UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RAFAEL RODRIGUES PHILIPPINI

**Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização
química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento
diferenciadas**

Lorena
2012

RAFAEL RODRIGUES PHILIPPINI

**Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização
química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento
diferenciadas**

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 Conversão de Biomassa

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena

2012

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

Philippini, Rafael Rodrigues

Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas / Rafael Rodrigues Philippini. – 2012.

82 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Celulose 3. Lignina 4. Hidrólise. I. Título

664.113 - CDU

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Silvio Silvério da Silva, pela amizade, oportunidade, confiança e paciência durante todo o desenvolvimento da pesquisa;

A minha professora de graduação, Ana Maria Cugliana, pelo incentivo e força;

Ao CTC, em especial ao Daniel Ibraim Pires Átala, pela disponibilidade das amostras de bagaço de cana-de-açúcar;

A FATEA, pelo empréstimo do extrator, em especial ao técnico Eduardo;

Ao pessoal do laboratório do Adilson, em especial à Cibele, pela grande paciência que tiveram comigo e pelo empréstimo de equipamentos do laboratório;

Aos colegas de laboratório Adriana, Aline, Ana, Bruna, Bruno, Daniel, Danielle, Eduardo, Felipe, Giovana, Ivy, Juliana, Luma, Maurício, Samira, Samuel, Thais e Victor, por terem me aguentado (Não mexam no material de caracterização!);

Ao Anuj, Ellen, Fernando, Germano, Kelly, Nica, Rita e aos professores George Jackson e Walter Carvalho, pelos *insights* no meu trabalho;

À Sabrina, pelo carinho, paciência e zelo durante todo o tempo. Conte comigo, sempre!

A todos do departamento, que influenciaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Proporcionando, seja conhecimento, ou momentos de descontração;

Aos meus familiares e amigos, que acreditaram em mim;

À bolsa CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

*"E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por
aqueles que não podiam escutar a música"*

Friedrich Nietzsche – *In: Assim Falou Zaratustra*

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, a caracterização da composição química de diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar (CTC-9; CT99-1906; SP81-3250; RB86-7515 e CT99-1902), e posterior hidrólise enzimática para averiguação de açúcares redutores e sacarificação da biomassa. As análises composicionais foram realizadas utilizando biomassa nas condições *in natura*, celulignina e polpa celulósica. As condições de pré-tratamento das amostras para hidrólise com ácido sulfúrico diluído (relação s/l: 1,5:10; temperatura: 150 °C; concentração ácida: H₂SO₄ 2% m/v; tempo: 30 minutos); e deslignificação com hidróxido de sódio (1:10 s/l; 100 °C; 1% NaOH; 30 minutos) foram pré-estabelecidas de modo a determinar uma análise comparativa das diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar estudadas. A hidrólise enzimática das amostras obtidas após os pré-tratamento foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo tampão citrato (50 mM; pH 5; 1:20 s/l) e carga enzimática (Celluclast 1.5 L - 75 FPU/mL e 13,5 UI/mL de β-glicosidase; e Novozym 188 - 65 UI/mL de β-glicosidase), e surfactante Tween 20 (0,15 g/g de bagaço). A composição química das variedades de bagaço de cana-de-açúcar, açúcares redutores e sacarificação da biomassa foram determinados por métodos cromatográficos, espectrofotométricos e gravimétricos tradicionais. Quanto a análise das variedades de cana tratada, a média dos valores observados: *in natura* – celulose (40,84%), hemicelulose (24,07%), lignina (33,7%) e cinzas (0,68%); extraído – celulose (38,83%), hemicelulose (27,32%), lignina (25,92), cinzas (0,32%) e extrativos (10,24%); celulignina – celulose (54,17%), hemicelulose (5,3%), lignina (37,28%), cinzas (0,54%) e polpa celulósica – celulose (77,48%), hemicelulose (6,07%), lignina (15,4%) e cinzas (0,32%). Os processos de hidrólise ácida e deslignificação demonstraram remoção eficaz da hemicelulose e da lignina (80% e 58%, respectivamente), e solubilização da biomassa (45% e 14%, em média). Os percentuais de sacarificação da celulose das amostras após 24 horas de reação foram de 9,7% para bagaço extraído, 50,4% para celulignina e 72,87% para polpa celulósica. Não foram observadas variações significativas na composição química das cinco amostras estudadas, bem como diferenciação na sacarificação das mesmas. Evidenciou-se que emprego de variedades de bagaço de cana-de-açúcar distintas utilizando pré-tratamentos em condições fixas não alteram os percentuais químico-estruturais do vegetal, bem como a recuperação da glicose e dos açúcares redutores presente na celulose.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Celulose. Hemicelulose. Lignina. Hidrólise ácida. Hidrólise enzimática.

PHILIPPINI, R. R. **Hybrid sugarcane bagasse varieties:** Chemical characterization and enzymatic hydrolysis in different pretreatment conditions. 2012. 82 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

ABSTRACT

The present work had as objective the chemical characterization of different varieties of sugarcane bagasse (CTC-9; CT99-1906; SP81-3250; RB86-7515 e CT99-1902) in different pretreatment conditions and the influence of pretreatments concerning varieties, reducing sugars recovery and biomass saccharification. Different pretreated biomass were obtained from *in natura* bagasse as it follows: extracted bagasse (24 hours/24 hours water/ethanol extraction in Soxhlet equipment), cellulignin (solid/liquid ratio: 1.5/10; temperature: 150 °C; acid concentration: H₂SO₄ 2% w/v; residence time: 30 minutes); and cellulose pulp (1:10 solid/liquid ratio; 1% NaOH w/v; 100°C; 30 minutes). Enzymatic hydrolysis experiments were performed in 125 mL Erlenmeyers containing citrate buffer (50 mM; pH 5; 1:20 solid/liquid ratio), Tween 20 surfactant (0.15 g/g of bagasse) and commercial enzymatic loads of Celluclast 1.5 L (75 FPU/mL and 13,5 IU/mL of β-glicosidase) and Novozym 188 (65 IU/mL of β-glucosidase). Chemical composition of varieties, reducing sugars and biomass saccharification were determined by chromatographic, spectrometric and gravimetric traditional methods. Biomass presented an average composition in each condition as it follows: *In natura* – cellulose (40.84%), hemicellulose (24.07%), lignin (33.7%) and ashes (0.68%); Extracted – cellulose (38.83%), hemicellulose (27.32%), lignin (25.92), ashes (0.32%) and extractives (10.24%); Cellulignin – cellulose (54.17%), hemicellulose (5.3%), lignin (37.28%) and ashes (0.54%). Cellulose pulp – cellulose (77.48%), hemicellulose (6.07%), lignin (15.4%) and ashes (0.32%). Acid and alkaline hydrolysis presented effective removal of hemicellulose and lignin (80% and 58% respectively), showing as average biomass solubilization 45% and 14%. Saccharification after 24 hours of reaction presented 9,7% for extracted bagasse, 50.4% for cellulignin and 72.87% for cellulose pulp. There were no significant observations in chemical-structural composition and at cellulose saccharification of the five studied samples, showing that the variety did not present any relevant influence on pretreated sugarcane bagasse.

Keywords: Sugarcane bagasse. Cellulose. Hemicellulose. Lignin. Acid hydrolysis. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia da cana-de-açúcar.	17
Figura 2 – Esquematização da interação dos componentes químico-estruturais dos vegetais.....	18
Figura 3 – Estrutura linear da celulose, formada por moléculas de glicose.	19
Figura 4 – Modelo esquemático do complexo celulose sintase (CesA), rosetas e favo em plantas superiores.....	20
Figura 5 – Celulose cristalina, firmemente ligada por ligações inter e intramoleculares.....	21
Figura 6 – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal.	24
Figura 7 – Macromolécula de lignina do tipo siringil.	25
Figura 8 – Álcoois precursores e fenilpropanóides correspondentes.....	26
Figura 9 – Distribuição de plantio de cana-de-açúcar no território nacional.....	28
Figura 10 – Esquematização da hidrólise enzimática da celulose por enzimas do complexo celulolítico.....	33
Figura 11 – Amostra de bagaço de cana-de-açúcar in natura embalada.....	37
Figura 12 – Amostra de bagaço de cana-de-açúcar moído em moinho de facas e peneirado em malha de 20 mesh.....	37
Figura 13 – Amostras de extrativos	39
Figura 14. Reator tipo êmbolo, com capacidade de 500 mL.	39
Figura 15 – Hidrólise ácida em banho a 45 °C por 7 minutos	41
Figura 16 – Cadinhos calcinados em mufla a 800°C.....	43
Figura 17 – Fluxograma simplificado das atividades desenvolvidas.	47
Figura 18 – Espectro de absorção de luz na região do ultravioleta e visível dos extratos do bagaço de cana-de-açúcar de diferentes variedades.....	50
Figura 19 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.	61
Figura 20 – Sacarificação da celulose (%) e Açúcares Redutores Totais – ART (%) das diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de polissacarídeos presentes em hemiceluloses.	23
Tabela 2 – Variedades de bagaço de cana-de-açúcar.	38
Tabela 3 – Percentual de extrativos removidos após extração com água, seguida de etanol.	48
Tabela 4 – Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido após hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído.	51
Tabela 5 – Solubilização das diferentes variedades de cana-de-açúcar após tratamento ácido.	53
Tabela 6 – Solubilização da biomassa após tratamento com NaOH diluído.	54
Tabela 7 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar in natura.	55
Tabela 8 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas à extração com água, seguida de etanol.	56
Tabela 9 – Composição mássica das diferentes variedades de celulignina.	58
Tabela 10 – Composição mássica das diferentes variedades de polpa celulósica.	59
Tabela 11 – Açúcares redutores totais (g/L) obtidos após hidrólise enzimática de diversas variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.	63
Tabela 12 – Glicose obtida (g/L) do hidrolisado enzimático de diversas variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CANA-DE-AÇÚCAR	15
2.1.1	A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo	15
2.1.2	Taxonomia e Morfologia	16
2.1.3	Composição químico-estrutural dos materiais lignocelulósicos	17
2.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	27
2.2.1	Extração dos materiais lignocelulósicos	28
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	29
2.3.1	Enzimas utilizadas no processo de hidrólise da biomassa	31
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	GERAL.....	36
3.2	ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	AS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	37
4.2	EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	38
4.3	PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM H ₂ SO ₄ DILUÍDO	39
4.4	PRÉ-TRATAMENTO DA CELULIGNINA COM NaOH DILUÍDO	40
4.5	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	41
4.6	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	44
4.6.1	Determinação da atividade de celulasas totais	44
4.6.2	Determinação da atividade de β-glicosidases.....	44
4.7	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO.....	45
4.7.1	Determinação da concentração de açúcares redutores obtidos após hidrólise enzimática..	45
4.7.2	Determinação da digestibilidade enzimática da celulose.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM ÁGUA, SEGUIDA DE ETANOL.....	48
5.2	PRÉ-TRATAMENTO DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM H ₂ SO ₄ DILUÍDO	51
5.2.1	Caracterização do hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar.....	51
5.3	HIDRÓLISE ALCALINA DA CELULIGNINA COM NaOH DILUÍDO.....	53
5.3.1	Solubilização da biomassa tratada com base diluída.....	53
5.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	54
5.4.1	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	54

5.4.2	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar extraído com água seguido de etanol	55
5.4.1	Caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com H ₂ SO ₄ diluído (celulignina)	57
5.4.2	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH diluído (polpa celulósica)	59
5.5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES TRATAMENTOS	62
6	CONCLUSÕES	68
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE	81
	APÊNDICE A – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS A DIVERSOS TRATAMENTOS	81

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O petróleo é um material não renovável, resultante da decomposição da matéria orgânica durante milhões de anos. Sua extração e refinação dão origem a diversos produtos, entre estes, diversos tipos de combustíveis. Esses combustíveis são agressivos ao meio ambiente e apresentam-se em quantidade cada vez mais limitada. Dentre os combustíveis renováveis está o etanol, produto obtido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares, realizada principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No Brasil, esses açúcares são obtidos pela extração do caldo da cana-de-açúcar, tornando-o, do ponto de vista ecológico, uma fonte de energia renovável. A produção e utilização do etanol como combustível alternativo ocorrem em alguns países, como a Índia e o Brasil, embora a produção e utilização de combustíveis fósseis sejam majoritárias.

A crescente conscientização ecológica do homem no século XXI, somado ao senso comum de sustentabilidade leva a busca de fontes alternativas para a obtenção de energia, como por exemplo, o aproveitamento eficaz dos subprodutos gerados pela agroindústria. Muitas vezes, esses subprodutos são utilizados de maneira pouco rentável ou simplesmente descartados no ambiente.

O principal subproduto da indústria canavieira é o bagaço, obtido pela moagem dos colmos da cana-de-açúcar para a obtenção da sacarose. O bagaço é um material lignocelulósico, composto basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (BALAT, 2011). Esses polímeros estão firmemente associados entre si, conferindo ao vegetal sua integridade física e resistência a agentes externos. O material lignocelulósico, rico em açúcares polimerizados, pode ser utilizado como matéria-prima na produção de etanol por meio de sua quebra em frações menores, por métodos físicos e químicos.

Deste modo, o acesso aos açúcares fermentescíveis é facilitado, assim como sua consequente digestibilidade para os micro-organismos. A utilização do bagaço vem atraindo a atenção dos pesquisadores, pois viabiliza o aumento da produção de etanol, produzindo-se mais sem a necessidade de ampliação de área cultivada.

Com uma área aproximada de 8,5 milhões de km², o Brasil é o quinto maior país em área territorial do mundo. Possui climas que vão desde o equatorial até o subtropical e ao tropical de altitude. Essa diferenciação geográfica levou à formação de diversos biomas e a uma das mais ricas biodiversidades do planeta. A distinção de climas e solos dentro da monocultura de cana-de-açúcar sugere uma absorção de nutrientes do solo específica para cada localização, o que pode levar à variação do percentual dos componentes químicos e estruturais do vegetal. Assim, faz-se necessária uma averiguação de diversas variedades de cana-de-açúcar comerciais e desenvolvidas por centros de biotecnologia, de modo a se observar a composição químico-estrutural em condições pré-estabelecidas e averiguar se diferentes variedades possuem componentes em quantidades diferentes.

Seguindo esta ideia, o presente trabalho se insere no projeto temático de pesquisa intitulado “*Etanol – pesquisa e desenvolvimento visando ao aproveitamento integrado do bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica do etanol lignocelulósico*” (FAPESP 2008/57926-4) e está sendo desenvolvido no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1 A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo

O Brasil é o quinto maior país em área territorial do mundo, seguido da Rússia, China, Canadá e Estados Unidos, apresentando uma área territorial equivalente a 8,5 milhões de Km² (IBGE, 2009). Com cerca de 590 milhões de hectares de área destinada ao plantio, o Brasil lidera a produção de diversas culturas, como, por exemplo, o café, o feijão, a laranja e o mamão. É também o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, seguido da Índia e da China (FAO, 2010). A cana-de-açúcar apresenta grande interesse industrial e tecnológico, por possuir um grande potencial energético e por ser completamente renovável (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). O aproveitamento da cana-de-açúcar é integral, pois ocorre desde a extração do caldo de cana, para a produção de açúcar e etanol, até a utilização de seus subprodutos (bagaço, melaço e palha), na alimentação animal, geração de energia e obtenção de produtos por vias biotecnológicas (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009).

No Brasil, o plantio da cana é focado principalmente na região Centro-Sul, que é responsável por quase 90% da produção total do país, sendo os outros 10% produzidos na região Norte-Nordeste. A área destinada à atividade sucroalcooleira para a safra 2011/2012 foi estimada em 8,35 milhões hectares, que estão distribuídos entre todos os estados produtores. O Estado de São Paulo lidera essa produção, com 52,2% da área total de cultivo, seguido por Minas Gerais (8,77%) e Goiás (8,1%). A produtividade média de cana-de-açúcar nos estados brasileiros está calculada em 68,3 toneladas por hectare, aproximadamente 12% menor que a safra 2010/2011. Desse total, 47,3% serão destinados para a produção de açúcar e 52,7% para a produção de álcool. A produção de cana-de-açúcar na safra 2011/2012 será de aproximadamente 570 milhões de toneladas, valor que representa uma queda de 8,5% em relação à safra 2010/2011 (CONAB, 2011).

No Brasil, muitas variedades de cana-de-açúcar são produzidas em centros de biotecnologia, onde se almeja a produção de variedades que atendam ao contraste de condições ambientais e sazonais do país. Esse melhoramento é realizado a partir da hibridização, seleção e caracterização das espécies, produzindo-se plantas mais resistentes a pragas e com alto potencial genético. Plantas com maior resistência à secas, que não necessitam serem queimadas para colheita, com maior qualidade e de maior produção por hectare são obtidas, diminuindo drasticamente o custo final de produção de etanol e açúcar além de menor agressão ao meio ambiente (CTC, 2011; MONSANTO, 2011).

2.1.2 Taxonomia e Morfologia

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta herbácea, angiosperma, pertencente à classe Liliopsida (monocotiledônea), subclasse Commelinidae, ordem Poales (Cyperales) e família Poaceae (Gramineae) (MIRANDA, 2009). As poáceas representam a quarta maior família em número de espécies no mundo, depois das compostas (Asteraceae), das orquídeas (Orchidaceae) e das leguminosas (Leguminosae) (GIULIETTI et al., 2005). Pertencem também, a essa família, o arroz, a aveia, a braquiária, a cevada, o milho, o sorgo e o trigo, por exemplo. Representam a primeira família em importância econômica global, pois são amplamente utilizadas na alimentação humana e animal, além de serem utilizadas na produção de bebidas e na confecção de fármacos.

A cana-de-açúcar apresenta rizomas, caule composto por colmos cheios (com nós e entrenós), que possuem grande capacidade de absorção de água e onde se concentra a sacarose. Suas folhas são longas e de nervação paralela, com bainhas largas e abertas. Apenas uma folha é inserida em cada nó. Sua reprodução é realizada por uma estrutura básica chamada espiguiha (espícula), um tipo de inflorescência (Figura 1). Cada espiguiha é composta de até 50 flores, que comumente são hermafroditas (JOLY, 2002; OLIVEIRA, 2007; VIDAL; VIDAL, 2003;).

Figura 1 – Morfologia da cana-de-açúcar.

O cultivo e a produtividade de cana-de-açúcar dependem de diversos fatores, dentre eles destacam-se as condições de plantio, o tamanho de lavoura, o tipo de solo, a topografia, o clima e a tecnologia aplicada (CONAB, 2010). Esses fatores, somados aos caracteres genéticos da planta, estão intrinsecamente relacionados à composição química-estrutural do vegetal, o que pode levar à alteração da produtividade. (MAULE; MAZZA; MARTHA JR, 2001).

2.1.3 Composição químico-estrutural dos materiais lignocelulósicos

O material lignocelulósico é a biomassa renovável mais abundante do planeta, apresentando produção anual de 1×10^{10} milhões de toneladas (ALVIRA et al., 2010). Possui como principais componentes químico-estruturais, a celulose, a hemicelulose e a lignina (BALAT, 2011) (Figura 2). Esses componentes associados são responsáveis pela integridade física do vegetal, conferindo-lhe resistência mecânica e proteção contra intempéries e agentes biológicos, como, por exemplo, fungos (GARCIA et al., 2007) e bactérias (BLANCH et al., 2008), além de insetos (Coleoptera, Isoptera e

Lepidóptera) espoliadores de nutrientes (GRÜNWALD; PILHOFER; HÖLL, 2010; MACHADO; HABIB, 2006).

Figura 2 – Esquemática da interação dos componentes químico-estruturais dos vegetais. Adaptado de CARVALHO, 2009.

Embora seja necessária para a sobrevivência do vegetal, a forte associação entre esses componentes estruturais constitui o maior dos desafios quanto à acessibilidade aos açúcares por processos biológicos, como a hidrólise enzimática e a fermentação (GÁMEZ et al., 2006). O aproveitamento eficaz dos subprodutos gerados pela agroindústria deve ser considerado, observando que, muitas vezes, esses subprodutos são utilizados de maneira pouco rentável, queimados ou simplesmente descartados no ambiente (DIAS, et al., 2009; MANZANO et al., 2000; SOCCOL et al., 2009). Quando aplicados a processos biotecnológicos, os materiais lignocelulósicos podem gerar uma variedade de produtos de alto valor agregado, além de poderem ser utilizados como substrato de grande potencial energético renovável (BALAT, 2011; SARROUH; PHILIPPINI; SILVA, 2009).

2.1.3.1 Celulose

A celulose é o mais abundante composto orgânico renovável no planeta, sendo o principal constituinte estrutural da parede celular dos vegetais e um importante componente da madeira (BALAT, 2011; KLOCK et al., 2005).

Representa de 23 a 53% da composição química dos vegetais e 45,4% do bagaço de cana-de-açúcar (KLOCK et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010; SUN et al., 2004).

É composta basicamente por subunidades de D-glicose que estão unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 3). Essas ligações são responsáveis pela formação dos dissacarídeos de celobiose, unidade repetitiva do homopolímero (CAMPBELL, 2000; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Devido ao grande percentual de celulose presente nos vegetais e tendo em vista que estes são constituídos basicamente de monômeros de glicose – açúcar facilmente assimilado por diversas espécies de micro-organismos – há um grande interesse industrial nos processos de hidrólise desses polímeros, para síntese de produtos associados.

Figura 3 – Estrutura linear da celulose, formada por moléculas de glicose. Adaptado de CAUX, 2009.

A celulose é sintetizada na membrana plasmática, pelas proteínas celulose sintase (CesA). Cada CesA é composta de 6 proteínas (uma α 1, duas α 2 e três β isoformas). Essas proteínas estão dispostas de 6 em 6, formando as chamadas rosetas (DING; HIMMEL, 2006). Por fim, as rosetas estão dispostas em arranjo hexagonal (favo). Cada proteína CesA catalisa a síntese de uma cadeia de β -glucano, obtendo um total de 36 microfibrilas, que juntas formam a macrofibrila de celulose (Figura 4).

Figura 4 – Modelo esquemático do complexo celulose sintase (CesA), rosetas e favo em plantas superiores. Adaptado de DING; HIMMEL, 2006.

A molécula de celulose pode apresentar um grau de polimerização de 100 até 15000 unidades de glicose, que alinhadas linearmente resultam na estrutura do polissacarídeo (FENGEL; WEGENER, 1989). A variação na polimerização é dada em função da espécie vegetal, apresentando-se em maior ou menor quantidade, de acordo com a variedade, espécie e até mesmo da localização espacial dentro de uma mesma célula (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

As cadeias lineares de celulose se apresentam de modo ordenado (porção cristalina) e não tão ordenada (porção amorfa). A porção cristalina da celulose resulta da união das microfibrilas por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando ligações intra e intermoleculares (Figura 5). A celulose nativa é parcialmente cristalina e o grau de cristalinidade medido por difração de raios X varia de 50 a 70% (KLOCK et al., 2005). Esses agregados conferem às plantas, elevada resistência à tensão mecânica e a ataques químicos, uma vez que a solubilidade da celulose é fortemente dependente do seu peso molecular e do seu grau de cristalinidade (ASS; BELGACEM; FROLLINI, 2006; CANILHA et al., 2009; LAUREANO-PEREZ et al., 2005).

Figura 5 – Celulose cristalina, firmemente ligada por ligações inter e intramoleculares.

A região amorfa da celulose compreende uma região desorganizada que, segundo métodos de difração de raios-X, se altera com as regiões cristalinas da celulose a cada 600 Å (Angstroms). As zonas amorfas da celulose podem absorver água e tornar a celulose macia e flexível (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009; KLOCK et al., 2005;). A organização cristalina da celulose influencia na sua reatividade ao controlar o acesso de substâncias químicas ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas. Este grau organizacional impede a entrada de água em seu interior devido à consequente ausência de espaços vazios na estrutura (ADEL, et al, 2010; FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). Deste modo, a utilização de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos para romper a estrutura cristalina da celulose é comumente descrita para a hidrólise da biomassa (YOSHIDA et al., 2008).

2.1.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo mais abundante polissacarídeo no planeta, sendo um dos principais constituintes estruturais da parede celular dos vegetais. Possui função conectora entre as fibrilas de celulose e a lignina, desempenhando funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, além de conferir maior rigidez a rede estrutural da mesma (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009; GÍRIO et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Representa de 20 a 35% da composição química dos vegetais e, aproximadamente, 24% do bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2010; SUN et al., 2004).

Composta basicamente por carboidratos, a hemicelulose apresenta diferentes polímeros de pentoses (como a L-arabinose e a D-xilose), de hexoses (como a D-galactose, a D-glicose e a D-manose), além de ácidos urônicos, e grupos acetila (CARVALHO et al., 2009; FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009; GÍRIO et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; RAMOS, 2003).

Apresentando baixos níveis de polimerização (100 a 200 unidades), a hemicelulose se apresenta predominantemente distribuída nas paredes primárias de dicotiledôneas e em monocotiledôneas não-gramíneas (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005). Em geral, é considerado um heteropolímero amorfo, embora possa apresentar alguma ordem cristalográfica, principalmente no parênquima de angiospermas (KABEL et al., 2007; CAUX, 2009). Devido à ausência de regiões cristalinas, a hemicelulose é mais facilmente atacada por processos termoquímicos, resultando em sua fácil solubilização quando exposta a condições mais elevadas (BALAT, 2011; KABEL et al., 2007).

A obtenção dos açúcares presentes na hemicelulose pode ser realizada utilizando processos físicos e/ou químicos e biológicos (ALVIRA et al, 2010). A utilização de ácidos fortes diluídos em altas temperaturas é comumente observado, uma vez que a utilização dos mesmos em altas concentrações causa corrosão aos equipamentos (GÍRIO et al., 2010). A hidrólise enzimática da hemicelulose utiliza enzimas que catalisam a produção de xilooligossacarídeos da cadeia de xilana, e finalmente em xilose (KANNA et al., 2011).

A solubilização da hemicelulose, presente na biomassa vegetal, pela utilização de um pré-tratamento eficaz é de fundamental importância para a recuperação de açúcares presente na biomassa, pois, além de remover parte dos açúcares estruturais da biomassa aumenta a porosidade do material, facilitando, posteriormente, o acesso de enzimas celulolíticas à celulose (ALVIRA et al, 2010; GÍRIO et al., 2010). A ampla variação de carboidratos proporciona a hemicelulose uma grande variedade de arranjos estruturais, que é dada pela variação biológica do vegetal (GÍRIO et al, 2010). A Tabela 1 sumariza as principais estruturas de polissacarídeos presentes na hemicelulose (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais tipos de polissacarídeos presentes em hemiceluloses.

POLISSACARÍDEO	ORIGEM BIOLÓGICA	AÇÚCAR DA CADEIA PRINCIAL	COMPONENTES DA CADEIA LATERAL	TIPO DE LIGAÇÃO
Arabinogalactana	Gimnospermas	β -D-Galactose	β -D-Galactose α -L-Arabinofuranose β -L-Arabinopiranoose	β -(1 $\rightarrow$ 6) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 3)
Arabinoglucoronoxilana	Gramíneas, Cereais, Gimnospermas	β -D-Xilopiranoose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-Glicopiranoose A	α -(1 $\rightarrow$ 2)
Arabinoxilana	Cereais	β -D-Xilopiranoose	α -L-Arabinofuranose Feruloil esterase	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)
Galactoglucomanana	Gimnospermas	β -D-Manopiranoose β -D-Glicopiranoose	β -D-Galactopiranoose Acetila	α -(1 $\rightarrow$ 6)
Glucomanana	Angiospermas; Gimnospermas	β -D-Manopiranoose β -D-Glicopiranoose	-	-
Glucorono-arabinoxilana	Gramíneas e Cereais	β -D-Xilopiranoose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-GlicopiranooseA Acetila	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)
Glucoronoxilana	Angiospermas	β -D-Xilopiranoose	4-O-Me- α -D-GlicopiranooseA Acetila	α -(1 $\rightarrow$ 2)
Homoxilana	Algas	β -D-Xilopiranoose	-	β -(1 $\rightarrow$ 3)
Xiloglucana	Angiospermas, Gramíneas	β -D-Glicopiranoose β -D-Xilopiranoose	β -D-Galactopiranoose β -D-Xilopiranoose α -L-Arabinofuranose α -L-Fucofuranose Acetila	β -(1 $\rightarrow$ 4) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2)

Adaptado de GÍRIO et al., 2010

A arabino-4-metil-glucurono-xilana é o principal constituinte hemicelulósico das angiospermas (resíduos agroindustriais) e consiste de uma cadeia principal de xilopirranose, contendo como ramificações o ácido urônico 4-metil-glucopirranose e a α -L-arabinofuranose (Figura 6) (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; GÍRIO et al., 2010).

Figura 6 – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal. Adaptado de PALMA, 2003.

Devido à facilidade com que a hemicelulose presente nos materiais lignocelulósicos é hidrolisada em açúcares simples, há um grande interesse biotecnológico neste material, na geração de diversos produtos de alto valor agregado, como, por exemplo, o ácido acético, o biohidrogênio, o etanol e o xilitol (CHENG et al., 2008; LAOPAIBOON et al., 2009; PATTRA et al., 2008; SILVA et al., 2008;).

2.1.3.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, heterogêneo e de grande complexidade molecular e possui como finalidade biológica formar, junto aos outros componentes da planta, um tecido de excelente resistência e durabilidade contra micro-organismos e intempéries (BALAT, 2011) (Figura 7). Representa a porção não-polissacarídica mais abundante dos materiais lignocelulósicos, com cerca de 10% a 25% da composição química dos vegetais e aproximadamente 23% do bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2010; SUN et al., 2004).

Figura 7 – Macromolécula de lignina do tipo siringil. CAUX, 2009.

A lignina está presente apenas em plantas vascularizadas, por isso não ocorre em algas, com exceção da alga vermelha *Calliarthron cheilosporioides* (FENGEL; WEGENER, 1989; MARTONE et al., 2009). A composição química da lignina, assim como a dos demais constituintes vegetais, varia em função da espécie vegetal, tecidos celulares e maturidade do vegetal, fatores que estão sujeitos a intempéries ambientais (ALVIRA et al., 2010; CARVALHO et al., 2009; SINGH et al., 2005).

Derivada de grupos fenilpropanóides, a lignina é sintetizada a partir de três álcoois *p*-hidroxi-cinâmílicos precursores: o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico. Esses álcoois são responsáveis pela síntese de suas respectivas unidades aromáticas, *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), presentes na estrutura da lignina (Figura 8) (BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004).

Figura 8 – Álcoois precursores e fenilpropanóides correspondentes. Adaptado de BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004.

A relação entre as unidades constituintes da lignina varia conforme as espécies de vegetais estudadas. Ligninas presentes em Gimnospermas são quase que exclusivamente compostas de resíduos derivados do álcool coniferílico

(lignina tipo G). A lignina presente em angiospermas contém resíduos derivados tanto do álcool coniferílico, quanto do álcool sinapílico (lignina tipo GS). Por fim, a lignina do tipo HGS contém os três tipos de precursores e estão presentes em plantas herbáceas e em gramíneas, como é o caso da cana-de-açúcar (RAMOS, 2003).

A lignina sempre está associada à hemicelulose e a celulose, raramente sendo encontrada de maneira isolada. Essa interação apresenta grande impacto nos estudos científicos, dado o interesse de se obter plantas mais adequadas ao processo de deslignificação e utilização na indústria de conversão de biomassa lignocelulósica na produção de etanol (CARVALHO et al., 2009; RAMOS, 2003; SINGH et al., 2005;).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Dentro do contexto energético, para a produção de biocombustíveis diversos países utilizam uma variedade muito grande de biomassa lignocelulósica, devido à grande disponibilidade, baixo custo de matéria-prima e alta concentração de carboidratos (GOUVEIA, et al., 2009). Dentre as biomassas utilizadas para a produção de biocombustíveis, destacam-se a palha de arroz e trigo, sabugo de milho e o bagaço de cana-de-açúcar.

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis e, apresenta-se distribuído em todo o território nacional (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição de plantio de cana-de-açúcar no território nacional.

Uma vez que essa variação de climas e solos e o emprego de técnicas para solubilização da biomassa e recuperação dos açúcares são atribuídos, tornam-se necessárias análises químicas composicionais da biomassa empregada, de modo a observar a relação dos constituintes e o modo com que cada tipo de pré-tratamento afeta a biomassa utilizada (MAULE; MAZZA; MARTHA JR, 2001; SLUITER et al. 2008b).

2.2.1 Extração dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos apresentam (além de celulose, hemicelulose e lignina), em menores proporções, vários extrativos, como, por exemplo, amidos, graxas, óleos essenciais, proteínas e resinas (SLUITER, et al., 2008b; FENGEL; WEGENER, 1989). Apresenta também outros componentes, como, por exemplo, a pectina (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005). A barreira cerosa presente na cutícula das gramíneas apresenta características lipídicas, impedindo, por natureza, a penetração de líquidos e consequentemente de enzimas. (ALVIRA, et al, 2010; FERREIRA et al., 2005). A utilização de diferentes combinações de solventes para a remoção de extrativos presentes no bagaço de

cana-de-açúcar tem sido estudados (CARASCHI; FILHO; CURVELO, 1996; MARTIN et al. 2007; SUN et al., 2004; ZHAO, WANG; LIU, 2007), uma vez que a excisão dos mesmos é de fundamental importância para a realização de uma caracterização precisa e que estes podem interferir significativamente nos procedimentos de análise de caracterização (SLUITER et al., 2008a).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.

A recuperação de açúcares a partir dos materiais lignocelulósicos tem sido o tema de interesse de muitos departamentos de pesquisa no Brasil e no mundo. A utilização desses açúcares para a produção de etanol combustível é de significativa importância no contexto brasileiro, devido ao crescente mercado agroindustrial, que gera milhões de toneladas de resíduos anualmente e a presença de carros *flex*, que atualmente corresponde a 90% da frota nacional (SOCCOL et al., 2010; UNICA, 2010).

Embora a busca por esses açúcares seja grande, alguns fatores são responsáveis pela queda de eficiência da hidrólise enzimática da celulose. A presença de outros componentes do material lignocelulósico (hemicelulose e lignina) dificulta o acesso à celulose, assim como a própria cristalinidade desta e seu grau de polimerização (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Para que o acesso ao material seja possível, devem ser adotadas algumas estratégias, demonstradas em diversos estudos reportados na literatura. Esse conceito é denominado pré-tratamento e sua eficácia está diretamente relacionada à hidrólise enzimática e a obtenção de açúcares fermentescíveis do material (SOCCOL et al, 2010).

Com base na complexa estrutura lignocelulósica, o pré-tratamento é de fundamental importância para a obtenção da sacarificação da biomassa. Algumas etapas podem ser realizadas para que haja uma degradação e/ou fracionamento do material, facilitando, deste modo, o acesso das enzimas celulolíticas ao material (GÍRIO, 2010; MOSIER, 2004). Tendo em vista pré-tratamentos que tenham baixo custo operacional, alguns fatores-chave devem ser observados: 1) alta digestibilidade do sólido pré-tratado; 2) baixa degradação de açúcares; 3) baixas concentrações de compostos tóxicos; 4) não produção de resíduos sólidos;

5) alta concentração de açúcares; 6) recuperação de lignina; 7) baixo consumo de eletricidade (ALVIRA et al., 2009).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos pode ser realizado de diversas formas, apresentando origem biológica, física e/ou química. Dentre os principais métodos de pré-tratamento citados pela bibliografia estão: a utilização de fungos filamentosos (SÁNCHEZ, 2009), a fragmentação mecânica (SUN; CHENG, 2002; SOARES et al., 2011; TAHRZADEH; KIRIMI, 2008), a extrusão (MULINARI et al., 2009), o tratamento alcalino (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; CARVALHEIRO; DUARTE, GÍRIO, 2008; SOARES et al., 2011), o tratamento ácido (CHENG et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009), a explosão a vapor (AVELAR; GLASSER, 1998) a explosão da fibra com amônia – AFEX (BALS et al., 2009), o uso de micro-ondas (HU; WEN, 2007), o uso de ultrassom (LIU et al., 2007), entre outros. Cada um destes pré-tratamentos apresenta um efeito específico sobre a biomassa, podendo ou não agir de maneira mais eficaz sobre uma dada fração (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Observa-se na literatura uma diversidade de ácidos que são utilizados para pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos. O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é comumente utilizado em diversos trabalhos, no entanto, são também utilizados o ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácido nítrico (HNO_3), por exemplo (ADEL et al., 2010; GÁMEZ et al., 2006). Fatores pré-estabelecidos como, concentração do ácido e as condições de pré-tratamento (teor de sólidos, tempo de residência, temperatura) variam de acordo com o material a ser estudado (HOWARD et al., 2003).

A hidrólise com ácido sulfúrico diluído é a forma de pré-tratamento mais utilizada para aplicações industriais e vem sendo estudada para o tratamento de diversos tipos de biomassa lignocelulósica (HOWARD et al., 2003). Apresenta como principais efeitos a quebra das ligações entre os componentes do vegetal, a solubilização da hemicelulose e sua conversão em açúcares fermentescíveis (SAHA, 2003). A hemicelulose solubilizada por ácido sulfúrico pode conter compostos de degradação, como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), além de compostos aromáticos da lignina. Esses compostos afetam o metabolismo do micro-organismo no processo de fermentação (ALVIRA et al., 2009).

A remoção da lignina presente na biomassa usualmente é dada pelo tratamento da mesma com bases, como o hidróxido de sódio, potássio e amônio

(GÍRIO et al., 2010;). O pré-tratamento alcalino aumenta a digestibilidade da celulose, demonstrando pouca degradação da celulose e da hemicelulose (ALVIRA et al., 2010, SOARES et al, 2011). A deslignificação do material pode ser realizada em combinação com a explosão a vapor, facilitando o acesso à celulose e, conseqüentemente, aumentando a digestibilidade do material (BALS et al., 2010).

2.3.1 Enzimas utilizadas no processo de hidrólise da biomassa

As enzimas são catalisadores de origem proteica, que favorecem as reações biológicas. Possuem alto grau de especificidade, sendo em muitos casos, controladas por processos reguladores. A reação catalisada ocorre no sítio ativo (fenda ou bolso da superfície da proteína e que consiste de certos aminoácidos essenciais para a atividade enzimática) (CAMPBELL, 2000).

Embora a utilização de enzimas necessite de maior tempo de reação e haja a necessidade da utilização de uma biomassa pré-tratada (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005, SOCCOL et al, 2010), a utilização de enzimas para conversão da biomassa é vantajosa, quando comparada com métodos de conversão química, pois a hidrólise enzimática apresenta ausência de perda de substrato por modificações químicas, necessita de baixo consumo de energia, utiliza condições ambientais amenas e interage apenas com substrato de sua especificidade (ALVIRA et al, 2010).

As enzimas de degradação da porção polissacarídica da biomassa são, em sua grande maioria, produzidas por fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, que juntos produzem um coquetel enzimático utilizado na sacarificação da biomassa. (GOTTSCALK, OLIVEIRA; BON, 2010). A utilização de microrganismos *in situ* para degradação da biomassa é também utilizada, como é o caso do *Ceriporiopsis subvermispota*, um fungo-filamentoso (fungo da podridão branca), que degrada a lignina por meio da ação lacases e peroxidases (ALVIRA et al, 2010).

Porém a utilização de enzimas na conversão de materiais lignocelulósicos em escala industrial é restrita, uma vez que há necessidade de produção de enzimas estáveis, com maior atividade específica e menor custo de produção (GOTTSCALK, OLIVEIRA; BON, 2010; SOCCOL et al, 2010).

2.3.1.1 Celulases

As enzimas do complexo celulolítico (celulases) são responsáveis por clivar a celulose em monômeros de glicose. Os fungos são os principais produtores de celulases, seguido por bactérias aeróbias e anaeróbias (LYND et al., 2002). Em geral, os animais não produzem celulases, que são necessárias para realizar essa hidrólise, embora tenham sido encontrados em moluscos, anelídeos, artrópodes, equinodermos e em alguns cordados (DAVISON; BLAXTER, 2005; MEDEIROS, 2004; WANG et al., 2009).

As celulases vêm sendo classificadas de acordo com sua ação catalítica e mais recentemente, de acordo com suas propriedades estruturais. Três grandes grupos de enzimas são encontrados: a endoglucanase; a exoglucanase, também chamada de celobiohidrolase (CBH); e a β -glicosidade (WANG et al., 2009). Essas classes de enzimas juntas formam o complexo celulolítico e são responsáveis pela hidrólise da molécula de celulose. O complexo celulolítico atua em sinergismo, clivando completamente a celulose, a partir de diferentes pontos da cadeia, de modo que no final do processo sejam obtidos monômeros de glicose (Figura 10) (ALVIRA et al, 2010; DHILLON et al., 2011; MAEDA et al, 2011, SANTOS et al, 2011). Essa ação enzimática conjunta apresenta uma maior atividade hidrolítica, quando comparada com as enzimas atuando individualmente (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

2.3.1.1.1 Endoglucanases

As endo-1,4- β -D-glucanases são responsáveis por reduzir o grau de polimerização das cadeias de celulose facilitando deste modo, a ação das celobiohidrolases. Essas enzimas clivam as ligações intramoleculares β -(1 $\rightarrow$ 4) da celulose de modo aleatório, principalmente nas regiões amorfas da cadeia celulósica, gerando oligossacarídeos com várias extensões e, conseqüentemente, novos sítios de ação enzimática. A atividade da endoglucanase pode ser medida pela redução da viscosidade do substrato e/ou aumento de açúcares de finais redutores (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). As endoglucanases apresentam

também aplicações industriais no processamento de cerveja e sucos de fruta e também na produção de ração animal (LYND et al., 2002; WANG et al., 2009).

Figura 10 – Esquematização da hidrólise enzimática da celulose por enzimas do complexo celulolítico.

2.3.1.1.2 *Exoglucanases*

As exo-1,4- β -D-glucanases, também conhecidas como celobiohidrolases (CBH), atuam nos finais redutores (CBHI) e não redutores (CBHII) das cadeias polissacarídicas de celulose, liberando glicose e celobiose, como produtos principais. A atividade da celobiohidrolase é essencial para a hidrólise da estrutura microcristalina da celulose, embora ambas apresentem baixo grau de

despolimerização da celulose. A proporção das isoenzimas pode variar consideravelmente, como é o caso das celulasas produzidas por *Trichoderma reesei*, onde as CBHI representam cerca de 60% das celulasas proteicas totais. As exoglucanases podem atuar também na hidrólise da estrutura da celulose microcristalina, presumivelmente removendo as cadeias de celulose da mesma (LYND et al., 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

2.3.1.1.3 β -glicosidases

A β -glicosidase, também chamada de celobiase, hidrolisa a celodextrina solúvel e a celobiose em monômeros de glicose. Apresenta grande importância na sacarificação da biomassa, uma vez que a presença de celobiose pode inibir a ação enzimática das endo e exoglucanase (DHILLON et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

2.3.1.1.4 Xilanases

As xilanases são enzimas hidrolíticas que clivam aleatoriamente a cadeia polissacarídica principal de xilana β -(1 $\rightarrow$ 4), presente na parede celular vegetal. Existem diversos tipos de xilanases, com diversos mecanismos de ação, atividades hidrolíticas e características físico-químicas. As principais enzimas são a endo-1-4-xilanases que catalisam a xilose em xilooligossacarídeos. As β -xilosidade cliva as cadeias de xilooligossacarídeos e xilobiose e em xilose à partir do final não redutor (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; DUMON et al., 2011; GÍRIO et al., 2010; KANNA, et al., 2011;).

São produzidas por diversos tipos de bactérias (*Bacillus* spp, *Clostridium* spp. e *Streptomyces* spp) e fungos (*Aspergillus* spp e *Trichoderma* spp). As xilanases são de fundamental importância para uma eficaz hidrólise enzimática da biomassa, pois a presença da hemicelulose dificulta o acesso das enzimas celulolíticas à celulose, o que leva a uma diminuição no rendimento da sacarificação (GÍRIO et al., 2010; MAEDA et al., 2011).

O entendimento da estrutura lignocelulósica e de seus componentes estruturais, condições de pré-tratamento, digestibilidade de biomassa e suas

interações são de fundamental importância para que haja uma combinação eficaz no tratamento dos materiais lignocelulósicos estudados, visando uma maior sacarificação da biomassa e, conseqüentemente, maior produção e rendimento final de etanol.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a variabilidade composicional de bagaços de cana-de-açúcar de procedências distintas, submetidos à pré-tratamentos ácidos e básicos e a susceptibilidade dos materiais obtidos a ensaios enzimáticos para a sacarificação da celulose presente na biomassa.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente as diversas variedades de bagaço de cana-de-açúcar (CTC-9; CT99-1906; SP81-3250; RB86-7515 e CT99-1902) *in natura*, extraída, a celulignina e a polpa celulósica verificando a eventual remoção de seus constituintes pelas condições de pré-tratamento empregadas.
- Realizar a hidrólise ácida das variedades de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando, como catalisador, H_2SO_4 diluído;
- Realizar a hidrólise alcalina da celulignina, que foi previamente tratada com H_2SO_4 diluído, com o objetivo de remoção da lignina do material, utilizando como catalisador NaOH diluído;
- Realizar a hidrólise enzimática da biomassa por extratos comerciais (Celluclast 1.5L e Novozym 188), avaliando o efeito das hidrólises na composição química e digestibilidade enzimática e obtenção de açúcares redutores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

As variedades de bagaço de cana *in natura* foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira, CTC – Piracicaba/SP (Figura 11). As amostras foram recebidas devidamente lacradas e apresentavam coloração mais clara, quando comparadas com outras amostras tradicionais de bagaço. As amostras de bagaço foram inicialmente trituradas em moinho de facas rotatórias, e peneiradas, por malha de 20 *mesh* para que apenas o material dessa fração ou menor fosse avaliado (Figura 12).

Figura 11 – Amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* embalada.

Figura 12 – Amostra de bagaço de cana-de-açúcar moído em moinho de facas e peneirado em malha de 20 *mesh*.

Foram determinados os percentuais de umidade para cada variedade de bagaço estudado. As variedades das amostras apresentadas neste estudo estão identificadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Variedades de bagaço de cana-de-açúcar.

VARIEDADE	IDENTIFICAÇÃO / VARIEDADE
1	CTC-9
2	CT99-1906
3	SP81-3250
4	RB86-7515
5	CT99-1902

4.2 EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

As variedades de bagaço de cana-de-açúcar moído foram extraídas com água, seguida de etanol. Em triplicata, uma quantidade de 4g de bagaço *in natura* (massa seca), foram acondicionadas individualmente em envelopes de papel filtro, lacradas e inseridas em extrator *Sohxlet* contendo 800 mL de solvente – por um período de 24 horas, para água e 24 horas para etanol. A substituição dos solventes foi feita a cada 12 horas e amostras dos mesmos foram armazenadas em frascos de vidro individuais para futuras análises (Figura 13). Ao término da extração, as amostras foram secas em temperatura ambiente, e então transferidas quantitativamente para pesa-filtros previamente tarados e acondicionados em estufa a 105° C até a obtenção de massa constante.

Amostras das soluções utilizadas para extração das variedades da cana-de-açúcar *in natura* foram devidamente diluídas e submetidas à varredura no espectro de absorção de luz visível e ultravioleta, em comprimentos de onda que variaram de 200 a 700 nm.

Figura 13 – Amostras de extrativos: A) água 12h; B) água 24 horas; C) etanol 12h; D) etanol 24 horas.

4.3 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM H_2SO_4 DILUÍDO

As hidrólises ácidas das variedades de bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas em reatores de aço inox, tipo “êmbolo” (Figura 14), com capacidade de 500 mL, imersos em banho termostático. As condições experimentais – temperatura (150 °C), concentração da solução de H_2SO_4 (2,0% m/v), tempo de residência (30 min) e relação sólido/líquido de 1,5:10 – foram pré-estabelecidas por Canilha et al. (2011), que utilizou planejamento experimental fatorial completo 2^3 .

Figura 14. Reator tipo êmbolo, com capacidade de 500 mL.

A biomassa foi acondicionada nos êmbolos, que foram devidamente fechados e então imersos em banho termostático, permanecendo monitorados durante o tempo estipulado. Após o término do tempo de residência, os êmbolos foram retirados do banho termostático e resfriados em água. Os êmbolos foram então abertos e os materiais hidrolisados foram filtrados à vácuo para separação da fração hemicelulósica da celulignina. O hidrolisado, resultante do processo, foi armazenado em frascos de vidro devidamente rotulados e congelados para posterior quantificação dos açúcares e inibidores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As porções de celulignina das amostras foram lavadas exaustivamente até pH próximo a neutralidade. A celulignina foi então seca a temperatura ambiente, e armazenada em embalagens individuais para análises composicionais, descritas no item 4.5. Parte deste material foi utilizada para a hidrólise alcalina.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA CELULIGNINA COM NaOH DILUÍDO

A hidrólise alcalina das amostras de celulignina resultantes da hidrólise com H_2SO_4 diluído foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, acondicionados em autoclave. As condições experimentais utilizadas foram: temperatura (100 °C); concentração da solução de NaOH (1% m/v); tempo de residência (30 min) e relação solido/liquido de 1:10. Os frascos erlenmeyers contendo a celulignina e a solução de NaOH foram fechados com papel alumínio e autoclavados pelo tempo de residência estipulado. Após este, o material contido nos Erlenmeyers foi filtrado à vácuo para separação da fração líquida da fração sólida. A fim de remover a lignina residual, a fração sólida foi lavada exaustivamente até que a água de lavagem não apresentasse mais a coloração amarelada característica do processo. A polpa celulósica foi seca à temperatura ambiente e armazenada em embalagens individuais para análises composicionais, descritas no item 4.5. Parte deste material foi utilizado no tratamento enzimático e sacarificação da celulose.

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

As variedades de bagaço de cana-de-açúcar, em diferentes condições (*in natura*, extraído, celulignina e polpa celulósica) foram caracterizadas quanto a seus compostos químicos (teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), seguindo a metodologia descrita por Gouveia et al. (2009). Para estas determinações, foram realizadas triplicatas contendo 2 g (massa seca) de cada variedade de amostra. Em béqueres de vidro, as amostras foram tratadas com H_2SO_4 a 72% (v/v), mantidos em banho termostatzado a 45 °C por 7 minutos, permanecendo em contínua agitação durante todo o processo (Figura 15).

Figura 15 – Hidrólise ácida em banho a 45 °C por 7 minutos

A reação foi então interrompida com 275 mL de água destilada, e o material foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL. Estes frascos, devidamente identificados, foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após este tempo, o material foi retirado e resfriado até atingir a temperatura ambiente e então filtrado quantitativamente em funis contendo papel filtro qualitativo Whatman® n° 1, previamente tarados.

O hidrolisado resultante foi coletado em balão volumétrico de 500 mL, sendo o volume deste completado com água destilada, homogeneizado e armazenado para determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

A determinação das concentrações de açúcares e ácidos orgânicos presente nas amostras foi realizada utilizando-se o cromatógrafo Agilent Technology series A1100 (Palo Alto, Califórnia). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep-Pak C18 (Millipore) e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração Agilent; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6mL/min. Para a determinação das concentrações de furfural e HMF, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas em equipamento Waters 2487/USA, sob as seguintes condições: coluna RP 18 (200 X 4,6mm) mantida à temperatura de 25°C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta SPD-10a UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila / água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,8 ml/min. Para determinação da celulose e hemicelulose presente nas amostras, utilizaram-se, respectivamente, as equações 1 e 2:

$$\% C = \% Cel * 0,95 + \% Gli * 0,9 + \% HMF * 1,29 + \% A.F * 3,09 \quad 1)$$

$$\% H = \% Xil * 0,88 + \% Ara * 0,88 + \% Fur * 1,38 + \% A.A * 0,7 \quad 2)$$

Onde: *C*: celulose; *Cel*: % de celobiose; *Gli*: glicose; *HMF*: hidroximetilfurfural; *A.F*: Ácido fórmico; *H*: hemicelulose; *Xil*: xilose; *Ara*: arabinose; *Fur*: furfural e *A.A*: ácido acético.

Para determinação da lignina solúvel presente no hidrolisado, 5 mL do hidrolisado foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL e adicionados de 40 gotas de NaOH 6,5 M. Os volumes dos balões foram devidamente aferidos com água destilada e homogeneizados. A determinação foi feita pela medida de absorbância em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B, a 280 nm e analisada pelas equações 3 e 4:

$$Lignina\ Solúvel\ (g/L) = 0,04187 * (A - Adp) - 0,0003279 \quad 3)$$

$$Adp = (C_F * \varepsilon_F + C_{HMF} * \varepsilon_{HMF}) \quad 4)$$

Onde: *A*: absorbância da solução a 280 nm; *Adp*: absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) a 280 nm; *C_F* e *C_{HMF}*: concentração de furfural e HMF, determinadas por CLAE; *ε_F* e *ε_{HMF}*: absorviedades do furfural e do HMF que valem respectivamente 146,85 e 114 L g⁻¹ cm⁻¹.

O material sólido retido no papel filtro qualitativo foi lavado exaustivamente com aproximadamente 1,5 L de água destilada, seco ao ar e, em seguida, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os filtros contendo o material retido foram então transferidos para cadinhos previamente tarados, tampados e acondicionados em mufla de aquecimento elétrico, onde permaneceram a 800 °C por 2 horas (Figura 16). Após o resfriamento, os cadinhos contendo o material foram transferidos para dessecadores e então quantificados gravimetricamente quanto ao teor de cinzas, como demonstra a equação 5:

Figura 16 – Cadinhos calcinados em mufla a 800°C.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} * 100 \quad 5)$$

Onde: M_C : Massa de cinzas; M_A : Massa de amostra base, seca.

A lignina insolúvel presente nas amostras foi determinada a partir da diferença entre as massas do resíduo seco e a massa de cinzas contida nos cadinhos, demonstrada na equação 6:

$$\% L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad 6)$$

Onde: $\% L_{Ki}$: Lignina Klason insolúvel; M_K : Massa seca de lignina insolúvel; M_C : Massa de cinzas; M_A : Massa da amostra base, seca.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.6.1 Determinação da atividade de celulases totais

A determinação da atividade de celulase foi adaptada da metodologia proposta por Ghose (1987), que determinava a atividade celulolítica em termos de unidades de papel de filtro por mililitro da solução enzimática original, por meio da utilização do ácido dinitrosalicílico (DNS). Em duplicata, os tubos de ensaios contendo 50 mg do substrato (papel de filtro quantitativo de 80 g/m²), 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5) e 500 µL da enzima Celluclast 1.5L foram diluídos e incubados a 50 °C por 60 min.

Para determinação dos açúcares redutores liberados, foi utilizado o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1945). Foram transferidos 500 µL do meio reacional para novos tubos de ensaio que foram adicionados de 500 µL do reagente I, para então serem submetidas a banho termostático a 98 °C por 10 minutos. Depois de decorrido o tempo, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e adicionadas em 500 µL do reagente II e 3,5 mL de água, completando, deste modo, volume total de 5 mL. Foram realizadas leituras das absorbâncias em espectrofotômetro da marca BECKMAN DU 640B, a 540 nm.

Para a determinação da atividade de celulases totais (FPU), foi necessária estimar a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 2 mg de glicose. Deste modo, foi gerado um gráfico *semilog* das concentrações de enzimas em relação à massa liberada nos ensaios, determinando a respectiva concentração. A atividade enzimática foi determinada pela equação 7:

$$FPU/mL = \frac{0,37}{C} \quad 7)$$

Onde: C: Concentração enzimática responsável por liberar 2 mg de glicose.

4.6.2 Determinação da atividade de β-glicosidases

Para a determinação da atividade de β-glicosidases foi desenvolvido um ensaio enzimático de volume final de 0,5 mL, constituído de *p*-NPG (*p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo) 4 mM, solução tampão citrato de sódio (50 mM) pH 5,0 e

solução enzimática. Os tubos contendo o material foram incubados a 50 °C durante 20 minutos. Ao término do tempo, houve a interrupção da reação enzimática com a adição de 1 mL de Na₂CO₃ 0,25 M. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada pela leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como o número de μ mol de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO

Amostras das cinco variedades de bagaço extraído, celulignina e celulose foram submetidas à hidrólise enzimática. Para a realização dos experimentos, duplicatas das amostras, contendo 1,25 g de biomassa cada, foram acondicionadas em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5) e 0,15 g/g de surfactante Tween 20. Foram adicionadas cargas enzimáticas das enzimas comerciais Celluclast 1.5 L (75 FPU/mL e 13,5 UI/mL de β -glicosidase); e Novozym 188 (65 UI/mL de β -glicosidase). Os frascos contendo os materiais foram acondicionados em incubadora de bancada (shaker), modelo Q816M20, conduzida a 50 °C e a 100 rpm. Por meio de uma pipeta automática, foram retiradas alíquotas contendo 1 mL nos tempos de 6, 24, 30 e 48 horas, que foram acondicionadas em micro tubos Eppendorf devidamente identificados, congelados e armazenados para análise de conversão em glicose e concentração de açúcares redutores.

4.7.1 Determinação da concentração de açúcares redutores obtidos após hidrólise enzimática

Para a determinação de açúcares redutores, as amostras da reação enzimática, armazenadas em tubos Eppendorf, foram descongeladas e o método do cuproarsenato descrito no item 4.7.1 foi utilizado. A equação 8 determina a concentração de açúcares redutores (g/L) de cada amostra:

$$AR (g/L) = \frac{Abs * Dil * 0,2156}{V} \quad 8)$$

Onde: *AR*: açúcares redutores (g/L); *Abs*: absorbância; *Dil*: diluição; *V*: volume da amostra.

4.7.2 Determinação da digestibilidade enzimática da celulose

Para determinação de concentração de glicose recuperada após a hidrólise enzimática das amostras, as amostras foram submetidas à CLAE utilizando aparelho e coluna descritos no item 4.5.

A equação 9 foi usada para a determinação da digestibilidade enzimática da celulose.

$$D_C = \left(\frac{(C_G * V_R) * 0,9}{M_I} \right) * 100 \quad 9)$$

Onde: *C_G*: concentração de glicose no meio reacional; *V_R*: volume reacional; *M_I*: massa inicial de celulose adicionada à reação.

A Figura 17 ilustra, de forma sucinta, as principais atividades realizadas neste trabalho, bem como as condições empregadas em cada processo experimental.

DADOS

Moagem: 20 mesh;

Extração: água/etanol – 800 mL (2x12h);

Hidrólise Ácida: 1,5:10 s/l → 2,0% H₂SO₄ (m/v) → 150°C → 30 min;

Deslignificação: s/l: 1:10 → 1% NaOH → 100 °C → 30 min;

Caracterização: H₂SO₄ 72% (v/v), 7 min, 45 °C → 121 °C, 30 min → 100 °C → 800 °C, 2h;

Hidrólise Enzimática: Celluclast 1.5L + Novozym 188 → Tampão citrato (pH 5) → 100 rpm → 48h

Figura 17 – Fluxograma simplificado das atividades desenvolvidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM ÁGUA, SEGUIDA DE ETANOL

As diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar foram extraídas com água, seguida de etanol. Os valores obtidos para os compostos extraídos (Tabela 3), variaram entre 9,02% (CTC-9) e 11,07% (RB86-7515).

Tabela 3 – Percentual de extrativos removidos após extração com água, seguida de etanol.

Variedade	Extrativos (%)
CTC-9	9,02%
CT99-1906	10,70%
SP81-3250	9,38%
RB86-7515	11,07%
CT99-1902	11,05%

Os valores percentuais de extrativos, encontrados no presente estudo, são semelhantes ao encontrado por Canilha et al. (2011), que, ao extrair amostras de bagaço de cana-de-açúcar com água, seguida de etanol, obtiveram 9,1% de extrativos. Outros trabalhos da literatura também demonstram remoção de componentes não estruturais do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizando diferentes solventes. Rocha et al. (2011), obteve 4,6% de extrativos utilizando etanol como solvente, enquanto Caraschi, Filho e Curvelo (1996), obtiveram 8,1% de extrativos em uma amostra de bagaço extraído com ciclohexano e etanol. Martin et al. (2007) apresentou valores de 6,1% utilizando apenas água como solvente, enquanto, Zhao, Wang e Liu (2007), encontraram 3,2% de extrativos, utilizando benzeno-etanol. Sun et al. (2004) apresentou valores de apenas 0,8% ao realizar extração com tolueno e etanol.

A Figura 18 demonstra os espectros de absorção de luz das diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar, submetidas à extração com água, seguida de etanol, que compreendem da região ultravioleta (200 nm), até luz visível (700 nm).

Figura 18 – Espectro de absorção de luz na região do ultravioleta e visível dos extratos do bagaço de cana-de-açúcar de diferentes variedades

De acordo com os resultados, pressupõe-se que uma quantidade considerável de sacarose esteja presente nos extrativos, uma vez que o bagaço contém quantidades significativas da mesma (TEWARI; MALIK, 2007), e que os açúcares são facilmente solubilizados em água (KLOCK et al., 2005). A prática de adição de água na moagem industrial (embebição) é comumente utilizada para diluir a sacarose remanescente no bagaço, aumentando, deste modo, a quantidade recuperada dos açúcares redutores totais.

Conforme a figura 18, os espectros de absorção de luz demonstraram uma maior absorvidade na região do ultravioleta a 280 nm, apresentando maiores valores para as primeiras extrações de cada solvente. A visualização de uma grande absorvidade para a primeira extração com etanol é válida, uma vez

que solventes orgânicos, como o etanol, removem com eficácia, componentes cerosos do bagaço de cana-de-açúcar (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; NUISSIER et al., 2002). A remoção de compostos cerosos presentes na biomassa é um processo fundamental para a realização de uma caracterização química adequada e, conseqüente, mais precisa com relação aos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina.

5.2 PRÉ-TRATAMENTO DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM H_2SO_4 DILUÍDO

5.2.1 Caracterização do hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado oriundo do pré-tratamento das diferentes variedades de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído foi caracterizado quanto às concentrações de açúcares, compostos inibidores e pH (Tabela 4). As concentrações de açúcares e inibidores variaram em: glicose (8,28 g/L a 11,5 g/L); xilose (15,09 g/L a 23,94 g/L) g/L; arabinose (2,25 g/L a 3,09 g/L); ácido acético (1,99 g/L a 2,85 g/L); furfural (1,45 g/L a 1,78 g/L) e HMF (0,76 g/L a 0,98 g/L).

Tabela 4 – Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido após hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído.

Variedade	Açúcares (g/L)			Inibidores (g/L)		
	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	Furfural	HMF
CTC-9	11,5 ⁽⁺⁾	20,26	3,09 ⁽⁺⁾	2,85 ⁽⁺⁾	1,75	0,85
CT99-1906	10,25	23,94 ⁽⁺⁾	2,77	2,78	1,78 ⁽⁺⁾	0,97
SP81-3250	8,28 ⁽⁻⁾	15,09 ⁽⁻⁾	2,25 ⁽⁻⁾	1,99 ⁽⁻⁾	1,45 ⁽⁻⁾	0,76 ⁽⁻⁾
RB86-7515	11,04	21,20	3,03	2,22	1,55	0,98 ⁽⁺⁾
CT99-1902	8,44	18,00	2,78	2,33	1,73	0,92
(+) : Maior valor			(-) : Menor valor			

Os valores de concentração de xilose obtidos após hidrólise com ácido diluído são semelhantes ao encontrados na literatura. Rodrigues et al. (2010) obtiveram basicamente os mesmos valores (19,2 g/L) utilizando 100 mg H_2SO_4 por grama de bagaço a 121 °C enquanto o presente trabalho apresentou, em média 19,7 g/L para as cinco variedades de bagaço utilizando, H_2SO_4 diluído a 2% (equivalente a 250 mg/g de bagaço). A concentração de glicose encontrada no presente trabalho (9,9 g/L, em média) apresentou valores superiores aos citados pela literatura e, assim como, a concentração de inibidores.

Embora a solubilização da biomassa esteja diretamente relacionada ao aumento da temperatura e concentrações ácidas mais elevadas, suas utilizações não contribuíram para uma maior remoção da hemicelulose. Tendo em vista a utilização integral dos açúcares presentes no bagaço de cana, torna-se necessária a utilização de um pré-tratamento ácido de condições mais brandas, uma vez que o aumento dos parâmetros contribuiu para a solubilização parcial da celulose, assim como uma maior concentração de inibidores no meio. (ALVIRA et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A acessibilidade da celulose está relacionada com a remoção da hemicelulose e da lignina, pois reduz a recalcitrância do material, facilitando, deste modo, o acesso das enzimas celulolíticas à celulose, aumentando a recuperação de açúcares presentes no material e, conseqüentemente, a produção de etanol (ALVIRA et al., 2010; GOTTSCHALK, OLIVEIRA; BON, 2010).

5.2.1.1 Solubilização da biomassa tratada com ácido diluído

Amostras das variedades de bagaço de cana-de-açúcar, submetidas à hidrólise com H_2SO_4 diluído (2% m/v), foram filtradas e, em seguida, lavadas exaustivamente com água destilada. Os materiais foram secos à temperatura ambiente e aferidos quanto à umidade em balança de infravermelho marca Bel-engineering modelo TopRay. Em seguida, verificou-se os percentuais de solubilização dos mesmos (Tabela 5).

Tabela 5 – Solubilização das diferentes variedades de cana-de-açúcar após tratamento ácido.

Variedade	Presente estudo ¹			Canilha (2011) ¹ (%)	Rocha (2011) ² (%)
	Massa seca inicial (g)	Massa seca final (g)	Solubilização da biomassa (%)		
CTC-9	32,92	18,11	44,99		
CT99-1906	32,78	17,97	45,18		
SP81-3250	33,11	18,33	44,64	42,7	35%
RB86-7515	33,08	19,19	41,99		
CT99-1902	32,83	18,79	42,77		

Os valores de solubilização da biomassa encontram-se entre 41,99% (RB86-7515) e 45,18% (CT99-1906), próximos aos valores de 42,7% encontrados por Canilha et al. (2011), que utilizou os mesmos parâmetros para hidrólise ácida desta biomassa. Ainda, os valores encontrados são consideravelmente maiores que os encontrados por Rocha et al. (2011), que utilizou fatores de concentração ácida menores que o presente estudo, demonstrando que os fatores são determinantes para a solubilização da biomassa, em específico da hemicelulose, que possui regiões amorfas facilmente hidrolisadas em altas temperaturas (ALVIRA et al. 2010; GÍRIO et al., 2010).

A solubilização da hemicelulose é de fundamental importância para a produção de etanol lignocelulósico, pois além de fragilizar a estrutura vegetal e facilitar a acessibilidade das enzimas à celulose, gera um caldo rico em açúcares. Esses açúcares, em condições adequadas, podem ser metabolizados por micro-organismos fermentadores de pentoses e convertidos em etanol (GIRIO et al, 2010).

5.3 HIDRÓLISE ALCALINA DA CELULIGNINA COM NaOH DILUÍDO

5.3.1 Solubilização da biomassa tratada com base diluída

As amostras das variedades de celulignina, submetidas à hidrólise com NaOH diluído (1% m/v), foram filtradas à vácuo e, em seguida, lavadas exaustivamente com água destilada. Os materiais foram secos à temperatura

ambiente e aferidos em balança de infravermelho quanto à umidade. Em seguida, foram determinados os percentuais de solubilização da biomassa (Tabela 6), os quais apresentaram valores entre 12,45% (CT99-1906) e 16,57% (CT99-1902).

Tabela 6 – Solubilização da biomassa após tratamento com NaOH diluído.

Variedade	Massa seca inicial (g)	Massa seca final (g)	Solubilização da biomassa (%)
CTC-9	21,61	18,36	15,04
CT99-1906	21,68	18,62	14,11
SP81-3250	21,76	19,05	12,45
RB86-7515	21,73	18,98	12,66
CT99-1902	21,72	18,12	16,57

5.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar, de diferentes variedades e condições (extraído, celulignina e celulose) foram caracterizadas quanto a seus compostos químicos (teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), assim como a determinação do balanço de massa dos mesmos.

5.4.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

A composição química das variedades de bagaço de cana *in natura* em estudo foi de: glucana (35,49% a 38,43%); xilana (18,71% a 20,3%); arabinana (2,44% a 3,11%); grupos acetila (0,87% a 1,7%); lignina solúvel (12,95% a 14,62%); lignina insolúvel (19,8% a 21,10%); cinzas (0,58% a 0,8%). Não foram encontradas concentrações consideráveis de ácido fórmico nas amostras *in natura*.

Deste modo, a composição mássica da matéria *in natura*, apresentada na Tabela 7, demonstra percentuais de celulose (38,96% a 42,8%); hemicelulose

(23% a 25,37%), lignina (33,2% a 34,42%) e cinzas (0,58% a 0,8%). Os balanços de massa do bagaço *in natura* apresentaram valores entre 96,12% e 102,97%.

Tabela 7 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar *in natura*.

Variedades	Bagaço <i>In natura</i>				Balanço (%)
	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)	
CTC-9	38,96	23,78	34,15	0,62	97,50
CT99-1906	39,31	23,00	33,23	0,58	96,12
SP81-3250	42,80	24,71	33,20	0,80	101,51
RB86-7515	40,58	23,48	33,55	0,75	98,36
CT99-1902	42,53	25,37	34,42	0,65	102,97

Os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* apresentam valores de celulose, hemicelulose e lignina dentro dos valores encontrados na literatura, embora apresentem um teor de cinzas consideravelmente menor (GOUVEIA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010). Além de fazerem parte da composição químico-estrutural dos materiais lignocelulósicos, o percentual de cinzas supostamente está relacionado a fatores como a técnica de colheita, transporte e armazenamento da biomassa. A cana-de-açúcar *in natura* apresenta em sua composição a sacarose, resultante do processo de moagem na indústria, além de outros componentes não estruturais, como ceras e graxas (FENGEL; WEGENER, 1989). Para a realização de uma análise composicional adequada da biomassa, esses componentes devem ser devidamente removidos.

5.4.2 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar extraído com água seguido de etanol

Para os bagaços extraídos com água seguido de etanol, a composição química variou em: glucana (37,52% a 39,99%); xilana (20,73% a 23,63%); arabinana (2,64% a 3,48); grupos acetila (1,01% a 2,71%); lignina solúvel (4,38% a 6,14%); lignina insolúvel (19,58% a 21,51%); cinzas (0,37% a 0,48%); extrativos

(9,02% a 11,07%). Não foram detectadas concentrações consideráveis de ácido fórmico nas condições de análise utilizadas.

Conforme demonstrado na Tabela 8, as variedades de bagaço extraído apresentam composições químicas de celulose (37,78% a 39,8%); hemicelulose (26,28% a 29,29%), lignina (23,96% a 27,6%); cinzas (0,37% a 0,48%) e extrativos (9,02% a 11,07%). Os balanços de massa do bagaço extraído apresentaram valores entre 96,38% e 104,57%.

Tabela 8 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas à extração com água, seguida de etanol.

Variedades	Componentes estruturais				Extrativos (%)	Balanço (%)
	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)		
CTC-9	37,78%	27,07%	25,67%	0,41%	9,02%	99,94
CT99-1906	39,49%	26,99%	26,26%	0,48%	10,70%	103,92
SP81-3250	38,15%	26,95%	26,09%	0,37%	9,38%	100,93
RB86-7515	38,91%	26,28%	27,60%	0,46%	11,07%	104,32
CT99-1902	39,80%	29,29%	23,96%	0,46%	11,05%	104,57

Quando comparadas com suas respectivas variedades *in natura*, as amostras de bagaço extraído com água e etanol apresentaram teores de celulose e hemicelulose semelhantes. Porém, ao se observar o percentual de lignina presente nos materiais extraídos com água, seguida de etanol, notou-se percentuais consideravelmente inferiores (em até 10%), quando comparados com os materiais *in natura*.

Os valores químico-composicionais dos bagaços extraídos condizem com aqueles apresentados pela literatura, embora apresentem percentuais ligeiramente variados. Canilha et al. (2011), encontraram valores de celulose (45%), hemicelulose (25,8%), lignina (19,1%) e cinzas (1%) em biomassa extraída com água, seguida de etanol. Gouveia et al. (2009), que apresentou valores de 42,8 de celulose; 25,8 de hemicelulose e 22,1% de lignina e 1,4% de cinzas, assim como Rocha et al. (2011), que observou, em bagaço extraído apenas com etanol, valores de 45,5%; 27%; 21,1 e 2,2% respectivamente. Da mesma forma, Brienzo et al. (2009), apresentaram como composição mássica 42,4% de celulose, 25,2% de hemicelulose, 19,6% de lignina e 1,6% de cinzas.

Os percentuais de celulose apresentados neste estudo se encontram ligeiramente menores (39%) em relação àqueles citados pela literatura (44%, em media), enquanto os percentuais de lignina se encontram ligeiramente maiores (25,9%). Embora as variedades de bagaço de cana-de-açúcar não tenham diferenciado entre si quanto à composição químico-estrutural, essa variação pode, hipoteticamente, se dar ao fato de que, por se tratarem de amostras de bagaço de diversas regiões do Brasil, estão sujeitas a condições edafoclimáticas diferenciadas (suplementação e tipo de solo, incidência pluviométrica), acarretando em formação composicional diferenciada (MAULE; MAZZA; MARTHA JR, 2001). A remoção de componentes extrativos com água, seguida de etanol demonstra-se eficaz para a obtenção de uma biomassa mais condizente com o conteúdo real de celulose, hemicelulose e lignina.

5.4.1 Caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com H_2SO_4 diluído (celulignina)

As amostras de celulignina das diferentes variedades de bagaço estudadas apresentaram variação composicional em: glucana (51,56% a 54,17%); xilana (3,08% a 7,48%); arabinana (0,91% a 1,25%); lignina solúvel (1,42% a 2,43%); lignina insolúvel (34,15% a 37,08%); cinzas (0,45% a 0,65%). As amostras de celulignina não apresentaram concentrações consideráveis de ácido fórmico e ácido acético para as amostras.

A Tabela 9 apresenta a composição química das diferentes variedades de celulignina, apresentando percentuais mássicos de celulose (51,88% a 57,11%); hemicelulose (3,31% a 8,87%), lignina (36,59% a 38,84%); cinzas (0,45% a 0,57%). Os balanços de massa da celulignina apresentaram valores entre 95,25% e 100,83%.

Tabela 9 – Composição mássica das diferentes variedades de celulignina.

Variedades	Componentes estruturais				Balanço (%)
	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)	
CTC-9	57,11	5,04	38,16	0,52	100,83
CT99-1906	51,88	3,31	37,95	0,45	95,25
SP81-3250	54,43	5,07	37,08	0,57	97,15
RB86-7515	53,58	4,23	37,11	0,65	95,57
CT99-1902	53,86	8,87	36,12	0,52	99,37

Canilha et al. (2011) e Rocha et al. (2011), apresentaram, respectivamente, valores semelhantes de celulose (56,5% e 58,06%), hemicelulose (8,8 e 3,79%) e lignina (30,7% e 32,38%), aos encontrados no presente estudo. Diferentemente, Gouveia et al. (2009), apresentou teores de 48,65% para celulose e 8,28% para hemicelulose, enquanto o presente estudo demonstrou maior percentual de celulose (em média, 54%) e teores de hemicelulose ligeiramente menores (5,3%).

Quando comparadas com suas respectivas amostras extraídas, as amostras de celulignina, obtidas após processo de hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído apresentaram grande remoção nos percentuais de hemicelulose (80% em média). Embora o processo empregado tenha solubilizado parte da celulose, devido à severidade do processo empregado, o alto conteúdo da mesma indica alto potencial para a conversão pela rota de sacarificação (ROCHA et al., 2011). A obtenção da celulignina após a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar é importante passo na sacarificação da biomassa, dado que grande parte da hemicelulose foi solubilizada e que esta remoção facilita o acesso das enzimas celulolíticas às microfibrilas de celulose, resultando em maior obtenção de açúcares e, conseqüentemente, maior produção de etanol por meio da fermentação dos açúcares obtidos (ALVIRA et al. 2010 HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

5.4.2 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH diluído (polpa celulósica)

Como último passo de tratamento avaliado, a celulignina deslignificada com hidróxido de sódio diluído (polpa celulósica), apresentou percentuais de glucana (69,23% a 76,49%); xilana (3,37% a 5,48%); arabinana (0,94% a 1,12%); lignina solúvel (0,72% a 0,97%); lignina insolúvel (10,06% a 16,93%); cinzas (0,25% a 0,39%). Assim como as amostras de celulignina, as amostras de celulose não apresentaram concentrações consideráveis de ácido fórmico e ácido acético.

A Tabela 10 apresenta a composição química das diferentes variedades da polpa celulósica, apresentando percentuais mássicos de celulose (74,64% a 80,44%); hemicelulose (4,65% a 7,35%), lignina (10,84% a 17,74%); cinzas (0,45% a 0,57%). Os balanços de massa da celulose apresentaram valores entre 96,55%% e 101,42%.

Tabela 10 – Composição mássica das diferentes variedades de polpa celulósica.

Variedades	Componentes estruturais				Balanço (%)
	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)	
CTC-9	80,44	5,51	15,02	0,32	101,29
CT99-1906	77,41	6,02	17,74	0,25	101,42
SP81-3250	75,27	7,35	16,52	0,29	99,42
RB86-7515	74,64	4,65	16,91	0,35	96,55
CT99-1902	79,62	6,83	10,84	0,39	97,69

Em um trabalho, Santos et al. (2012) observaram uma composição estrutural da polpa celulósica semelhante à encontrada no presente estudo, apresentando 81,8% de celulose, 6,4% de hemicelulose, e 3% de lignina com deslignificação de 91,1%. O presente estudo apresentou níveis superiores de lignina, com percentual de deslignificação, em média, de 58,7%, embora tenha sido utilizado tempo de residência de 30 minutos. Evidencia-se eficaz remoção da lignina pelo tratamento empregado, assim como a baixa remoção de celulose e da hemicelulose quando comparadas com o tratamento ácido (CARVALHEIRO;

DUARTE; GÍRIO, 2008). A remoção da lignina, bem como da hemicelulose, é de fundamental importância para uma sacarificação eficaz da celulose, pois expõe as fibrilas de celulose à ação de enzimas celulolíticas, aumentando a recuperação de glicose da biomassa (ALVIRA et al. 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SANTOS et al, 2012).

A Figura 19 demonstra o percentual da composição química das cinco variedades de bagaço de cana-de-açúcar estudadas, em diferentes condições de pré-tratamento:

Figura 19 – Composição mássica das diferentes variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.

Como demonstrado nos tópicos anteriores, todos os balanços de massa das cinco variedades e em todas as etapas deste estudo se encontraram em percentuais que variam entre 95,25% a 104,57%, comprovando que a técnica empregada se apresenta de modo adequado para a análise composicional de bagaço de cana-de-açúcar e encontra-se de acordo com o preconizado na literatura (GOUVEIA et al., 2009). As amostras de bagaço submetidas a diferentes tipos de pré-tratamento pouco variaram com relação ao percentual de cinzas, embora partes destes constituintes tenham sido solubilizados pelos processos empregados.

Em um estudo, Rocha et al. (2012) avaliou a composição química de 20 amostras de bagaço de cana-de-açúcar extraídas (43.1% de celulose; 25,2% de hemicelulose; 22,9% de lignina; 2,8% de cinzas e 4.3% de extrativos), e estas não apresentaram diferenças significativas em sua composição, evidenciando que análises de composições químicas não são suficientes para determinar as diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar.

De modo geral, as cinco variedades de cana-de-açúcar apresentadas neste estudo não demonstraram variação composicional de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. A variação composicional se demonstrou pequena (inferior a 5% para todas as amostras de um determinado pré-tratamento), embora, quando comparados com outros trabalhos da literatura apresentem variações composicionais consideráveis, devido ao fato da utilização de pré-tratamentos com variáveis diferenciadas. A utilização de outras técnicas analíticas da biomassa talvez seja necessária para demonstrar as diferenças composicionais de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

5.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES TRATAMENTOS

As diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar foram submetidas a processos de extração, hidrólise ácida e hidrólises alcalina e, posteriormente hidrolisadas por enzimas celulolíticas, visando a conversão da celulose, presente na biomassa, em glicose. Para a determinação dos açúcares redutores totais presentes no hidrolisado enzimático, foi empregada a metodologia descrita no

item 4.7.1 e as respectivas concentrações nos tempos de 6, 24, 30 e 48 h, apresentadas na Tabela 11. Os processos de tratamento da biomassa, descritos anteriormente, apresentaram variações nos percentuais composicionais de celulose, hemicelulose e lignina para as diferentes condições estudadas.

Tabela 11 – Açúcares redutores totais (g/L) obtidos após hidrólise enzimática de diversas variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.

Amostra	Açúcares redutores totais (g/L)											
	Bagaço extraído				Celulignina				Polpa Celulósica			
	6h	24h	30h	48h	6h	24h	30h	48h	6h	24h	30h	48h
CTC-9	7,44	8,71	9,23	9,36	10,33	15,93	16,43	19,36	19,27	25,13	26,42	31,53
CT99-1906	7,35	8,21	8,32	8,58	9,92	14,98	15,83	18,28	19,99	24,80	26,58	31,05
SP81-3250	7,16	8,24	8,47	8,60	9,59	16,45	18,56	18,76	20,28	26,32	26,94	32,02
RB86-7515	7,42	7,63	7,85	7,98	9,14	16,21	16,97	18,95	20,99	25,00	26,20	31,66
CT99-1902	7,68	9,16	9,42	9,46	10,69	18,15	19,23	19,60	21,12	25,26	27,46	31,05

Com o intuito de avaliar se as diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas apresentam variação quanto à sacarificação da celulose presente na biomassa, foi necessária a verificação por meio de procedimentos de hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas comerciais nas condições descritas no item 4.7.2.

Tabela 12 – Glicose obtida (g/L) do hidrolisado enzimático de diversas variedades de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.

Amostra	Glicose recuperada (g/L)											
	Bagaço extraído				Celulignina				Polpa Celulósica			
	6h	24h	30h	48h	6h	24h	30h	48h	6h	24h	30h	48h
CTC-9	1,33	1,35	1,51	2,01	6,11	13,41	14,32	14,99	16,99	23,63	24,84	31,77
CT99-1906	1,37	1,66	1,69	2,13	6,29	14,28	14,68	14,80	16,57	23,94	24,83	29,84
SP81-3250	1,47	1,70	1,77	2,10	5,95	14,31	14,50	15,19	16,00	22,45	23,37	30,11
RB86-7515	1,40	1,64	1,81	2,08	6,12	13,62	14,40	16,83	16,93	23,82	25,12	31,45
CT99-1902	1,42	1,70	1,79	2,14	6,12	12,39	13,17	13,94	16,95	22,72	25,21	30,69

Ao comparar as Tabelas 11 e 12, observou-se que a glicose representa praticamente a totalidade dos açúcares redutores presentes nas amostras. Isso se deve ao fato de que as enzimas comerciais utilizadas são altamente específicas para a conversão da celulose em glicose. A concentração de açúcares redutores totais apresentou variação quanto à biomassa utilizada. Maiores concentrações de açúcares redutores foram, em média, observadas na polpa celulósica (31,46 g/L) após as 48 horas de reação, enquanto as variedades de bagaço extraído apresentaram 7,41 g/L. Pressupõe-se que esses valores sejam ligeiramente maiores que os presentes nas concentrações de glicose, pois o método quantifica outros açúcares redutores, como a xilose e a celobiose (SOARES et al, 2011).

A presença da xilose no hidrolisado enzimático é observada pela quantificação de xilanases, responsáveis por clivar a longa cadeia de xilana contida no bagaço em unidades de xilobiose e xilose (DHILLON et al, 2011; MENDES et al, 2011, SANTOS et al, 2011). Embora as enzimas utilizadas apresentem alta especificidade com relação ao substrato, por se tratarem de produtos de síntese biológica, não são completamente puras e podem apresentar traços enzimáticos para a catálise de outros substratos (CAMPBELL, 2000; GOTTSCHALK, OLIVEIRA; BON, 2010).

As concentrações de glicose também variaram quanto ao tratamento empregado, sendo que as amostras extraídas e submetidas à hidrólise enzimática apresentaram uma pequena liberação de açúcares (2,1 g/L, em média) após 48 horas de reação, enquanto a polpa celulósica apresentou, em média, os maiores valores (30,77 g/L) para o mesmo período. Isso se deve ao fato do bagaço extraído apresentar baixa exposição das fibrilas de celulose à ação das enzimas celulolíticas, devido à presença da hemicelulose e da lignina (ALVIRA et al., 2010; LAUREANO-PEREZ et al., 2005). Ainda, o processo de extração empregado removeu, em maioria, apenas componentes não estruturais da biomassa (KLOCK et al., 2005).

A Figura 20 demonstra os percentuais de sacarificação dos açúcares redutores totais presentes nas cinco variedades de bagaço de cana-de-açúcar, assim como os percentuais de sacarificação da celulose em diferentes condições de tratamento nos tempos de 6, 24, 30 e 48 horas.

Figura 20 – Sacarificação da celulose (%) e Açúcares Redutores Totais – ART (%) das diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de tratamento.

As amostras de celulignina obtidas após hidrólise com ácido sulfúrico diluído, a partir das diferentes variedades de bagaço, apresentaram, em média, percentuais de conversão da celulose bem maiores em relação àqueles obtidos pela biomassa extraída ao término das 48 horas de exposição (50,4% e 9,7% respectivamente). Isso se deve ao fato da diminuição da recalcitrância da biomassa, devido à solubilização da hemicelulose pelo processo empregado e, conseqüentemente, maior acesso das enzimas celulolíticas à celulose presente na biomassa (GÍRIO et al., 2010).

Em outros estudos, resultados diferenciados quanto ao emprego da celulignina na hidrólise enzimática foram observados. Utilizando os mesmos parâmetros de pré-tratamento, Canilha et al. (2011) obtiveram menores

percentuais de sacarificação (33,7%) nas primeiras 24 horas quando comparados com o presente estudo (45,26%), embora tenham utilizado menor carga enzimática. Rocha et al. (2011) obtiveram resultados bem superiores para a sacarificação da celulose (75%), embora tenha utilizado condição de pré-tratamento com temperaturas mais elevadas e uma quantidade superior de β -glicosidase. A ação das β -glicosidases nas reações enzimáticas é de fundamental importância para uma eficaz sacarificação da celulose, pois clivam a celobiose em monômeros de glicose, evitando seu acúmulo e consequente inibição pelo produto (DHILLON et al, 2011). O acúmulo de celobiose pela ausência de β -glicosidases inibe as enzimas endoglucanases e exoglucanases impedindo que as reações intermediárias da sacarificação da celulose ocorram (CAMPBELL, 2000; GOTTSCHALK, OLIVEIRA; BON, 2010; SANTOS et al, 2011).

As variedades de polpa celulósica empregadas neste estudo, apresentaram os maiores percentuais de sacarificação da celulose no tempo de 48 h, com valores que variaram de 71,09% (CTC-9) a 75,85% (RB-7515). A polpa celulósica foi o substrato que apresentou maior aumento no percentual de sacarificação entre as amostras nos tempos de 30 e 48 horas (em média 14,75%), enquanto as amostras de celulignina (3,11%) e bagaço extraído (1,76%) apresentaram valores bem menores.

Evidencia-se que o emprego de um pré-tratamento adequado é de fundamental importância para o aumento na sacarificação da biomassa, quando há o emprego de enzimas celulolíticas (SOCCOL, 2010). Embora os experimentos realizados neste estudo possuam naturezas comparativas, e tenham visado observar se diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar, tratadas em condições experimentais idênticas, nenhuma mudança significativa foi observada ao confrontar os percentuais de sacarificação da celulose das diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar utilizando condições experimentais diversas.

6 CONCLUSÕES

Com relação aos pré-tratamentos empregados e à caracterização química das variedades de bagaço de cana de açúcar, concluiu-se que:

- As cinco variedades de bagaço *in natura* apresentaram, em média, composições químico-estruturais de celulose (40,84%), hemicelulose (24,07%), lignina (33,71%) e cinzas (0,68%). Os valores composicionais apresentados estão em conformidade aos trabalhos citados pela literatura, apresentando baixo percentual de variação;
- A extração dos bagaços de cana-de-açúcar com água, seguida de etanol foi eficaz para a remoção dos compostos não-estruturais, uma vez que as amostras apresentaram, em média, composições de celulose (38,83%), hemicelulose (27,32%), lignina (25,92%), cinzas (0,43%) e extrativos (10,24%). Evidencia-se que a presença de extrativos interfere na quantificação de lignina presente nas amostras e, conseqüentemente, no emprego de uma caracterização com valores mais precisos.
- O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* removeu com eficiência a hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar (78,8% de remoção), apresentando um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares, que podem ser utilizados por micro-organismos fermentadores de pentoses. Quando caracterizados quimicamente, as variedades de celulignina apresentaram, em média, valores de celulose (54,17%), hemicelulose (5,30%), lignina (37,28%) e cinzas (0,54%);
- O pré-tratamento com hidróxido de sódio diluído removeu com eficiência parte da lignina presente na celulignina, sendo que a polpa celulósica apresentou, em média, valores de celulose (77,48%), hemicelulose (6,07%), lignina (15,40%) e cinzas (0,32%);
- Nenhuma das cinco variedades apresentadas neste estudo demonstrou diferenças químico-composicionais significantes quando comparadas com

outras amostras em um determinado pré-tratamento, sendo esta diferença menor que 5%. Deste modo, evidencia-se que o emprego da técnica de caracterização descrita não é capaz de demonstrar alterações estruturais entre as diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Com relação aos pré-tratamentos empregados e à sacarificação enzimática das variedades de bagaço de cana-de-açúcar, conclui-se que:

- As amostras de bagaço de cana extraído demonstraram as menores concentrações de açúcares redutores (8,79 g/L), bem como os percentuais de sacarificação da celulose (9,7%) para as 48 horas de reação, enquanto que as amostras de polpa celulósica apresentaram as maiores concentrações (33,57 g/L) e percentuais (72,87%). Isso se deve ao fato das amostras de bagaço de cana-de-açúcar extraído apresentarem grande integridade estrutural, dificultando o acesso das enzimas celulolíticas à celulose, ao passo que a polpa celulósica apresenta um material mais fragilizado, devido à remoção de grande parte da hemicelulose e da lignina, e consequentemente, maior exposição das microfibrilas.
- A utilização de pré-tratamentos para solubilização dos componentes estruturais, como a hemicelulose e a lignina, está diretamente relacionada ao aumento da sacarificação da celulose.
- Nenhuma das cinco variedades apresentadas neste estudo demonstrou sacarificação da celulose significativamente elevada quando comparadas com outras amostras em um determinado tratamento, sendo as diferenças menores que 5%. Evidenciou-se que o tratamento enzimático utilizando diferentes variedades de cana-de-açúcar não afetou significativamente a recuperação dos açúcares, nas condições descritas nesse estudo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Caracterização e digestibilidade enzimática da holocelulose, obtida a partir da hidrólise alcalina do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Análise químico-estrutural de outras variedades híbridas de cana-de-açúcar quanto à composição em diferentes condições experimentais pré-definidas.

Realização de sacarificação e fermentação simultânea, utilizando a celulignina e a polpa celulósica nas condições descritas.

Utilização de FTIR, MEV e Raios X para verificação composicional das estruturas de diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar em condições experimentais pré-definidas.

REFERÊNCIAS

ADEL, A. M.; EL-WAHAB, Z. H. A.; IBRAHIM, A. A.; AL-SHEMY, M. T. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.101, p.4446–4455, 2010.

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.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BALS, B.; MURNEN, H.; ALLEN, M.; DALE, B. Ammonia fiber expansion (AFEX) treatment of eleven different forages: Improvements to fiber digestibility in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v.155, p.147–155, 2010.

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.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v.27, n.3, p.399–403, 2004.

CAMPBELL, M.K. **BIOQUÍMICA**. Porto Alegre: ARTMED Ed., Porto Alegre. 2000. 751p.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S. ALMEIDA & SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. A. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, dez–jan, 2009-2010.

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

CARASCHI, J. C.; FILHO, S. P. C.; CURVELO, A. A. S. Preparação e caracterização de polpas para dissolução obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.24–29, jul–set, 1996.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.849–864, 2008.

CARVALHO, W; CANILHA, L; FERRAZ, A; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2191–2195, 2009.

CAUX, L. S. de; **Modificações da Celulose Kraft Branqueada de Eucalipto por Tratamento Térmico e Radiação Ultravioleta**. 2009. 146p, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). UFOP, Minas Gerais, 2009.

CHENG, K.-K.; CAI, B.-Y.; ZHANG, J.-A.; LING, H.-Z.; ZHOU, Y.-J.; GE, J.-P.; XU, J.-M. Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.105–109, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **Federation of European Microbiology Societies**, v.29, p.3–23, 2005.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Pecuária e Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-Açúcar, Safra 2011/2012, Terceiro Levantamento, Dezembro/2011**, Disponível em: www.conab.com.br. Acessado em: 13/12/2011.

CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). **Projetos e pesquisas**. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br/> Acessado em: 1/12/2011.

DAVISON, A.; BLAXTER, M. Ancient Origin of Glycosyl Hydrolase Family 9 Cellulase Genes. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.5, p.1273–1284, 2005.

DHILLON, G. H.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial crops and Products**, v.34, p.1160–1167, 2011.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; FILHO, R. M.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v.87, p.1206–1216, 2009.

DING S-Y, HIMMEL M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v.54 n.3, p.597– 606, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization) – Food and Agricultural commodities production, 2010. **Production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acessado em: 05/12/2011.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. da; SILVA, F. C. da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v.32, n.3, p.623–638, 2009.

FERREIRA, V. F.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.23, n. 4, p.611-619, 2005.

FILHO, M. L.; LIMA, J. O. G. Massas de Ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em Cana-de-Açúcar: Número de Ovos e Porcentagem de Parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em Condições Naturais. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.483–488, 2001.

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

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; JUNIOR, N. S. M. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathology**, v.33, n.2, p.152–156, 2007.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775–4800, 2010.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, CASSIO, V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.52–61, 2005.

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

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v.51, p.72–78, 2010.

GRÜNWALD, S.; PILHOFER, M.; HÖLL, W. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.25–34, 2010.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M. GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.12, p.549–556, 2006.

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-RENDÓ, 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.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN, R. E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.602-619, 2003.

HU, Z.; WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.369–378, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Brasil – banco de dados de países**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acessado em: 03/06/2010.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p

KABEL, M. A.; BORNE, H.; VINCKEN, J.-P. VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v.69, p.94–105, 2007.

KANNA, M.; YANO, S.; INOUE, Y.; FUJII, T.; SAWAYAMA, S. Enhancement of b-xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticus*. **AMB express**. v.1, n.15, p.1–8, 2011 doi:10.1186/2191-0855-1-15.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. Curitiba: UFPR, 2005.86p.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v.101, p. 1036-1043, 2010.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H., DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry Biotechnology**. p.1081–1099, 2005.

LIU, C.-F.; SUN, R.-C.; QIN, M.-H.; ZHANG, A.-P; REN, J.-L.; XU, F.; YE, J.; WU, S.-B. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**.v.26, p.212–219, 2007.

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, n.3, p. 506–577, 2002.

MACHADO, L. A.; HABIB, M. *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae): praga da cultura de cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.375–381, jul–set, 2006.

MAEDA, R. N.; SERPA V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR., N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic Hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, n.5, p.1196–1201, 2011. doi:10.1016/j.procbio.2011.01.022.

MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do Bagaço de Cana-de-açúcar Tratado com Reagentes Químicos e Pressão de Vapor. **Revista brasileira de zootecnia**. v.29, n.4, p.1196-1204, 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.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agrícola**, v.58, n.2, p.295–301, abr–jun, 2001.

MARTONE, P. T.; ESTEVEZ, J. M.; LU, F.; RUEL, K.; DENNY, M. W. SOMERVILLE, C.; RALPH, J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. **Current Biology**, v.19, p.169–175, 2009.

MEDEIROS, M. B. de. Metabolismo da Celulose em Isoptera. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. n.33, jul-dez, 2004.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic Hydrolysis of Chemithermomechanically Pretreated Sugarcane Bagasse and Samples with Reduced Initial Lignin Content. *Biotechnology Progress*.v.27, n.2, p.395–401, 2011. DOI 10.1002/btpr.553.

MIRANDA, T. H. **Relações entre Atributos Físicos e Biológicos do Solo após Operações de Colheita e Aplicação de Vinhaça em Cana-De-Açúcar**. 2009. 81p, Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). UFRPE, Recife, 2009.

MONSANTO (Produtos para agricultura - sementes de soja, milho, algodão. Biotecnologia e transgênicos). **Cana-de-açúcar** Disponível em: <http://www.monsanto.com.br/produtos/cana-de-acucar/cana-de-acucar.asp> Acessado em: 25/01/2011.

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

MULINARI, D. R.; VOORWALD, H. J. C.; CIOFFI, M. O. D.; SILVA, M. L. C. P.; CRUZ, T. G.; SARON, C. Sugarcane bagasse cellulose/HDPE composites obtained by extrusion. **Composites Science and Technology**. v.69, p.214–219, 2009.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 376-380, 1944.

NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; GRIGNON-DUBOIS, M.; PARDON, P.; LESCURE, M. H.; Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. **Phytochemistry** v.61, 721–726, 2002.

PALMA, M. B. **Produção De Xilanases Por *Thermoascus aurantiacus* em Cultivo em Estado Sólido**. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). UFSC, Santa Catarina, 2003.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5256-5265, 2008.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.633–670, 2011. doi:10.1016/j.biombioe.2010.10.018.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p.274–279, 2012. doi:10.1016/j.indcrop.2011.07.010.

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

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Industrial Microbiology Biotechnology**, v.30, p.279–291, 2003.

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

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Biophysics and Molecular Biology**, v.89, p.246–291, 2005.

SARROUH, B. F.; PHILIPPINI, R. R.; SILVA, S. S. da. Lignocellulosic Bioethanol Production: Perspectives and Challenges . **International Review of Chemical Engineering**, v.1, n.6, p.614-622, 2009.

SANTOS, J. R. A.; LUCENA, M. S.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA E. R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.36, p.584–588, 2012. doi:10.1016/j.indcrop.2011.10.00.

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

SILVA, V. F. N. da. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol lignocelulósico**. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, 2009.

SINGH, R.; SINGH, S.; TRIMUKHE, K. D.; PANDARE, K. V.; BASTAWADE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Lignin–carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, n.62, p.57–66. 2005.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of extratives in biomass**, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Technical report, 2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>. Acessado em: 10 jul. 2011.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Technical report, 2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>. Acessado em: 10 jul. 2011.

SOARES, I. B.; TRAVASSOS J. A.; BAUDEL, H. M.; BENACHOUR, M.; ABREU, C. A. M. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.670–675, 2011

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

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

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

SUN, J. X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v.84, 331–339, 2004

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

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.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar). **CTC volta a ter Copersucar no comando**. Disponível em: <http://www.unica.com.br> Acessado em: 25/01/2011.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar). **Carros flex representam 92% das vendas de março, último mês de IPI reduzido**. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acessado em: 29/05/2010.

VIDAL, W. M.; VIDAL, M. R. R. **Botânica – organografia; quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas**. Viçosa: UFV Ed.; 2003. 124 p.

WANG, Y.; YUAN, H.; WANG, J.; YU, Z. Truncation of the cellulose binding domain improved thermal stability of endo- β 1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* JA18. **Bioresource Technology**, v.100,p.345–349, 2010.

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

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.

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.

APÊNDICE

APÊNDICE A – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS A DIVERSOS TRATAMENTOS.

Encontram-se a seguir, os gráficos de recuperação dos açúcares redutores totais (ART) e da glicose, em g/L, das cinco variedades de cana-de-açúcar, submetidas a diversos tratamentos, para a sacarificação da biomassa.

Figura A. 1 Hidrólise enzimática de diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar submetidas a diversos tratamentos visando a sacarificação da biomassa (g/L).