimática da celulose (HSU et al., 2010; LIU et al., 2009; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). Como exemplo dessa influência, pôde-se observar que, após a total remoção da hemicelulose, a

eficiência de sacarificação melhorou significativamente (135%) comparada à digestibilidade do mesmo material *in natura* (LIAO et al., 2005).

Além disso, a influência da fração hemicelulósica na conversão de celulose ainda pode ser observada, uma vez que a adição de xilanases à hidrólise enzimática permite aumentar significativamente a sacarificação da celulose em materiais contendo quantidades significativas de xilana residual. As xilanases atuam na remoção da hemicelulose remanescente no material pré-tratado, diminuindo o efeito negativo desse componente estrutural na digestibilidade da celulose (GARCÍA-APARICIO et al., 2007; KUMAR; WYMAN, 2009).

Figura 21 – Conversão de celulose em função do teor de hemicelulose das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído.

5.5. Caracterização morfológica de amostras selecionadas, por microscopia eletrônica de varredura

Com a ajuda da microscopia eletrônica de varredura (Figura 22), procurou-se identificar as características morfológicas de diferentes amostras de bagaço, a saber: bagaços *in natura* e pré-tratados sob menor e maior fator de severidade combinada ($\log R_0$ de -1,76 e 1,91, respectivamente), antes e após as respectivas hidrólises enzimáticas.

Como pode ser observado, o bagaço *in natura* apresenta uma estrutura fibrosa, totalmente recoberta por células de parênquima, aparentemente (Figura 22A). Com o pré-tratamento brando, estas células foram removidas, expondo as fibras (Figura 22C). O pré-tratamento mais severo, responsável por remover maior quantidade de hemicelulose, não foi capaz de destruir a estrutura fibrosa do bagaço, porém diminuiu substancialmente o aspecto compacto, aumentando a área superficial do material (Figura 22E). De acordo com a literatura, pode-se obter um material ainda mais modificado quando são utilizados pré-tratamentos que visam à remoção de lignina (KRISTENSEN et al., 2008; MUSSATTO et al., 2008).

Alterações morfológicas nas amostras selecionadas de bagaço foram observadas também após 72 horas de digestão enzimática. Observou-se que após a hidrólise enzimática do bagaço *in natura*, apenas as células de parênquima foram hidrolisadas, exibindo uma estrutura visivelmente mais organizada (Figura 22B). Semelhante aos resultados de sacarificação da celulose do bagaço *in natura*, a sacarificação do bagaço pré-tratado sob condição branda foram baixas (Tabela 18), porém, dessa vez, a hidrólise enzimática iniciou uma leve alteração morfológica na amostra, sendo capaz de expor algumas estruturas fibrosas (Figura 22D). Em contrapartida, as modificações estruturais foram mais evidentes no bagaço pré-tratado sob condição severa e hidrolisado enzimaticamente (Figura 22F), justificando os maiores rendimentos de conversão de celulose alcançados com esta amostra.

As condições empregadas durante o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído estão diretamente relacionadas às modificações estruturais observadas nas amostras de bagaço de cana; estas, por sua vez, são determinantes nos rendimentos de hidrólise enzimática da celulose obtidos durante a sacarificação enzimática. Em geral, maiores rendimentos de sacarificação enzimática da celulose são alcançados quando a capacidade do pré-tratamento em modificar as características estruturais do bagaço de cana é maximizada. Assim, essas observações corroboram as afirmativas de que os pré-tratamentos, devido à remoção e/ou alteração dos constituintes estruturais, minimizam a barreira física encontrada pelas enzimas, aumentando a área superficial acessível a tais biocatalisadores (ALVIRA et al., 2010; CHANDRA et al., 2007; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; ÖHGREN et al., 2007).

Figura 22 – Estrutura morfológica do bagaço *in natura*, antes (A) e após hidrólise enzimática (B); bagaço submetido à pré-tratamento brando, antes (C) e após hidrólise enzimática (D); e bagaço submetido à pré-tratamento severo, antes (E) e após hidrólise enzimática (F). A hidrólise enzimática foi conduzida por 72 horas.

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a extração do bagaço com água seguida de etanol é eficaz para a extração de compostos não estruturais, que os extrativos interferem na quantificação de lignina, e que a variabilidade experimental associada à análise composicional é mínima quando o bagaço é extraído previamente com água e etanol.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído mostrou-se eficiente na remoção da hemicelulose contida no bagaço de cana-de-açúcar. As variáveis temperatura, concentração de H_2SO_4 e tempo de residência utilizadas durante o pré-tratamento influenciaram na composição relativa da fração sólida resultante (bagaço pré-tratado). Em termos quantitativos, a variável com maior poder de influência foi a temperatura, seguida pela concentração de ácido sulfúrico e pelo tempo de residência, respectivamente.

Os extratos enzimáticos comerciais I e II apresentaram complexos celulolíticos completos para a sacarificação da celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído. As três variáveis avaliadas (teor de sólidos, carga enzimática e carga de Tween 20) influenciaram significativamente na digestão da celulose nas primeiras 24 horas de hidrólise, utilizando o extrato I. A carga enzimática e a carga de Tween 20 influenciaram a sacarificação da celulose com o extrato II; podendo aumentar o teor de sólidos na hidrólise enzimática para 10 % (m/v), sem comprometer a conversão de celulose. Em termos quantitativos, a variável com maior poder de influência na conversão de celulose em 24 horas foi a carga enzimática, seguida pela carga de Tween 20.

As variáveis independentes utilizadas durante o pré-tratamento do bagaço (temperatura, concentração de H_2SO_4 e tempo de residência) influenciaram significativamente na digestibilidade enzimática da celulose. A variável com maior poder de influência na sacarificação da celulose foi a temperatura, seguida pela concentração de H_2SO_4 e pelo tempo de residência, respectivamente. Não foi possível obter uma boa correlação entre a digestibilidade enzimática da celulose e o fator de severidade combinada do pré-tratamento. A digestibilidade enzimática da celulose apresentou boa correlação com o teor de hemicelulose no bagaço.

O pré-tratamento altera a estrutura morfológica do bagaço de cana. A maior modificação na estrutura morfológica do bagaço resultou em maior rendimento de sacarificação enzimática da celulose.

REFERÊNCIAS

ABEDINIFAR, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 828-833, 2009.

ADLER, E.; Lignin chemistry-past, present and future. **Wood Science and Technology**, 169p, 1977.

AHAMMED, S.; PREMA, P. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 327-336, 2002.

ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T.I.; DALE, B.E. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1133-1141, 2005.

ALVES, A.L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Solubility of d-glucose in water and ethanol/water mixtures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 2166-2170, 2007.

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.

ASSAVANIG, A.; AMORNKITTICHAROEN, B.; EKPAISAL, N.; MEEVOOTISOM, V.; FLEGEL, T.W. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 198-202, 1992.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

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

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.L. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.B.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes – A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 163-170, 2005.

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

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BORASTON, A.B.; BOLAM, D.N.; GILBERT, H.J.; DAVIES, G.J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, p. 769-781, 2004.

BOUCHARD, A.; HOFLAND, G.W.; WITKAMP, G-J. Properties of sugar, polyol, and polysaccharide water–ethanol solutions. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 1838-1842, 2007.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1379, p. 381-390, 1998.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building. **New York: John Wiley & Sons Inc.** 653p, 1978.

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.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J.N. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 315-322, 2009.

CARA, C.; MOYA, M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1003-1009, 2007.

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.

CARRILLO, F.; LIS, M.J.; COLOM, X.; LÓPES-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3360-3364, 2005.

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

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

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 47-53, 2007.

CENBIO (Centro Nacional de Referência em Biomassa), Disponível em: www.cenbio.org.br. Acessado em: 20 jul. 2003.

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.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar 2010-2011**. Disponível em: www.conab.gov.br. Acessado em: 11 set. 2010.

CONESA, A.; HONDEL, A.M.J.J.V.D.; PUNT, P.J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3016-3023, 2000.

CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), Disponível em: www.ctcanavieira.com.br. Acessado em: 22 fev. 2010.

CUNHA, H.C.M. **Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos**. 1999. 101 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 259-290, 1987.

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

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.

EWANICK, S.M.; BURA, R.; SADDLER, J.N. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 737-746, 2007.

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

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

GÁRCIA-APARICIO, M.P.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLES, A.; NEGRO, M.J. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 353-365, 2007.

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

GOCHEV, V.K.; KRASTANOV, A.I. Isolation of laccase producing *Trichoderma spp.* **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 171-176, 2007.

GOTO, M. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structure and multiple function. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 1415-1427, 2007.

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.

GROHMMAN, K.; HIMMEL, M.; RIVARD, C.; TUCKER, M.; TORGET, R.; GRABOSKI, M. Chemical-mechanical methods for the enhanced utilization straw. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 14, p. 137-157, 1984.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 15, p. 59-80, 1986.

HAN, G.; DENG, J.; ZHANG, S.; BICHO, P.; WU, Q. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 28-33, 2010.

HAN, Y.; CHEN, H.Z. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 218-224, 2010.

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

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M.; KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1551-1556, 1967.

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

HOLKER, U.; DOHSE, J.; HÖFER, M. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 423-427, 2002.

HSU, T.-C.; 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, p. 4907-4913, 2010.

IEMMA, F.; PUOCI, F.; CURCIO, M.; PARISI, I.O.; CIRILLO, G.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N. Ferulic acid as a comonomer in the synthesis of a novel polymeric chain with biological properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, p. 784-789, 2010.

JEOH, T.; MICHENER, W.; HIMMEL, M.E.; DECKER, S.R.; ADNEY, W.S. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. **Biotechnology for Biofuels**, doi:10.1186/1754-6834-1-10, 2008.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylan and their interaction in plant cell walls. **Xylans and Xylanases**, p. 1-15, 1992.

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.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, p. 277-287, 1998.

KAAR, W.E.; HOLTZAPPLE, M.T. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 419-427, 1998.

KABEL, M.A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A.G.; SCHOLS, H.A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2034-2042, 2007.

KÁLMÁN, G.; VARGA, E.; RÉCZEY, K. Dilute sulphuric acid pretreatment of corn stover at long residence times. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 16, p. 151-157, 2002.

KANAYAMA, N.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 405-410, 2002.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301-306, 1994.

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.

KOVACS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. **Biotechnology for Biofuels**. Doi:10.1186/1754-6834-2-14, 2009.

KRISTENSEN, J.B.; THYGESEN, L.G.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H.; ELDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**. Doi:10.1186/1754-6834-1-5, 2008.

KUMAR, S.; SINGH, S.P.; MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1483-1489, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4203-4213, 2009.

LAW, D.J.; TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, p. 509-517, 1980.

LEE, Y.-J.; CHUNG, C.-H.; DAY, D.F. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 935-941, 2009.

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

LIAO, W.; WEN, Z.; HURLEY, S.; LIU, Y.; LIU, C.; CHEN, S. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, 1017-1030, 2005.

LIN, S.T.; DENCE, C.W. Methods in lignin chemistry. **Berlin: Springer-Verlag**, 578p, 1992.

LINDER, M.; TEERI, T.T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 15-28, 1997.

LIU, L.; SUN, J.; LI, M.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by FeCl₃ pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5853-5858, 2009.

LLOYD, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1967-1977, 2005.

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.

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

LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.

MÄKINEN, K.K. The rocky road of xylitol to its clinical application. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 1352-1355, 2000.

MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJÖDE, A.; NILVEBRANT, N.O.; JÖNSSON, L.J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 339-352, 2007.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37-53, 2009.

MATTHEWS, J.F.; SKOPEC, C.E.; MASON, P.E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R.W.; SUGIYAMA, J. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 138-152, 2006.

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

MORYIA, R.Y. **Estudo da ação de xilanases de diferentes origens sobre polpas organosolv de bagaço e palha de cana**. 99 p. Dissertação (mestrado) Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2003.

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.

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

NAKAYAMA, E.; OKAMURA, K. Influence of a steam explosion and microwave irradiation on the enzymatic-hydrolysis of a coniferous wood. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 35, p. 251-260, 1989.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 49-58, 2002.

NGUYEN, Q.A.; TUCKER, M.P.; BOYNTON, B.L.; KELLER, F.A.; SCHELL, D.J. Dilute acid pretreatment of softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 77-87, 1998.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 28, p. 2503-2510, 2007.

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

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 250-258, 2007.

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

PATHAN, A.K.; BOND, J.; GASKIN, R.E. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces – Horses for courses. **Micron**, v. 39, p. 1049-1061, 2008.

PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 929-938, 2007.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142 p. Dissertação (mestrado) Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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

REDDING, A.P.; WANG, Z.; KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. High Temperature Dilute Acid Pretreatment of coastal bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. Doi:10.1016/j.biortech.2010.09.053, 2010.

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

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136 p. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 816-822, 2005.

SAMIR, M.A.S.A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v. 59, 447-450, 2001.

SAPARRAT, M.C.N.; MARTÍNEZ, M.J.; CABELLO, M.N.; ARANBARRI, M. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 181-185, 2002.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, 301-304, 2002.

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.

SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; DOWE, N.; FARMER, J.; IBSEN, K.N.; RUTH, M.F. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 179-188, 2004.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHARROCK, K. Cellulase assay methods: a review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 17, p. 81-106, 1988.

SILVA, S.S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A. Xilitol: um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alim. Nutr. São Paulo**, v. 5, p. 109-117, 1994.

SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6679-6681, 2009.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Disponível em: www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf. Acessado em: 13 set. 2010.

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

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

SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M.; NIKU-PAAVOLA, M.-L.; VIIKARI, L.; BUCHERT, J. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. **Cellulose**, v. 7, p. 189-209, 2000.

TAMAKI, Y.; MAZZA, G. Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: Effects of extractives, particle size and crop species. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 534-541, 2010.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Phenol oxidase activity and one-electron oxidation activity in Wood degradation by soft-rot deuteromycetes. **Holzforschung**, v. 54, p. 463-468, 2000.

TÉLLEZ-JURADO, A.; ARANA-CUENCA, A.; GONZÁLEZ-BECERRA, A.E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; LOERA, O. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 665-669, 2006.

TEWARI, J.C.; MALIK, K. In situ laboratory analysis of sucrose in sugarcane bagasse using attenuated total reflectance spectroscopy and chemometrics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, 200-207, 2007.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7771-7778, 2009.

TU, M.; SADDLER, J.N. Potencial enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 274-287, 2010.

TUCKER, M.P.; KIM, K.H.; NEWMAN, M.M.; NGUYEN, Q.A. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulose enzyme digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 165-177, 2003.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 144-147, 2001.

UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). **Cana-de-açúcar: subprodutos**. Disponível em: www.unica.com.br/pages/cana_subprodutos.asp. Acessado em: 08 mar. 2006.

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.

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

WANG, Z.; KESHWANI, D.P.; REDDING, A.P.; CHENG, J.J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal bermuda grass. **Bioresource Technology**. Doi:10.1016/j.biortech.2009.12.097, 2010.

WEBER, R.W.; NELSON, H.S. Pollen allergens and their interrelationships. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 3, p. 291-318, 1985.

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

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

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.

YU, H.; GUO, G.; ZHANG, X.; YAN, K.; XU, C. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5170-5175, 2009.

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

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

ZHAO, X.-B.; WANG, L.; LIU, D.-H. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 1115-1121, 2007.

ZHAO, Y.; WU, B.; YAN, B.; GAO, P. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 47, p. 18-24, 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, p. 2459-2465, 2009.