UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDA MACHADO MENDES

**Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado
químio-mecanicamente**

Lorena, 2010

FERNANDA MACHADO MENDES

**Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado
químico-mecanicamente**

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

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

Lorena, 2010

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

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

Mendes, Fernanda Machado

Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente / Fernanda Machado Mendes ; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres. – Lorena: 2010.
93 p. : il.

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

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Lignina 3. Celulases 3. Hidrólise enzimática 4. Processo quimio-mecânico. I. Título

664.113 - CDU

*Aos meus pais Célio e Marta e
ao meu namorado Fernando,
pelo amor e presença constante.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

Aos meus familiares, pelo amor, apoio e companheirismo.

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

A Prof^a. Dr. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela orientação, atenção, ensinamentos, compreensão, dedicação e paciência.

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

A amiga Joseana, pela sincera amizade, carinho, companheirismo e ajuda durante todos esses anos.

Aos amigos Michel, Germano e Zé Moreira, pelo apoio, amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar ao longo desse trabalho.

Aos amigos, Paula, Dani Gurpi, Dani Cortez, Sérgio, Débora, Celso e Victor, pela amizade e apoio.

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

A EEL-USP, pela oportunidade de realizar o Mestrado.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. 2010. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Métodos que convertem o bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis são geralmente compostos por duas etapas principais: pré-tratamento para degradar a estrutura da planta e uma etapa de hidrólise enzimática ou química para converter as cadeias poliméricas em açúcares. Cada tecnologia de pré-tratamento tem um mecanismo diferente de ação sobre a estrutura do bagaço induzindo modificações físicas e/ou químicas, que são necessárias devido a presença de hemicelulose e lignina na parede celular da planta, o que impede o acesso das celulasas nas partes internas do substrato. No presente trabalho, o processo quimio-mecânico foi utilizado para pré-tratar o bagaço de cana com o objetivo de aumentar a acessibilidade na parede celular pelas enzimas hidrolíticas. O processo associa a vantagem da remoção de um ou mais componentes do bagaço e o aumento da área superficial por trituração. Após o tratamento quimio-mecânico, rendimento do processo com adição de álcali foi de 91% e com sulfito alcalino de 75%, que corresponde à remoção de 33% e 53% de lignina e 13% e 29% da hemicelulose, respectivamente. A conversão de celulose de amostras pré-tratadas com álcali e sulfito-alcalino atingiu 50% e 85%, respectivamente, após 96 h de hidrólise enzimática. Duas amostras de bagaço com menor teor de lignina que a amostra proveniente da usina foram pré-tratadas com NaOH e refinadas. Uma das amostras com 14,2% de lignina foi obtida pela deslignificação seletiva com clorito de sódio e a outra com 19,2% de lignina foi selecionada em um programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar e neste trabalho foi denominado de híbrido. As amostras com menor teor inicial de lignina foram hidrolisadas mais rapidamente nas primeiras 24 h de digestão enzimática. Por exemplo, a hidrólise enzimática da amostra com o menor teor de lignina inicial (14,2%) alcançou a conversão de celulose 64%, após apenas 24 h de hidrólise em comparação aos 30% observado para o bagaço de usina que continha um teor inicial de lignina de 24,4%. Um estudo adicional foi feito, em que o bagaço da usina e os híbridos foram pré-tratados quimio-mecanicamente com diferentes concentrações de hidróxido de sódio e sulfito. Foram avaliadas três concentrações de NaOH (2,5%, 3,75% e 5%) em combinação com sulfito de sódio (5%, 7,5% e 10%), mantendo-se a proporção de 1:2 de reagentes, respectivamente. As polpas obtidas do bagaço híbrido foram hidrolisadas mais facilmente que as polpas obtidas do bagaço da usina pré-tratadas na mesma concentração de sulfito-NaOH. O tempo necessário para hidrolisar 70% da celulose do bagaço híbrido foi a metade daquele necessário para hidrolisar o bagaço de usina. O menor teor de lignina e a presença de grupos sulfônicos podem ser fatores relevantes na digestibilidade enzimática do bagaço, portanto, plantas com baixo teor de lignina podem ser pré-tratadas por processos alcalinos relativamente brandos produzindo substratos mais facilmente hidrolisáveis por celulasas.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, Lignina, Celulasas, Hidrólise enzimática, Processo quimio-mecânico.

ABSTRACT

MENDES, F. M. **Enzymatic digestibility of chemomechanical pretreated sugarcane bagasse**. 2010. 99p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Methods that convert sugarcane bagasse into fermentable sugars are generally comprised of two main steps: a pretreatment to degrade the plant structure and an enzymatic or chemical hydrolysis step to convert the polymeric chains into monomeric sugars. Each pretreatment technology has a different mechanism of action on the bagasse structure inducing physical and/or chemical modifications, which are necessary because the presence of hemicellulose and lignin in the cell walls prevents cellulases from accessing inner parts of the substrate. In this present work, chemomechanical processing was used to pretreat sugarcane bagasse with the aim of increasing cell wall accessibility to hydrolytic enzymes. The process combines the advantage of removal one or more components of bagasse and the increase in surface area by refining. After chemomechanical treatment, the yield of the process with the addition of alkali was 91% and 75% with alkaline-sulfite, corresponding to the removal of 33% and 53% of lignin and 13% and 29% of hemicellulose, respectively. Cellulose conversion of the alkaline- and alkaline/sulfite-chemomechanical pretreated samples reached 50% and 85%, respectively, after 96 h of enzymatic hydrolysis. Two samples of pulp with lower lignin content than the sample from the mill were pretreated with NaOH and refined. One of the samples with 14.2% of lignin was obtained by selective delignification with sodium chlorite and the other with 19.2% of lignin was selected in a breeding program of cane sugar and at this work has been called hybrid. Samples with lower initial lignin content hydrolyzed faster in the first 24 h of enzymatic digestion. For example, enzymatic hydrolysis of the sample with the lower initial lignin content (14.2%) reached 64% cellulose conversion after only 24 h of hydrolysis as compared to the 30% observed for the mill-processed bagasse containing an initial lignin content of 24.4%. An additional study was done, in which the mill bagasse and the hybrid were chemomechanically treated with different concentrations of NaOH and sulfite. Three concentrations of NaOH were evaluated (2.5%, 3.75% and 5%) in combination with sodium sulfite (5%, 7.5% and 10%), keeping the 1:2 ratio of reagents, respectively. Pulps obtained from hybrid bagasse were hydrolyzed more easily than the pulp obtained from the mill-processed bagasse treated in the same concentration of sulfite-NaOH. The time required to hydrolyze 70% of hybrid bagasse was half that required to hydrolyze the mill-processed bagasse. The lower lignin content and the presence of sulfonic groups may be important factors in the enzymatic digestibility of bagasse, therefore, plants with low lignin content can be pre-treated by relatively mild alkali processes producing substrates more easily hydrolysable by cellulase.

Keywords: Sugarcane bagasse, Lignin, Cellulases, Enzymatic hydrolysis
Chemimechanical process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A - Ilustração das diferentes regiões anatômicas da cana de açúcar, com áreas representativas do córtex e da medula. B - Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar aumentado 260 vezes. Em destaque, os feixes de fibras, vasos e parênquima.....	24
Figura 2: Estrutura de uma fibra vegetal. (SILVA et al.,2009).....	25
Figura 3: Estrutura da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL;WEGENER,1989).....	26
Figura 4: Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopirranose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil (PITARELLO, 2007).....	28
Figura 5: Lignina de madeira dura (Poplar) (RALPH et al., 2004).....	30
Figura 6: Quebra da ligação éster da hemicelulose em meio alcalino.	32
Figura 7: Formação da metileno quinona (SJOSTROM, 1993).....	33
Figura 8: Reação esquemática da introdução de grupos sulfônicos na lignina durante polpação pelo processo sulfito (BENAR, 1996).	34
Figura 9: Estrutura química do lignosulfonato (FREDHEIM, 2003).....	35
Figura 10: Alterações estruturais (corte, fibrilação externa e fibrilação interna) na fibra devido ao refinamento. O corte e a fibrilação externa ocasiona a formação de finos durante o processo	36
Figura 11: Modo de ação de celulasas sobre a celulose (MARTINS, 2005).	38
Figura 12: Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de <i>T. reesei</i> (DIVNE et al, 1994).....	40
Figura 13: Estrutura química da hemicelulose e pontos de ação das enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação do polímero hemicelulósico (KUMAR, 2008).....	42

Figura 14: Visão simplificada dos principais mecanismos que limitam a hidrólise enzimática da celulose: 1) Inibição da β -glicosidase e da celobiohidrolase pelos produtos (glucose e celobiose, respectivamente); 2) Adsorção improdutivo da celobiohidrolase à celulose; 3) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela hemicelulose; 4) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela lignina; 5) Adsorção inespecífica das enzimas à lignina; 6) Perda da atividade enzimática (JORGENSEN, KRISTENSEN, FELBY, 2007). 44

Figura 15: Etapas de impregnação (A), de cozimento (B) e de refino (C) do processo químio-mecânico..... 50

Figura 16: Grau de Freeness em função da energia consumida no refinador, (-▲-) bagaço refinado, (-◆-) bagaço tratado com NaOH-refinado e (-■-) bagaço tratado com NaOH-sulfito e refinado..... 59

Figura 17: Microscopia óptica das fibras de bagaço submetida a vários pré-tratamentos e hidrólise enzimática. Fibra do bagaço de usina refinado (a), Fibra do bagaço de usina pré-tratado com NaOH (b), fibra do bagaço de usina pré-tratado com sulfito-alcalino (c), fibra do bagaço refinado após 96hs de hidrólise enzimática (d,e ,f), fibra parcialmente deslignificada e tratada com NaOH (g),fibra do bagaço híbrido tratado com NaOH (h) e fibra do bagaço híbrido tratado com NaOH/Sulfito (i). 63

Figura 18: Hidrólise enzimática da celulose (a) e da hemicelulose (b) do bagaço de cana-de-açúcar de usina: (-▲-) não-tratado, (-◆-) tratado mecanicamente, (-■-) tratado químio-mecanicamente com NaOH e (-●-) tratado químio-mecanicamente com NaOH-sulfito..... 68

Figura 19: Correlação entre a remoção de lignina (-●-) e de hemicelulose (-■-) durante o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar de usina e a eficiência da hidrólise enzimática.....69

Figura 20: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por processo químio-mecânico alcalino: (-●-) bagaço de usina; (-▲-) bagaço híbrido e (-■-) bagaço parcialmente deslignificado. Os símbolos vazios referem-se à mesma amostra, porém com acréscimo de enzimas após 48hs de reação.....72

Figura 21: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar de usina pré-tratado por processo químio-mecânico: (-●-)2,5% de NaOH e 5%de sulfito; (-■-) 3,75% de NaOH e 7,5% de sulfito (-▲-) e 5% de NaOH e 10%sulfito..... 77

Figura 22: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar híbrido pré-tratado por processo químio-mecânico: (-●-) 2,5% de NaOH e 5% de sulfito; (-■-) 3,75% de NaOH e 7,5% de sulfito e (-▲-) 5% de NaOH e 10% sulfito..... 79

Figura 23: Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar da usina e híbrido pré-tratados por processo químio-mecânico com 5% de NaOH e 10% sulfito. Híbrido com teor inicial de lignina 19,1% (-▲-) e bagaço de usina com teor inicial de lignina 24,4% (-◆-). 80

Figura 24. Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar da usina e híbrido a partir da aplicação de diferentes cargas de NaOH-sulfito para tratamento químio-mecânico. Híbrido com teor inicial de lignina 19,1% (-▲-) e bagaço de usina com teor inicial de lignina 24,4% (-◆-). 81

Figura 25: Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar deslignificado quimicamente (5% NaOH) e híbrido pré-tratados por processo químio-mecânico com 5% de NaOH e 10% sulfito. Híbrido com teor residual de lignina 8,9% (-▲-) e bagaço deslignificado com teor residual de lignina 9,3% (-●-). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Energia consumida no refinador de discos e grau de fibrilação do bagaço refinado.	58
Tabela 2: Caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar de usina, bagaço quimicamente deslignificado e bagaço híbrido.	61
Tabela 3: Caracterização das atividades enzimáticas e conteúdo de proteína das enzimas comerciais.	64
Tabela 4: Conversão de celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar a açúcares durante a hidrólise enzimática com 8,8 FPU Celluclast e 13,3 UI β -glucosidase a 2% de consistência	65
Tabela 5: Conversão de celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar a açúcares durante a hidrólise enzimática com 8,8 FPU Celluclast e 13,3 UI β -glucosidase, a 2% de consistência	66
Tabela 6: Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar de usina tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.	75
Tabela 7: Conteúdo de lignina solúvel e insolúvel do bagaço de cana de açúcar de usina tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.	75
Tabela 8: Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar híbrido tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.	78

ABREVIATURAS

SA: sítio ativo

C4H: cinamato 4-hidroxilase

COMT: ácido caféico O-metiltransferase

CCR: cinamoil-CoA redutase

CAD: cinamil álcool dehidrogenase

C3H: hidroxicinamato 3-hidroxilase

CCoA-OMT: 5-hidroxiferuloil-CoA-O-metiltransferase

CBH: celobiohidrolase

CBD :domínio de ligação a celulose

CECA: Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-açúcar

CEC: conversão enzimática da celulose

CEH: conversão enzimática de hemicelulose

DNS: ácido dinitrossalicílico

F5H: ferulato 5-hidroxilase

FPU: unidade de papel de filtro

GH: glucano-hidrolase

HCT: hidroxi-cinamoil transferase

IUBMB :União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

PAL:fenilalanina amônio liase

*p*NPG: *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

*p*NPX: *p*-nitro-fenil-β-D-xilopiranosídeo

SPORL: Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose

TAPPI: Associação Técnica das Indústrias de Papel e Celulose

UI: unidade internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	23
2.1.1. Celulose	26
2.1.2. Hemicelulose.....	27
2.1.3. Lignina.....	28
2.1.4. Extrativos	30
2.2. PRÉ-TRATAMENTOS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	31
2.2.1. Processo sulfito.....	32
2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	37
2.3.1. Hidrólise enzimática da celulose.....	37
2.3.2. Hidrólise enzimática da hemicelulose	41
2.4. FATORES FUNDAMENTAIS QUE AFETAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE PRESENTES NOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	42
3. OBJETIVO	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1.AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	47
4.2. DESLIGNIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE BAGAÇO.....	47
4.3. TRATAMENTO MECÂNICO DO BAGAÇO EM REFINADOR DE DISCO	48
4.4. TRATAMENTO QUÍMIO-MECÂNICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	48
4.5.DETERMINAÇÃO DO GRAU DE FIBRILAÇÃO DAS POLPAS.....	51
4.6. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR	51
4.7.ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	52
4.8. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E PROTEÍNAS.....	52
4.8.1. Celulases totais.....	52
4.8.2. Endoglucanase	53
4.8.3. Exoglucanase.....	53
4.8.4.β-glicosidase	54
4.8.5. β-D-xilanase	54
4.8.6. β-Xilosidase.....	55

4.8.7. Proteínas Totais	55
4.9. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. TRATAMENTO MECÂNICO E QUÍMIO-MECÂNICO DO BAGAÇO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FIBRA.....	58
5.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS	64
5.3. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO SULFITO-NAOH NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS POLISSACARÍDEOS.....	74
6. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das mais importantes monoculturas agrícolas. O seu processamento produz uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais, os quais representam um grande potencial energético. A disponibilidade dos subprodutos da cana-de-açúcar tem impulsionado vários grupos de pesquisa a desenvolver tecnologias com o objetivo do seu aproveitamento integral.

O bagaço de cana-de-açúcar vem se destacando entre outras biomassas devido a sua abundância e a diversos produtos que dele podem ser obtidos. Para o aproveitamento integral desse material, é preciso realizar estudos da hidrólise de materiais lignocelulósicos, estudos sobre os pré-tratamentos envolvidos, sobre as enzimas hidrolíticas de celulose e sobre os processos de fermentação dos açúcares. Esses estudos são necessários principalmente devido a complexidade da estrutura/composição do material lignocelulósico, o qual possui três principais constituintes macromoleculares: a celulose, a hemicelulose e a lignina que se encontram intimamente associados.

Para a conversão química, ou enzimática, dos polissacarídeos em açúcares solúveis, é preciso realizar algum tipo de pré-tratamento a fim de aumentar a acessibilidade dos reagentes à matriz polimérica. Cada pré-tratamento tem um mecanismo diferente de ação na estrutura da planta, sendo capaz de causar modificações físicas e/ou químicas, as quais são necessárias para desestruturar a rede intrincada de hemicelulose e lignina que reveste as fibras de celulose. A lignina e hemicelulose presentes na parede celular dificultam o acesso interno das celulasas no substrato.

É desejável que a tecnologia empregada no pré-tratamento seja adaptável a diferentes matérias-primas, que tenha bons rendimentos quantitativos de açúcares fermentescíveis e que os inibidores sejam gerados em níveis toleráveis. O pré-tratamento quimio-mecânico, amplamente empregado na indústria de celulose e papel para a obtenção de polpas de alto rendimento, em princípio pode atender estes requisitos.

A literatura reporta o pré-tratamento quimio-mecânico de madeiras em meio sulfito-ácido demonstrando que a tecnologia necessita de baixo consumo de

energia, que há pouca geração de inibidores do crescimento microbiano no hidrolisado hemicelulósico e que a celulose obtida pode ser totalmente convertida a glicose por celulasas (WANG et al., 2009; ZHU et al., 2009). A metodologia usada está baseada na remoção de maior parte da hemicelulose e no desfibramento de madeira. O custo operacional é viável para o processamento de madeiras e acreditamos que seja ainda mais compatível para bagaço de cana-de-açúcar, devido à necessidade de um menor consumo de energia para o seu desfibramento.

O tratamento quimio-mecânico dos materiais lignocelulósicos pode ser realizado em meio alcalino e neste caso os principais resultados são o inchamento da fibra e a sulfonação da lignina. Apesar de esta tecnologia ser muito empregada na produção de polpas, não há dados na literatura utilizando o processo para pré-tratar biomassa para sacarificação enzimática. Este é um processo em que as barreiras físicas à hidrólise da celulose não são amplamente removidas do material. A questão fundamental em que se baseia este trabalho é avaliar se realmente é necessária a remoção dos componentes em alto grau para favorecer a hidrólise enzimática ou se de fato uma pequena remoção dos componentes do bagaço e aumento da hidrofiliabilidade da lignina poderá reduzir a sua interferência com as enzimas e favorecer a hidrólise enzimática. Nesse sentido, este trabalho compreendeu estudar e definir as condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em meio sulfito alcalino que maximize a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar, material lignocelulósico do colmo da cana-de-açúcar, produzido após a moagem e extração do caldo, vem se destacando devido a sua abundância e a diversos produtos que dele podem ser obtidos (RIPOLLI, 2004). Como exemplos, citam-se a produção direta de energia por combustão ou gaseificação, a produção de polpa celulósica para produção de papel e papelão, a obtenção de produtos baseados em processos fermentativos, como etanol, polióis (xilitol) e ácidos orgânicos, a produção de furfural e o preparo de outros produtos de interesse econômico, como ração animal e compósitos (LOBO et al., 2006; DESCHAMPS, 1996; BAUDEL, 2005; GALVÃO et al., 2001).

A composição química do bagaço varia de acordo com diversos fatores, dentre eles, o tipo de cana e o tipo de solo. O bagaço de cana-de-açúcar contém aproximadamente 48% de celulose, 25% de hemicelulose, 25% de lignina e apenas 2% de cinza (PANDEY et al., 2000). A celulose forma agregados de cadeias dando origem às microfibrilas que estão orientadas ao longo do eixo longitudinal celular e são envolvidas por uma matriz de hemicelulose e lignina.

A análise morfológica da parede celular de cana revela fibras exteriores próximas da casca, ricas em feixes fibrovasculares e outras formas fibrosas que dão resistência ao colmo do vegetal além das células de parênquima que estocam sacarose (SANJUAN et al., 2001). No interior do colmo, chamado de medula ou miolo, há predominância de tecido vegetal parenquimatoso embora existam fibras, vasos e parênquima distribuídos em todo o entrenó (Figura 1).

Figura 1: A - Ilustração das diferentes regiões anatômicas da cana de açúcar, com áreas representativas do córtex e da medula. B - Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar aumentado 260 vezes. Em destaque, os feixes de fibras, vasos e parênquima. <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Onlinearticles/Nonwoods/Nonwood-27.gif>.

Em função da ultraestrutura, composição química e da distribuição dos três principais componentes da parede celular, o bagaço não apresenta as propriedades desejáveis à degradação enzimática (PURI, 1984; FAN et al., 1987).

Estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e/ou microbiana. A compreensão da complexidade estrutural desses materiais requer o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes.

A organização mais comum da parede celular vegetal está representada na Figura 2.

Figura 2: Estrutura de uma fibra vegetal. (SILVA et al.,2009).

Cada fibra é constituída por uma parede primária fina (P), inicialmente depositada durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3). Essas camadas (P, S₁, S₂, S₃) são compostas predominantemente por celulose com espessura variável de acordo com o tipo de célula. Por exemplo, os vasos possuem lúmen mais largo, parede mais fina (em média 2,7 µm) e diâmetro maior (80 µm). As células de parênquima apresentam parede celular fina (em média 1,7 µm), grande diâmetro (em média 60 µm). As células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina (máximo 1 µm de espessura), composta por elevada concentração de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.1.1. Celulose

As plantas produzem cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose por ano a nível mundial, tornando este polissacarídeo o maior reservatório de carbono no mundo (FESTUSHI-BUSSELL et al., 2007). A celulose apresenta um vasto potencial de utilização pelas indústrias para a produção de diversos produtos (papel, tecidos, açúcares, ácidos orgânicos, tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos), além do chamado “etanol de segunda geração” (GUSAKOV, et al., 2007 e KUMAR et al., 2008).

A unidade repetitiva da celulose é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 3), portanto sendo formada por unidades consecutivas de celobiose.

Figura 3: Estrutura da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL;WEGENER,1989).

Em função da linearidade da celulose, as suas moléculas apresentam tendência em formar pontes de hidrogênio inter e intramolecular. Existem pontes de hidrogênio entre grupos OH de unidades de glicose adjacentes da mesma molécula de celulose (ligação intramolecular – responsável pela rigidez) e entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (ligação intermolecular – responsável pela formação da estrutura supramolecular). Assim, feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, as quais formam regiões altamente ordenadas (cristalinas) e regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas se organizam em fibrilas e estas originam as fibras celulósicas (FENGEL;WEGENER,1989).

2.1.2. Hemicelulose

Hemicelulose é um polissacarídeo composto por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) na cadeia principal, e ramificações de ácidos glucurônico, acetil e arabinose dependendo de sua origem.

A xilana (Figura 4) é a hemicelulose presente em maior proporção no bagaço, apresenta uma cadeia linear constituída de D-xilopiranosil com ligações β -D-(1,4), podendo ser substituída com α -L-arabinofuranosil no carbono 2 ou 3, o qual pode apresentar ligações éster com ácido cumárico e ferúlico (WENDE; FRY, 1997). Aparecem também como substituintes no carbono 2, a α -D-glucuronopiranosil ou o derivado de 4-O-metil (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

As ramificações da cadeia principal determinam a solubilidade, a conformação física da molécula com os demais componentes lignocelulósicos e influenciam no modo e na extensão da hidrólise enzimática (KULKARNI;SHENDYE;RAO,1999).

Estudos realizados através de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar definiram sua estrutura como L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana com ácido ferúlico e cumárico quimicamente ligados (SUN et al., 2004). A composição de carboidratos é de 80% de xilose, 3,8% de arabinose, 4,2% de glicose e 3,2% de ácido urônico. A cada 10

xiloses na cadeia principal existe um ácido urônico ou uma arabinose (BRIENZO et al., 2010).

Xilanas do bagaço de cana contém até 4% de ferulato e 3% de cumarato. Estes ácidos estão diretamente envolvidos na associação com a lignina. As principais formas de interação molecular, ferulato e cumarato, estão bem estabelecidas e envolvem ligações éster com os carboidratos e éster e éter com unidades condensadas da lignina (JUNG; DEETZ, 1993).

Figura 4: Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopirranose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil (PITARELLO, 2007).

2.1.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa, composta basicamente de unidades de fenilpropano (Figura 5) que desempenha importantes papéis biológicos, reduzindo a permeabilidade da parede celular em relação à água, estando envolvida em mecanismos de defesa contra patógenos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) e como barreira à degradação enzimática da parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989).

A estrutura da lignina provém de três precursores monoméricos: os alcoóis coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (DENCE; LIN, 1992). A estrutura da lignina é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diaril-éter β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, β - β e β -O-5, sendo as β -O-4 as

mais abundantes (Figura 5) (HIGUCHI,1984). Sua composição varia entre os diversos grupos de plantas. Em gimnospermas predomina o tipo G (guaiacila), em angiospermas G-S (guaiacila-siringila) e em gramíneas a lignina tipo G-S-H (guaiacila-siringila-p-hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006). A lignina de bagaço contém grandes quantidades de estruturas não condensadas, consistindo de unidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil em proporções aproximadamente iguais (BAUCHER et al., 2003).

A respeito da natureza química das unidades H, é atribuída à presença de ácido p-cumárico (PA) esterificado principalmente ao grupo hidroxila fenólica da lignina. Contudo quantidades apreciáveis de unidades PA na lignina do bagaço estão como estruturas alfa-aril-éter (FERNANDEZ, et al., 1990).O álcool cumárico é altamente reativo, por apresentar posições C3 e C5 do anel aromático livres para ligações C-C altamente resistentes aos métodos de degradação química (CHEN et al, 1998).

Ligninas constituem um dos maiores problemas na produção de polpa e papel por causa da necessidade de separá-las das fibras. Este processo consome grandes quantidades de energia e o uso de reagentes muitas vezes tóxicos. A lignina também limita a digestibilidade de rações porque ela não pode ser degradada por microorganismos presentes no rúmen dos animais. Por essas razões, vários grupos de pesquisa vêm tentando alterar o conteúdo e a composição da lignina de plantas por engenharia genética com o objetivo de aumentar a digestibilidade dos materiais e também a eficiência de polpação. Em certos tipos de mutantes de milho, sorgo, tabaco e alfafa, o aumento na digestibilidade foi associado a uma redução no teor de lignina (STICKLEN, 2008, LI et. al, 2008).

A biossíntese de lignina está acoplada ao metabolismo dos fenilpropanóides, apresentando enzimas compartilhadas com outros processos metabólicos tais como fenilalanina amônio liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e ácido caféico O-metiltransferase (COMT), assim como enzimas específicas como cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool dehidrogenase (CAD). A redução nas atividades de CAD e COMT, importantes enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, vem sendo demonstrada em cana (RAMOS et al., 2001).

A manipulação genética na biossíntese de lignina foi proposta para reduzir a necessidade de processos de pré-tratamento para produção de açúcares

fermentáveis. Por exemplo, um recente estudo na biossíntese de lignina de alfafa mostrou que a regulação de seis diferentes enzimas da via biossintética: cinamato 4-hidroxilase (C4H), hidroxí-cinamoil transferase (HCT), hidroxícinamato 3-hidroxilase (C3H), 5-hidroxyferuloil-CoA-O-metiltransferase (CCoA-OMT), ferulato 5-hidroxilase (F5H) e ácido caféico O-metiltransferase (COMT) poderia reduzir ou eliminar a necessidade de pré-tratamento químico na produção de açúcares fermentáveis (CHEN,DIXON,2007; CHAPPLE et.al,2007).

Figura 5: Lignina de madeira dura (Poplar) (RALPH et al., 2004).

2.1.4. Extrativos

Os extrativos do bagaço compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, terpenos/terpenóides, gorduras/ceras e vários compostos fenólicos. A soma destes componentes varia em cada espécie de material

lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2. PRÉ-TRATAMENTOS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Para desenvolver uma tecnologia eficaz para converter enzimaticamente a parede celular vegetal em açúcares solúveis é primordial aumentar a sua porosidade e área superficial, a carga superficial e a hidrofiliabilidade (CHENSSON et al., 1997). Pré-tratamentos mecânicos, químicos, físicos ou biológicos e a combinação destes são empregados antes de se iniciar a hidrólise enzimática (PITARELLO, 2007). Dos vários métodos descritos na literatura os mais comuns são baseados no emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor (PITARELLO, 2007). O pré-tratamento com álcali utiliza condições moderadas de reação se comparada aos processos com ácido. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa e aumento da reatividade da fibra. O álcali tende a inchar a fibra de modo que a cristalinidade da celulose decresce enquanto que ocorre um aumento da área superficial e porosidade da mesma (SILVERSTEIN et al., 2007). Desacetilação é a principal reação que ocorre durante a primeira etapa de qualquer processo de polpação alcalina. Para madeiras, essa reação é responsável por uma parte considerável do consumo de álcali (ZANUTTINI et al., 2009). Kong et al. (1992) relataram que álcalis removem grupos acetil de hemicelulose, reduzindo o impedimento estérico imposto às enzimas hidrolíticas e melhorando muito a digestibilidade dos carboidratos. Outra reação importante que ocorre na estrutura da hemicelulose do bagaço na presença de NaOH é a quebra da ligação éster entre a arabinose e o ácido ferúlico, assim liberando cada composto (Figura 6).

Figura 6: Quebra da ligação éster da hemicelulose em meio alcalino.

Vários programas focados no desenvolvimento de plantas com o teor reduzido de lignina têm sido reportados na literatura (JACKSON et al., 2008). Em alguns casos, a redução original da quantidade de lignina, como na alfafa, provou ser uma maneira eficiente para aumentar a digestibilidade enzimática (CHEN;DIXON,2007).

2.2.1 Processo Sulfito

O processo de polpação sulfito foi inventado pelo químico americano Benjamim Chew Tilghman em 1866, nos EUA. Sua patente se refere ao tratamento de substâncias vegetais para fabricação de papéis com solução ácida de sulfito de cálcio. Este processo foi o método dominante na produção de pasta química até o princípio de 1960. Em 1874, C. D. Ekman iniciou a produção de polpa sulfito em uma fábrica na Suécia (SJOSTROM, 1993).

Essencialmente, a polpação sulfito é ainda baseada nas invenções mencionadas anteriormente, embora várias modificações e melhorias técnicas tenham sido introduzidas. Em 1950 e 1960 introduziram as chamadas bases solúveis, substituindo o cálcio pelo magnésio, sódio, ou amônia, dando mais flexibilidade de adaptação nas condições do cozimento (SJOSTROM, 1993).

Todavia, modernamente, estão se desenvolvendo processos semi-químicos de polpação (pastas de alto rendimento) que envolvem o uso de sulfito, tais como: quimio-mecânico e quimio-termomecânico. Isto se deve ao fato de que, sendo o processo sulfito bastante versátil, pode propiciar rendimentos de polpação que variam de 35 a 90%, dependendo da concentração do licor de cozimento e das condições operacionais.

Segundo Gustafson et al. (1989), durante a polpação sulfito alcalino podem ocorrer três etapas. Na etapa inicial, os íons hidroxila penetram diretamente dentro das regiões da madeira e causam o inchamento da matriz de celulose. Nesta fase, os íons hidroxila são imediatamente consumidos por desacetilação das hemiceluloses. Na segunda etapa, o movimento de íons hidroxila por penetração é acompanhado por difusão devido a um gradiente de concentração crescente de hidroxila entre as partes interna e externa do material. Durante a terceira fase, o movimento de íons hidroxila nas regiões internas da parede celular ocorre apenas por difusão. A remoção da lignina progride uniformemente sobre a parede celular, sem diferenças entre a direção radial e tangencial (KOCH et al., 2003). Jayme e Torgesen (1967) e Goring (1981) demonstraram por meio de microscopia de UV que, nos primeiros estágios de cozimento da madeira, a lignina da camada S2 é removida rapidamente, enquanto a lignina na lamela média ainda é resistente à dissolução. De acordo com Polcin et al. (1967) a lignina da lamela média de madeira é dissolvida somente na fase posterior do cozimento.

As reações da lignina em meio alcalino geralmente têm início com a desprotonação de um OH fenólico, estrutura disponível em pequenas quantidades na macromolécula. A desprotonação de um OH fenólico pode dar origem a uma metileno quinona, através da clivagem no carbono alfa (Figura 7) (FENGEL; WEGENER, 1989). Se no meio reacional houver somente uma base forte (sistema tipicamente encontrado na polpação soda), a metileno quinona pode dar origem a estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama.

Figura 7: Formação da metileno quinona (SJOSTROM, 1993).

Se além de uma base for adicionado ao material lignocelulósico o sulfito de sódio ($\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{SO}_3$), o SO_3^{2-} reage com o carbono benzílico do metileno quinona sulfonando a lignina (Figura 8). Pelo menos nas estruturas acíclicas, a metileno quinona é facilmente atacada por íon sulfito ou íon bissulfito, assim, a estrutura que era hidrofóbica se torna hidrofílica (STENIUS, 2000; SJOSTROM, 1993). Essa alteração na hidrofobicidade ocasiona o inchamento da fibra através da retenção de água na fibra.

Figura 8: Reação esquemática da introdução de grupos sulfônicos na lignina durante polpação pelo processo sulfito (BENAR, 1996).

Esta reação é relativamente específica para lignina. Algumas hemiceluloses de baixa massa molecular são removidas, mas a maior parte da alfa celulose e hemiceluloses mais resistentes permanecem na polpa juntamente com mais da metade da lignina (SJOSTROM, 1993).

Nesses processos, a lignina é sulfonada e quebrada dando origem aos lignosulfonatos, que são solúveis em água (Figura 9) (FREDHEIM, 2003; RICHARDSON et al., 2004)

Khristova e colaboradores (2006), empregando sulfito em meio alcalino ($\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{SO}_3$) em uma sequência de deslignificação-branqueamento para a obtenção da polpa celulósica, demonstraram que a qualidade da polpa de celulose, utilizando o método do sulfito, é superior aos métodos que utilizam apenas meio alcalino na deslignificação.

Figura 9: Estrutura química do lignosulfonato (FREDHEIM, 2003).

A maioria das tecnologias experimentais de pré-tratamento requer o desenvolvimento comercial de equipamentos para operar em larga escala (ZHU et al., 2009a). Por outro lado, muitos dos equipamentos utilizados pela indústria madeireira para a fabricação de celulose podem ser adaptados para o tratamento de outros materiais lignocelulósicos (BIERMANN, 1993). Entre eles, o processo quimio-mecânico de polpação pode também ser utilizado no pré-tratamento de bagaço de cana. Neste processo, o refinador de disco desintegra os feixes de fibras o que aumenta área superficial do material.

O pré-tratamento quimio-mecânico de cavacos de madeira com sulfito e subsequente sacarificação enzimática foram recentemente reportados (ZHU et.al, 2009a ; WANG et.al, 2009, ZHU et al., 2010). As amostras foram impregnadas com solução de sulfito em meio ácido e cozimento a 180°C por 30 minutos, seguida de uma etapa de refino em refinador de discos. Os autores nomearam o processo de SPORL (Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose) porque com este material pré-tratado foi obtida uma alta conversão enzimática (90%) de celulose a glicose. A diminuição da recalcitrância

do material é alcançada em razão da combinação de efeitos: parcial dissolução da hemicelulose, despolimerização da celulose, parcial deslignificação, parcial sulfonação da lignina e aumento da área superficial através da fibrilação (Figura 10) (ZHU et al, 2009a). A sulfonação da lignina aumenta a hidrofilicidade da amostra pré-tratada por SPORL e reduz a adsorção improdutiva de enzimas na lignina (ZHU;PAN,2010). A Figura 10 mostra alguns efeitos ocasionados sobre as fibras no processo de refino.

Figura 10: Alterações estruturais (corte, fibrilação externa e fibrilação interna) na fibra devido ao refinamento. O corte e a fibrilação externa ocasiona a formação de finos durante o processo. [http://www.cesnors.ufsm.br/professores/arci/efl2042-quimica-da-madeira-engenharia florestal/Apostila%20de%20Celulose-Papel.pdf](http://www.cesnors.ufsm.br/professores/arci/efl2042-quimica-da-madeira-engenharia-florestal/Apostila%20de%20Celulose-Papel.pdf)

O bagaço de cana-de-açúcar é facilmente hidrolisado por um processo alcalino simples, entretanto, modificações deste processo utilizando sulfito alcalino/antraquinona e $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ foram analisadas por Hedjazi et al. (2008) para melhorar a deslignificação, o rendimento e a qualidade da polpa em comparação com o processo soda. Em estudo anterior, foi demonstrado que a polpação sulfito alcalino/antraquinona de bagaço desmedulado resultou numa eficiente deslignificação e manteve um elevado rendimento (WANG;PATT, 1989).

2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após o pré-tratamento do material lignocelulósico, a hidrólise enzimática é realizada para transformar a celulose e hemicelulose em açúcares solúveis (KESHWANI; CHENG, 2009).

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termoestabilidade das enzimas, adsorção ao substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação. Conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (VALLANDER; ERIKSSON, 1985).

2.3.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Celulases constituem um complexo sistema de três grupos de enzimas que agem em sinergia para hidrolisar a celulose (KESHWANI; CHENG, 2009). As celulases mais intensivamente estudadas são as produzidas por fungos (FINCH; ROBERTS, 1985). O maior interesse nos sistemas celolíticos fúngicos reside no fato de serem extracelulares e, por isso, de mais fácil obtenção (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988). Os microrganismos mais utilizados na produção industrial de celulases são: *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei*.

Os três tipos principais de enzimas que fazem parte do complexo celolítico são as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (LADISCH et al., 1983, WRIGHT et al., 1988).

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando então novas extremidades de cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar

celobiose ou glicoses das extremidades. A hidrólise completa da celulose ocorre então pela ação das β -glicosidases, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (MUÑOZ et al., 2001) (Figura 11).

Figura 11: Modo de ação de celulasas sobre a celulose (MARTINS, 2005).

O sítio ativo das endoglucanases possibilita a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduz seu grau de polimerização consideravelmente. As regiões amorfas, com menor organização estrutural, são mais facilmente atacadas, pois suas cadeias não possuem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Assim, o

ataque das endoglucanases leva a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (MARTINS, 2005).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da cadeia celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al, 2002).

A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase. Embora a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) defina a CBH como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da cadeia celulósica e oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) maior que três em celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima (LYND et al, 2002 e OINONEN, 2004). A CBH pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa celulose a partir do terminal redutor liberando celobiose, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa o mesmo substrato a partir do terminal não redutor. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO e JUNIOR, 2009). A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases (ZHANG;LYND, 2004).

O CBD (domínio de ligação a celulose) está presente nas endoglucanases e celobiohidrolases e sua principal função é promover a adsorção da proteína ao substrato, fornecendo estabilidade ao agregado e possibilitando a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo (HUI; WHITE; THIBAUT, 2002) (Figura 12).

Figura 12: Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de *T. reesei* (DIVNE et al, 1994).

A β -glicosidase, ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), tem a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (LYND;ZHANG, 2002). Assim como a CBH, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (CASTRO e JUNIOR, 2009).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas (LYND et al, 2002, BHAT e BHAT, 1997): sinergia endoglucanase-exoglucanase atuando nas regiões amorfas da cadeia, a endoglucanase disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia exoglucanase-exoglucanase - CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase. Observa-se também sinergia entre exoglucanase- β -glicosidase e entre endoglucanase- β -glicosidase; a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase (CASTRO e JUNIOR, 2009).

A Figura 11 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e beta-glicosidase na hidrólise da cadeia celulósica.

2.3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA HEMICELULOSE

Devido a grande complexidade e heterogeneidade da hemicelulose a sua hidrólise completa requer a atuação cooperativa de várias enzimas (Figura13). A hidrólise das hemiceluloses produz oligossacarídeos lineares e ramificados. Estes últimos podem apresentar cadeias laterais de arabinofuranose, ácido glucurônico ou ácido 4-O-metil glucurônico.

A arabino-glucurono-xilana é a principal hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar e para a sua degradação são necessárias basicamente seis enzimas diferentes. Endo-(1,4)- β -xilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de xilana. Elas rompem a cadeia de xilana produzindo xilooligossacarídeos com um baixo grau de polimerização. As características da enzima, modo de ação e os produtos de hidrólise variam de acordo com a sua origem (BASTAWDE,1992, SAHA, 2003a; COLLINS, 2005).

β -xilosidases (EC 3.2.1.37) catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos e xilobiose a partir de terminais não redutores liberando xilose. Esta enzima é essencial para a degradação completa da xilana. Têm uma importante atuação porque diminui a concentração de xilobiose que em muitos casos é um inibidor das endoxilanases. É atualmente classificada nas famílias 39, 43 e 52 da glicosil-hidrolases, baseadas nas suas sequências de aminoácidos (SAHA, 2003b; COLLINS, 2005).

A afinidade da β -xilosidase em degradar xilana e xilooligossacarídeos é fundamental na conversão total da biomassa a monossacarídeos. Pequenos xilooligossacarídeos lineares podem ser convertidos completamente a xilose por β -xilosidases, contudo a afinidade em relação aos xilooligossacarídeos diminuiu com o aumento da cadeia (REILLY, 1981).

A α -L-arabinofuranosidase (EC. 3.2.1.55) é uma exoenzima que hidrolisa terminais não redutores de polissacarídeos contendo resíduos L-arabinosil de cadeias laterais ou de arabinoxilanas, arabinana, goma arábica e arabinogalactana. Essas enzimas podem hidrolisar as ligações arabinosil α -(1- 3) e (1- 5) destes substratos (SAHA, 2000).

Outras enzimas acessórias são α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139) que hidrolisam resíduos laterais de ácido glucurônico, acetilxilana esterases (EC

3.1.1.72), que hidrolisam grupos acetil e feruloil esterases (EC 3.1.1.73), que hidrolisam resíduos de ácido ferúlico (JEFFRIES, 1994).

Figura 13: Estrutura química da hemicelulose e pontos de ação das enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação do polímero hemicelulósico (KUMAR, 2008).

2.4. FATORES FUNDAMENTAIS QUE AFETAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE PRESENTES NOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

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

A maioria dos poros encontrados na parede celular tem um raio (3nm) menor que o raio de Stokes da maioria proteínas globulares ativas nos polímeros da parede celular. Uma proteína com raio de Stokes de 3 nm corresponde a uma

massa molar de aproximadamente 20 kDa (CHENSSON et al., 1997). A presença de lignina, ácidos aromáticos e hemicelulose claramente funcionam como uma barreira física à penetração das enzimas na parede celular. Em adição à barreira física das ligninas, a ligação lignina carboidrato constitui uma barreira estérica à ação de glicanases. A hemicelulose é encontrada em associação íntima com as microfibrilas de celulose, porém possui interações covalentes com a lignina e, nos dois casos, limita o acesso de celulasas à celulose. O tratamento de tecidos vegetais, com teor reduzido de lignina, com xilanases poderia aumentar a porosidade da parede celular, ajudando na solubilização de ligninas residuais ligadas às xilanas e na subsequente ação de celulasas (OHGREN et al., 2007).

A adsorção de celulasas na superfície do substrato também desempenha um papel relevante durante a hidrólise enzimática da biomassa vegetal (MARTINS et al., 2008). Celulasas que adsorvem mais à superfície do substrato mostram um aumento na taxa e na extensão da hidrólise de celulose cristalina quando comparadas com celulasas que adsorvem menos. A descoberta de domínios de ligação à celulose (CDBs) em algumas enzimas celulolíticas explica um pouco as diferenças na capacidade de adsorção das celulasas (GILKES et al., 1991). Uma correlação entre a hidrofobicidade de endoglucanases e sua capacidade de adsorção na celulose também foi relatada (KLYOSOV, 1990).

As enzimas utilizadas para hidrólise da celulose e/ou hemicelulose adsorvem-se inespecificamente à lignina. A fração de celulasas e hemicelulasas que se tornam improdutivas devido a esta adsorção pode chegar a 70% do total adicionado (JORGENSEN; OLSSON, 2006; LU et al., 2002; BERLIN et al., 2005). A grande perda de celulasas e hemicelulasas reforça que os métodos que visam a remoção de lignina podem ser vantajosos para a hidrólise dos carboidratos. Assim, pré-tratamentos direcionados à solubilização da lignina com reagentes apropriados têm sido propostos (CANILHA et al., 2010). Além de minimizar a adsorção improdutiva das enzimas, estes pré-tratamentos geralmente acarretam em aumento na acessibilidade à celulose (YANG et al., 2002). É notável que a remoção de 80% da lignina de madeira mole explodida a vapor aumentou significativamente a digestibilidade do substrato. Além disso, devido ao teor reduzido de lignina, uma carga seis vezes menor de enzima foi necessária para obter o mesmo grau de conversão de celulose (YANG et al., 2002).

A Figura 14 apresenta uma visão simplificada dos principais mecanismos que limitam a hidrólise enzimática da celulose, conforme foi abordado anteriormente.

Figura 14: Visão simplificada dos principais mecanismos que limitam a hidrólise enzimática da celulose: 1) Inibição da β -glicosidase e da celobiohidrolase pelos produtos (glucose e celobiose, respectivamente); 2) Adsorção improdutiva da celobiohidrolase à celulose; 3) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela hemicelulose; 4) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela lignina; 5) Adsorção inespecífica das enzimas à lignina; 6) Perda da atividade enzimática (JORGENSEN, KRISTENSEN, FELBY, 2007).

Hemicelulases facilitam a hidrólise de celulose expondo as microfibrilas de celulose, tornando-as mais acessíveis às celulases (HIMMEL et al., 2007). É esperado que o uso de xilanases também auxilie na hidrólise de xilanas que não estão associadas à lignina residual. Por outro lado, fazer uso da capacidade de enzimas acessórias de desramificar grupos laterais de hemiceluloses que interagem com a lignina residual é uma forma de aumentar a porosidade da parede celular devido a efeitos secundários da deslignificação, como mostrado em um estudo avaliando o potencial de feruloil esterase de *Aspergillus niger* no branqueamento de polpas (NGUYEN et al., 2008).

O desenvolvimento comercial de hemicelulases para a indústria do etanol não está tão avançado quanto de celulasas porque as preparações comerciais foram primariamente desenvolvidas para biomassa pré-tratada com ácido diluído, na qual a hemicelulose foi removida antes da sacarificação. No entanto, com o desenvolvimento de métodos de pré-tratamentos não acídicos (SANCHES; CARDONA, 2008; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007) ou com novas gerações de plantas com teores reduzidos de lignina, mantendo intacta a fração de hemiceluloses, o uso de hemicelulases é necessário. Celulasas comerciais, por exemplo, as de *T. reesei* geralmente apresentam baixa atividade de hemicelulases e não são adequados para conversão eficiente de substratos que contenham hemicelulose em açúcares monoméricos (GREY et al., 2006). Um novo campo a ser explorado nesse assunto é o uso de xilanases alcalinas de processos de biobranqueamento, desenvolvidos atualmente por algumas indústrias de polpa e papel (BEG et al., 2001). De acordo com alguns estudos recentes (OHGREN et al., 2007; NGUYEN et al., 2008), o tratamento de tecidos de plantas deslignificados com hemicelulases aumentou a porosidade da parede celular não apenas pela hidrólise da hemicelulose, mas também porque ajudou na solubilização de lignina residual o que eventualmente favorece a ação de celulasas.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito do pré-tratamento quimio-mecânico de bagaço de cana de açúcar visando obtenção de uma fibra com elevado potencial de bioconversibilidade.

METAS

- Tratar quimio-mecanicamente bagaços de cana-de-açúcar e avaliar a porcentagem de remoção de cada um dos seus componentes principais.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento do bagaço com diferentes concentrações de solução sulfito-NaOH na sacarificação enzimática dos polissacarídeos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de usina usado no trabalho foi fornecido pela Companhia Açucareira Vale do Rosário, de Orlândia, SP. Também foi utilizado híbrido de bagaço fornecido pelo Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-açúcar - CECA da Universidade Federal de Viçosa. Em maio de 2009, 286 amostras de cana com 12 colmos (parcelas do segundo corte) foram coletadas e entre eles foram escolhidos 11 genótipos contrastantes para lignina. Os indivíduos da população analisada foram desintegrados em uma prensa hidráulica, lavados para retirada da sacarose e congelados a -20°C até o posterior uso. Destes, um clone com 19,1% de lignina, 42% de celulose e 27% de hemicelulose foi usado neste trabalho.

4.2. DESLIGNIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE BAGAÇO

Foi feita a deslignificação seletiva da lignina do bagaço segundo metodologia descrita por Browning (1967) para holocelulose-clorito. Para cada 1 g de bagaço de cana-de-açúcar, foi utilizada uma solução preparada com 0,3 g de clorito de sódio (Fluka), 0,1 mL de ácido acético (Synth) e 29 mL de água destilada. O frasco contendo o bagaço e a solução de clorito foi incubado a $70-80^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. As amostras foram resfriadas a 10°C , filtradas em filtros de placa porosa nº 2 e lavadas com 800 mL de água destilada e 200 mL de acetona.

4.3. TRATAMENTO MECÂNICO DO BAGAÇO EM REFINADOR DE DISCO

Seiscentos gramas de bagaço de cana (base seca) e 25 litros de água foram colocados dentro de um refinador de discos (Bauer MD-300 - REGMED). Em três diferentes tempos, relacionados ao consumo de energia do refinador de 250, 750 e 1600 Wh, foram coletados aproximadamente 2 litros de amostra. Foi feita a centrifugação das amostras em centrífuga de roupas (Arno) por 15 minutos e em seguida determinado o grau de fibrilação (item 4.5).

4.4. TRATAMENTO QUÍMIO-MECÂNICO DO BAGAÇO-DE-CANA-DE-AÇÚCAR

As amostras de bagaço foram tratadas em duas etapas visando simular o processo industrial de refino na polpação químio-mecânica (KOKTA, 1990; VICENTIM; FERRAZ, 2008). Seiscentos gramas de bagaço foram colocados dentro de um recipiente e foi feito vácuo por 30 minutos (Figura 15A). O processo foi iniciado por uma impregnação a vácuo do bagaço por 15 min com solução alcalina (NaOH 5% m/m) ou sulfito alcalina (NaOH 5% e Na₂SO₃ 10% m/m). A proporção de bagaço para líquido foi de 1:10 (p/v) e a reação foi conduzida em autoclave a 121 °C por 2 h (Figura 15 B). Após esta etapa foi feita a lavagem do material em coluna de PVC, recirculando a água de lavagem para retenção dos finos, até que a água de lavagem estivesse sem turbidez. Posteriormente, o material foi lavado com água e centrifugado para se obter uma consistência de 30% (p/p). O material lavado foi suspenso em 25L de água (2,4% consistência) e refinado no refinador de disco Bauer MD-300 (Figura 15 C). Após esta etapa repetiu-se o processo de retenção de finos em coluna de PVC e a centrifugação em centrífuga de roupas Arno por aproximadamente 15 minutos.

O rendimento do processo foi calculado com base na massa seca da amostra de acordo com a equação:

$$\text{Rendimento do refino (\%)} = \frac{\text{massa seca refinada}}{\text{massa seca inicial}} \times 100$$

Foram avaliados os tratamentos do bagaço (20g base seca) com soluções preparadas com NaOH e sulfito de sódio na proporção de 1:2, utilizando soluções de NaOH (2,5%, 3,75% e 5% m/m) e de sulfito de sódio (5%, 7,5% e 10%). As reações foram feitas em autoclave, a 121 °C por 2 h. As amostras tratadas foram lavadas com um litro de água em funil de Buchner e desfibradas em um liquidificador com um litro de água por 15 minutos. O material tratado foi centrifugado por 15 minutos e o rendimento do processo foi calculado.

Figura 15: Etapas de impregnação (A), de cozimento (B) e de refino (C) do processo químio-mecânico.

4.5.DETERMINAÇÃO DO GRAU DE FIBRILAÇÃO DAS POLPAS

Para cada 3g de polpa do material refinado foi adicionado 1L de água; a determinação do grau de refino foi feita em aparelho Regmed modelo CF/A de acordo com a norma ISO 5267/2 e TAPPI T 227. O volume de água coletado do aparelho é inversamente proporcional ao grau de fribração e o valor foi expresso como CSF (Canadian Standard Freeness, ml).

4.6. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Cerca de 3 g de bagaço moído (25 mesh) foi extraído com 95% de etanol por 6 h, em um aparelho Soxhlet. A amostra extraída foi hidrolisada com 72% de ácido sulfúrico a 30 ° C por 1 h (300 mg de amostra e 3 ml de ácido sulfúrico). À solução foram adicionados 79 ml de água destilada para reduzir a concentração final do ácido para 3%. A mistura foi autoclavada por 1 h a 121 °C. O material resultante foi resfriado, filtrado em filtro de vidro poroso (número 3) e seco até massa constante, a 105 °C. A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria e a solúvel por espectrofotometria a 205 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm. As concentrações de açúcares monoméricos na fração solúvel foram determinadas por HPLC com uma coluna BioRad HPX87H a 45 °C. A eluição foi feita com 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 ml/min e os açúcares detectados por índice de refração (FERRAZ et al., 2000).

Foi feito o cálculo para correção da composição química do bagaço através da multiplicação do rendimento do processo com a composição química do material.

4.7. ANÁLISE MICROSCÓPICA

As fibras de bagaço foram imersas em 1 ml de água e agitadas por 5 minutos, após isso a amostra foi colocada em uma lâmina de vidro e coberta com lamínula. As suspensões foram analisadas no microscópio óptico (Coleman M103) com aumento de 400 vezes.

4.8. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E PROTEÍNAS

4.8.1. Celulases Totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Para a elaboração da curva padrão de glicose foi preparado uma solução de glicose de 10 mg/mL. Foram adicionadas a tubos de ensaio 1 mL da solução de glicose (10mg/ml) e 4mL, 2mL, 1mL e 0,5mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), a fim de obter concentrações de glicose correspondentes a 2mg/ml, 3,3 mg/ml, 5,0 mg/ml e 6,7 mg/ml. A curva padrão de glicose foi construída através da relação entre massa de glicose em 0,5 ml (1mg, 1,65mg, 2,5mg e 3,35mg) e a absorbância a 540 nm.

A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), uma tira de papel de filtro 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático (Celluclast 1.5L - Novo-Nordisk) nas diluições de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400. Os tubos de ensaios foram mantidos em banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Após o período de reação, adicionou-se 3 mL de reagente DNS e aqueceu a mistura a 100 °C por 5 minutos (MILLER, 1959). Adicionou-se 20 mL de água destilada e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm (Espectrofotômetro U-2001 - Hitachi) em todos os tubos. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos

em massa de glicose através da curva padrão de glicose e usados para construir um gráfico que relaciona as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido pela diluição e expresso como celulases totais (FPU) / mL.

4.8.2. Endoglucanase

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

Foram adicionados 0,9 mL de carboximetilcelulose 0,44 % (Sigma C5013) e 0,1 mL de extrato enzimático em tubos de ensaio e a reação foi mantida a 50 °C por 5 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de DNS em cada tubo de ensaio e esses foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 μ mol/mL.

4.8.3. Exoglucanase

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

Uma alíquota de 0,9 mL de Avicel 1 % foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por 60 minutos. As reações foram interrompidas com 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos, após isso a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15

minutos para retirada dos sólidos insolúveis. Realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante a 540 nm. Controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose previamente construída. A curva padrão foi construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 $\mu\text{mol/mL}$.

4.8.4. β -Glicosidase

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

Foram adicionados 0,8 mL de solução de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) 0,1 % e 0,2 mL de solução enzimática em tubo de ensaio e incubado a 50°C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10% e feita a leitura da absorbância a 410 nm. O controle do ensaio foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10% no início da reação.

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

4.8.5. β -D-Xilanase

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

Foram adicionados 0,9 mL de xilana 1 % e 0,1 mL de solução enzimática em tubo de ensaio que foi incubado a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida

pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi fervido a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, realizou-se leitura da absorbância a 540 nm. Foi feito um controle para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes da enzima. A absorbância do controle foi descontada da respectiva amostra.

A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 16 e 20 µmol/mL. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 µmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

4.8.6. β -Xilosidase

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

Uma alíquota de 0,8 mL de solução de p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de solução enzimática em um tubo que foi incubado a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % ao tubo de ensaio e foi feita a leitura da absorbância a 410 nm. Um controle foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes da enzima.

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

4.8.7. Proteínas Totais

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada através do Método de Lowry (GHOSE, 1987). Foram preparados os reagentes A (20 g de Na₂CO₃, 4g de NaOH em 1000ml de água), B-1(1 g CuSO₄. 5H₂O em 100ml de água), B-2 (2 g Tartarato Sódio Potássio), C (1ml de Reagente B-1, 1 ml de

Reagente B-2, 100ml de reagente A) e o Reagente Fenol (1N)(preparado a partir da diluição(1:2) do reagente Folin Ciocalteou).

Foram misturados 2 ml da amostra em um tubo com 2 ml de ácido tricloroacético 10%. Após ter sido homogeneizada, a amostra foi incubada por 60 minutos na geladeira e em seguida foi centrifugada a 2000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante da amostra foi eliminado. O sedimento foi dissolvido em 2 ml do reagente A. Um volume de 1,0 ml dessa amostra foi adicionado a 5 ml do reagente C. Após 10 minutos adicionou-se 0,5 ml de Reagente fenol (1N) e depois de 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

A curva padrão foi construída com soluções de albumina soro bovino (BSA) 0,067; 0,1; 0,125; 0,17; 0,25; 0,33; 0,5; 0,67 e 1,0 mg/ml.

4.9. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada a uma consistência de 2% (p/v). As reações foram conduzidas em tubos de centrífuga de 50 ml inclinados a 45° no banho a 45 °C sob agitação de 120 rpm. Os bagaços foram hidrolisados com Celluclast - Sigma (8,8 FPU/g de bagaço) e Novozym Sigma - (beta-glicosidase 13,33 UI/g de bagaço).

Dois tubos de centrífuga foram retirados a cada tempo de 8, 24, 48, 72 e 96 h e em seguida fervidos por 5 min. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm, por 15 minutos e os sobrenadantes foram analisados por HPLC para avaliar os teores de açúcares.

A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada utilizando-se as concentrações de glicose e celobiose obtidas após a hidrólise, de acordo com a Equação 1. A conversão enzimática de hemicelulose (CEH) foi calculada de acordo com a equação 2.

$$CEC (\%) = \left(\frac{\text{Glicose} \times 0,9 + \text{Celobiose} \times 0,95}{\text{Celulose}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$CEH (\%) = \left(\frac{\text{Xilose} \times 0,88}{\text{Hemicelulose}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

4.9.1. Efeito da reaplicação de enzimas ao bagaço pré-tratado enzimaticamente

Este ensaio foi feito com o bagaço pré-tratado com 5% NaOH e refinado. Adicionou-se uma carga inicial de 8,8 FPU de celulase/g de bagaço e 13,3 UI de β -glicosidase /g de bagaço. Após 48 h de hidrólise uma quantidade igual de enzimas foi novamente adicionada às amostras. Foi feita a determinação dos açúcares solúveis liberados na hidrólise do bagaço e calculada a conversão de enzimática de celulose e hemicelulose das amostras, conforme reportado anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TRATAMENTO MECÂNICO E QUÍMIO-MECÂNICO DO BAGAÇO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FIBRA

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com NaOH, NaOH/Sulfito e sem tratamento foram desfibradas em um refinador de discos. Esta operação promoveu uma melhor homogeneização do material, uma vez que o bagaço de cana-de-açúcar apresentou-se bastante heterogêneo em relação ao tamanho e espessura dos feixes de fibras

Na tabela 1 estão apresentados os resultados do grau de fibrilação (freeness) e a energia consumida no refinador dos bagaços de usina, antes e depois do tratamento com NaOH ou NaOH/Sulfito. O grau de fibrilação é um parâmetro que revela a capacidade da fibra em reter líquido, assim o menor o valor obtido indica que a fibra foi mais refinada (BIERMANN, 1993).

Tabela 1: Energia consumida no refinador de discos e grau de fibrilação do bagaço refinado.

Amostra	Energia consumida no refino (kWh)	Freeness(mL)
Bagaço sem tratamento	0,250	670
	0,750	530
	1,600	430
Bagaço tratado com NaOH	0,250	460
	0,750	230
	1,600	190
Bagaço tratado com NaOH/Sulfito	0,250	180
	0,750	130
	1,600	130

As amostras de bagaço que foram impregnadas com solução alcalina ou sulfito/alcalino foram refinadas mais rapidamente, com menor consumo de energia, isso provavelmente ocorre devido a remoção de parte da lignina da parede celular. No processo alcalino o movimento do licor se dá através do lúmen e das perfurações em direção à lamela média. A lignina da parede secundária é removida rapidamente enquanto que a lignina da lamela média é mais resistente à solubilização (KOCH et al., 2003). O pré-tratamento químico do bagaço promove a desestruturação da parede celular e facilita o rompimento da estrutura lamelar, ocasionando a liberação das fibras e conseqüentemente ocorrendo um menor consumo de energia.

A figura 16 mostra um aumento acentuado no grau de refino dos bagaços até o consumo de 0,75 kWh. A partir deste nível de consumo de energia, o grau de refino do bagaço pré-tratado com solução sulfito/alcalina praticamente não alterou. O aumento no grau de refino do bagaço pré-tratado com NaOH foi pequeno e do bagaço sem tratamento ainda foi bastante acentuado. Os bagaços pré-tratados quimicamente mostraram valores finais de grau de refino muito próximos e baixos, evidenciando o efeito positivo destes tratamentos no grau de retenção de água.

Figura 16: Grau de Freeness em função da energia consumida no refinador, (-▲-) bagaço refinado, (-◆-) bagaço tratado com NaOH-refinado e (-■-) bagaço tratado com NaOH-sulfito e refinado

As composições químicas dos bagaços pré-tratados estão apresentadas na Tabela 2. Como referência, foi determinada a composição do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e se obteve 24,4% de lignina, 27,4% de hemicelulose e 43,7% de celulose. Estes valores são semelhantes aos reportados em outros trabalhos com bagaço proveniente do México, Gámez et al. (2006) encontrou 38,9% de celulose, 26,1% de hemicelulose e 23,9% de lignina e Sanjuan et al. (2001) mostrou dados de 42,3% de celulose, 28,6% de hemicelulose e 21,7% de lignina.

Os rendimentos dos processos quimio-mecânicos são altos, conforme relatado para vários materiais lignocelulósicos, como exemplo no tratamento quimio-mecânico de *Eucalyptus regnans* (JONES; RICHARDSON, 2001), *Eucalyptus globulus* (REHBEIN et al, 2010) e bagaço desmedulado (YOUSEF, EL-SAKHAWY, KAMEL, 2005). A solubilização dos componentes do bagaço refinado, pré-tratado com NaOH e com NaOH/Sulfito foi de 6%; 8,6% e 25,1%, respectivamente e portanto o rendimento final variou de 75% a 94%.

Os dados da tabela 2 mostram que os tratamentos mecânico e quimio-mecânico do bagaço promoveram uma grande solubilização principalmente da lignina e da hemicelulose. Na fase de impregnação dos bagaços com os reagentes químicos há um aumento da hidrofiliabilidade da lignina residual ocasionada pela sulfonação do carbono alfa tornando-a mais solúvel (REHBEIN et al., 2010). De fato, verificou-se uma remoção de 16,3% da lignina no bagaço refinado, na presença de NaOH a redução foi de 33,2% e com NaOH/ sulfito, 53,1%. O tratamento alcalino e sulfito alcalino são empregados industrialmente com o objetivo de remover lignina sem que ocorra muita degradação da celulose (ZHU et al, 2009). Os resultados da tabela 2 demonstram esta especificidade, pois a perda de celulose variou de 5 a 7% nos tratamentos. O teor de hemicelulose do bagaço refinado foi semelhante ao bagaço original, mas nos tratamentos com NaOH e NaOH/sulfito a redução foi de 13,3% e 28,7%, respectivamente.

Tabela 2: Caracterização química dos bagaços de cana-de-açúcar de usina, bagaço quimicamente deslignificado e bagaço híbrido.

Amostra Bagaço	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Rendimento (%)	Lignina g/100 g de bagaço inicial	Celulose g/100 g de bagaço inicial	Hemicelulose g/100 g de bagaço inicial
<i>Bagaço de usina</i>							
Não-tratado	24,4	43,7	27,4	100	24,4	43,7	27,4
Refinado	21,7	43,8	28,9	94	20,4	41,2	27,2
Tratado NaOH e refinado	17,8	47,0	25,9	91,4	16,3	43,0	23,7
Tratado NaOH-sulfito e refinado	15,3	54,5	26,9	74,9	11,4	40,5	19,5
<i>Bagaço de usina parcialmente deslignificado</i>							
Não-tratado	14,2	42,5	30,8	100	14,2	42,5	30,8
Tratado com NaOH e refinado	10,5	49,7	29,9	88,6	9,3	44,0	26,5
<i>Bagaço híbrido</i>							
Não-tratado	19,1	42,0	27,0	100	19,1	42,0	27,0
Tratado NaOH e refinado	16,3	47,5	28,8	78,6	12,8	37,3	22,6
Tratado NaOH-sulfito e refinado	11,4	51,2	27,5	77,9	8,8	39,8	21,4

Na amostra de bagaço que foi quimicamente deslignificada com solução de clorito, o tratamento com NaOH removeu 34% de lignina e 14% de hemicelulose. O bagaço híbrido tratado desta mesma forma resultou em 33% de remoção de lignina e 16% de hemicelulose. No híbrido tratado com sulfito-alcalino houve redução de 53,9% e 20,7% no teor de lignina e de hemicelulose, respectivamente.

Os dados de solubilização de sólidos do bagaço híbrido após o tratamento com NaOH/refino mostram uma maior perda de celulose e hemicelulose em relação às outras amostras de bagaço. Isto se deve provavelmente a diferenças estruturais e topoquímica do bagaço híbrido. Pode-se também inferir que por apresentar menor teor inicial de lignina a fibra celulósica do bagaço híbrido foi mais sensível ao tratamento alcalino, provavelmente devido às reações de *peeling* (MOIGNE et al., 2010) em que as unidades de açúcar com extremidades

redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas e podem ser convertidas em diversos ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali efetivo no licor de cozimento (BERGGREN et al., 2003; KNILL; KENNEDY, 2003).

A análise microscópica das amostras de bagaço (Figura 17) revela vários aspectos visuais que corroboram os dados de composição química e redução do grau Freeness das fibras. Observam-se diferenças na espessura das fibras, dobras e curvaturas e o aparecimento de finos após os pré-tratamentos dos bagaços. Dobras e curvaturas apareceram nas fibras com menor teor de lignina (Figura 17 b,c,h,g,i) e o inchamento foi observado nas fibras tratadas com NaOH e NaOH/sulfito (Figura 17c,h,i).

As alterações físicas como fibrilação (Figura 17 a,b,g) e inchamento são efeitos importantes relacionados com o aumento da área de contato e possivelmente aumento da porosidade da parede celular. As fibras dobradas e curvadas (Figura 17 b,c,h,g,i) indicam maior flexibilidade devido a menor quantidade de lignina na parede. O inchamento da parede das fibras tratadas com sulfito (figura 17 i,c) ocorre provavelmente devido a inserção de grupos SO_3^{2-} na lignina residual, tornando a fibra mais hidrofílica (BIERMANN, 1993).

As fibras d, e , f referem-se as figuras (a, b, c), respectivamente, porém após 96h de hidrólise enzimática.

Figura 17: Microscopia óptica das fibras de bagaço submetida a vários pré-tratamentos e hidrólise enzimática. Fibra do bagaço de usina refinado (a), Fibra do bagaço de usina pré-tratado com NaOH (b), fibra do bagaço de usina pré-tratado com sulfito-alcalino (c), fibra do bagaço refinado após 96h de hidrólise enzimática (d,e ,f), fibra parcialmente deslignificada e tratada com NaOH (g),fibra do bagaço híbrido tratado com NaOH (h) e fibra do bagaço híbrido tratado com NaOH/Sulfito (i).

5.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS

Os bagaços de usina, pré-tratado com NaOH ou sulfito/NaOH e refinados a diferentes graus foram hidrolisados com celulasas comerciais. Os dois preparados enzimáticos contêm celulasas e hemicelulasas em sua composição (Tabela 3). As celulasas estão em maior quantidade, porém detectou-se uma atividade de xilanase (6,41UI/mg) e β -xilosidase (0,3 UI/mg).

Tabela 3: Caracterização das atividades enzimáticas e conteúdo de proteína das enzimas comerciais

Enzimas	Proteína (mg/ml)	FPA (FPU/mg proteína)	Endoglucanase (UI/mg proteína)	β -Glicosidase (CBU/mg proteína)	Xilanase (UI/mg proteína)	β -xilosidase (UI/mg proteína)
Celluclast 1.5 L	177,25	0,518	30,23	0,28	6,41	0,30
Novozym 188	26,42	0	0,157	42,83	1,31	0,28

A hidrólise enzimática do bagaço que não foi pré-tratado foi pouco efetiva. O mesmo ocorreu nos bagaços que foram processados no refinador, evidenciando que apenas o tratamento mecânico não foi suficiente para alterar as fibras e promover uma alta conversão enzimática (Tabela 4). Poucos estudos reportam o efeito do tamanho dos substratos na conversão de celulose a glicose. Alguns trabalhos mostram resultados positivos, porém nestes estudos verifica-se um aumento da área superficial associado à redução do tamanho das partículas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009, ZHU et al. 2009b).

Tabela 4: Conversão de celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar a açúcares durante a hidrólise enzimática com 8,8 FPU Celluclast e 13,3 UI β -glucosidase a 2% de consistência

Amostra Bagaço de usina	Grau Freeness (ml)	Conversão de açúcares (%)					
			8h	24h	48h	72h	96h
Não tratado	---	Celulose	10,50	11,38	11,01	15,13	15,03
	---	Hemicelulose	7,30	8,06	7,81	11,24	14,22
Refinado	670	Celulose	10,37	12,58	9,96	10,16	13,30
		Hemicelulose	1,29	4,16	3,71	4,17	5,66
	530	Celulose	9,91	11,37	7,45	15,12	13,51
		Hemicelulose	2,88	3,62	2,67	5,92	5,20
	430	Celulose	11,16	12,14	13,87	17,33	17,44
		Hemicelulose	3,52	4,17	5,45	7,11	7,60
NaOH/ refinado	460	Celulose	20,05	28,70	46,68	43,55	49,96
		Hemicelulose	16,73	23,78	42,42	39,76	50,46
	230	Celulose	23,12	34,96	47,39	48,73	45,32
		Hemicelulose	19,21	27,32	41,37	40,11	41,71
	190	Celulose	30,97	35,30	43,60	48,58	49,54
		Hemicelulose	25,31	31,13	38,39	43,54	48,38
NaOH/ sulfito/ refinado	180	Celulose	54,85	51,05	52,80	78,98	85,05
		Hemicelulose	41,60	43,91	48,24	69,98	76,05
	130	Celulose	47,15	44,26	47,00	56,30	73,45
		Hemicelulose	41,09	33,31	37,34	48,82	54,28
	130	Celulose	55,43	55,21	70,39	70,21	77,44
		Hemicelulose	38,69	46,11	48,78	66,70	63,13

Apesar da hidrólise enzimática do bagaço refinado ter sido pouco eficiente, observou-se um pequeno aumento na hidrólise da celulose e hemicelulose com o aumento no grau de refino (Tabela 4). Isto provavelmente ocorreu pela maior formação de finos no tratamento mecânico (Figura 17a). O aumento no grau de fibrilação de 670 para 430 ml resultou em um pequeno aumento na hidrólise enzimática (de 13,3% para 17,4% após 96 h). Entretanto, as amostras de bagaço quimicamente tratadas e processadas em diferentes graus de refino não

apresentaram diferenças significativas na hidrólise da celulose, mesmo naquelas com maior grau de fibrilação. Este efeito em comparação com a madeira, pode ter ocorrido porque a matéria-prima é o bagaço, que não necessita de muita energia para alcançar um nível satisfatório de redução de tamanho.

Tendo em vista que o grau de refino dos bagaços não influenciou significativamente a conversão enzimática dos polissacarídeos e levando em consideração que o refinador de discos processa somente uma grande massa de bagaço (600 g) decidiu-se avaliar o uso de liquidificador como uma operação de substituição ao refinador de discos (Tabela 5). A hidrólise enzimática da celulose dos bagaços triturados no liquidificador foi semelhante aos resultados de hidrólise dos bagaços processados em refinador de discos (Tabela 4). O bagaço processado no liquidificador não foi efetivamente hidrolisado por celulasas, mas se pré-tratado com NaOH ou sulfito/NaOH mostrou-se muito mais susceptível à hidrólise enzimática.

Tabela 5: Conversão de celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar a açúcares durante a hidrólise enzimática com 8,8 FPU Celluclast e 13,3 UI β -glucosidase, a 2% de consistência

Amostra Bagaço de usina	Conversão	Conversão a açúcares (%)				
		8h	24h	48h	72h	96h
Não tratado	Celulose	10,5 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 0,5	11,0 $\pm$ 0,08	15,1 $\pm$ 0,4	15,0 $\pm$ 0,13
	Hemicelulose	7,3 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,4	11,2 $\pm$ 0,2	14,2 $\pm$ 0,14
triturado	Celulose	10,2 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,1	10,3 $\pm$ 0,6	13,4 $\pm$ 0,12
	Hemicelulose	1,2 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,12	3,6 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,15
NaOH/triturado	Celulose	21,2 $\pm$ 1,1	26,9 $\pm$ 1,7	46,5 $\pm$ 0,13	44,4 $\pm$ 0,8	47,9 $\pm$ 2,1
	Hemicelulose	19,0 $\pm$ 2,3	23,6 $\pm$ 0,2	42,8 $\pm$ 0,4	40,2 $\pm$ 0,5	46,7 $\pm$ 3,8
NaOH/ sulfito/triturado	Celulose	53,1 $\pm$ 1,7	51,6 $\pm$ 0,6	52,2 $\pm$ 0,6	74,7 $\pm$ 4,3	84,8 $\pm$ 0,3
	Hemicelulose	36,2 $\pm$ 5,4	39,2 $\pm$ 4,7	44,0 $\pm$ 4,15	61,7 $\pm$ 8,2	71,9 $\pm$ 4,1

A análise da cinética de hidrólise da celulose mostra um rápido aumento nas primeiras 24 h de reação (Figura 18a). No bagaço não tratado e no bagaço refinado não se observou um aumento na conversão enzimática dos

polissacarídeos após este tempo, entretanto quando o bagaço foi pré-tratado com NaOH e NaOH/sulfito a hidrólise enzimática se estendeu até as 48 h e 96 h, respectivamente.

Comparando-se os resultados de hidrólise do bagaço pré-tratado com NaOH e NaOH/sulfito observa-se que este último resultou em uma melhor conversão enzimática podendo-se citar a menor quantidade de lignina residual e o aumento na hidrofilicidade da lignina, devido à inserção de grupos SO_3^{2-} , como fatores responsáveis pelo aumento da sacarificação (SJOSTROM, 1993). De acordo com Konn et al. (2002), o efeito positivo do pré-tratamento sulfito-alcalino é evidenciado pela sulfonação da lignina na lamela média e parede primária que resulta no aumento do grau de inchamento das fibras (Figura 17c). Segundo vários autores a remoção de lignina aumenta a efetividade das enzimas através da eliminação da adsorção improdutiva e através do aumento a acessibilidade à holocelulose (celulose + hemicelulose). A lignina do bagaço é removida em meio alcalino e como consequência resulta em um resíduo enriquecido em polissacarídeos (KIM; HOLTZAPPLE, 2006, LU et. al, 2002; JØRGENSEN, OLSSON, 2006, ZHU et al., 2007). Este substrato em geral é menos recalcitrante e proporciona uma maior sacarificação enzimática. Observa-se a formação de grande número de cavidades que se estendem do interior das fibras (Figura 17 d) para as extremidades nos bagaços com menor teor de lignina após o tratamento enzimático (Figuras 17 e,f).

A hidrólise enzimática da hemicelulose também foi analisada (Figura 18b). O comportamento da conversão de hemicelulose foi semelhante à da celulose. A conversão da hemicelulose a xilose, apesar de um pouco inferior à da celulose, foi bastante expressiva, consequência da atividade de hemicelulases (xilanase e β -xilosidase) presentes no extrato comercial utilizado nas hidrólises dos bagaços (Tabela 3). A conversão de hemiceluloses assim como da celulose depende da carga e do tipo de enzimas presentes no extrato enzimático (TABKA et al., 2006). Uma maior conversão de hemiceluloses poderia ter ocorrido se fosse utilizada uma maior carga de enzimas, ou ainda se outras enzimas envolvidas na hidrólise completa da hemicelulose estivessem presentes. Entretanto, as ramificações existentes na hemicelulose impedem a sua hidrólise completa a xilose (PUCHARD; BIELY, 2008).

No bagaço pré-tratado com NaOH a hidrólise enzimática da hemicelulose manteve-se aproximadamente constante após 48 h e atingiu 46% de conversão. Na amostra tratada com solução sulfito-alcálico a conversão aumentou progressivamente até 96h de reação, alcançando aproximadamente 71% de conversão.

Figura 18: Hidrólise enzimática da celulose (a) e da hemicelulose (b) do bagaço de cana-de-açúcar de usina: (-▲-) não-tratado, (-◆-) tratado mecanicamente, (-■-) tratado químic-mecanicamente com NaOH e (-●-) tratado químic-mecanicamente com NaOH-sulfito. As barras de erro representam a variação entre a hidrólise com duas repetições. Quando não estiver visível a barra de erro, indica que o erro foi menor que o símbolo.

Os resultados mostram que a remoção de lignina e hemicelulose do bagaço aumenta a sacarificação dos polissacarídeos, pois a lignina e hemicelulose são barreiras que limitam a hidrólise completa da biomassa (ZHU et al., 2007, ÖHGREN et al., 2007). No bagaço pré-tratado com NaOH houve remoção de 33% de lignina e 13% da hemicelulose e 50% de conversão enzimática da celulose. O pré-tratamento sulfito-alcálico removeu cerca de 50% de lignina e 30% de hemicelulose e a conversão de celulose alcançou 85% em 96 h de hidrólise.

A correlação entre a remoção de lignina e de hemicelulose durante o pré-tratamento e a eficiência de sacarificação é mostrada na Figura 19. Observa-se que a hemicelulose começa a ser removida do bagaço depois que cerca de 30% da lignina já havia sido removida e que abaixo de 16% de remoção da lignina não se detecta hidrólise expressiva da celulose.

Figura 19: Correlação entre a remoção de lignina (-●-) e de hemicelulose (-■-) durante o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar de usina e a eficiência da hidrólise enzimática. As barras de erro representam a variação entre a hidrólise com duas repetições. Quando não estiver visível a barra de erro, indica que o erro foi menor que o símbolo.

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos, onde o teor de lignina foi reduzido em alfafas transgênicas (CHEN; DIXON, 2007). Segundo

esses autores a quantidade de lignina no material está diretamente relacionada à digestão enzimática. Um outro estudo com deslignificação seletiva avaliou a remoção seletiva de lignina da parede celular de madeira usando líquidos iônicos e demonstrou claramente uma correlação direta entre a quantidade de lignina removida e o aumento da digestibilidade enzimática do material residual (LEE et al., 2009). O formato da curva em S indica que há uma faixa de remoção de lignina e hemicelulose, que possibilita um importante aumento na eficiência da hidrólise enzimática. No caso deste trabalho a remoção entre 18% e 25% de hemicelulose e 40% a 50% de lignina possibilitou uma conversão de celulose acima de 60%. Além da redução no teor de lignina e hemicelulose, é sabido que as propriedades dos materiais lignocelulósicos são particularmente afetadas por pré-tratamentos alcalinos. Há um aumento do teor de grupos iônicos e promove a clivagem de algumas ligações inter-poliméricas, incluindo ligações lignina-carboidrato (CHEN et al., 1996). Se o pré-tratamento introduz íons sulfito, ocorre a sulfonação da lignina, o que aumenta a retenção de água da fibra e melhora a dissolução da lignina (BIERMANN, 1993; KONN et al., 2006). As principais reações químicas que ocorrem na hemicelulose são desacetilação e dissolução de frações de baixo peso molecular e na lignina ocorre a clivagem de ligações α -éter. No caso do bagaço de cana e outras gramíneas, o pré-tratamento alcalino também é eficiente na clivagem dos ésteres de ácidos ferúlico e cumárico ligado à lignina ou à hemicelulose (LANN et al., 2003; ASHWINI et al., 2008; MOUSAVIOUN; DOHERTY, 2010).

O processo quimio-mecânico para a retirada de parte da lignina e hemicelulose do bagaço foi realizado em condições relativamente brandas em comparação a outras matérias-primas. Para testar a hipótese de que plantas com menor teor inicial de lignina seriam adequadas para estes tipos de pré-tratamentos, duas amostras foram avaliadas: bagaço parcialmente deslignificado e bagaço híbrido.

As composições químicas e as respostas dessas amostras ao pré-tratamento quimio-mecânico foram apresentadas na Tabela 2. O bagaço parcialmente deslignificado e o híbrido apresentaram teores iniciais de lignina de 14,2% e 19,1%, respectivamente. Estas duas amostras experimentais contêm menor teor de lignina inicial do que o bagaço de usina (24,4% de lignina) e por esse motivo foi realizado inicialmente o pré-tratamento com álcali por acreditar

que este pré-tratamento já seria suficiente para remover grande parte da lignina e hemicelulose do bagaço. Os efeitos físicos ocasionado pelo pré-tratamento químio-mecânico na fibra relatado anteriormente, repetiram-se nas amostras com menor teor inicial de lignina (Figura 17 g,h,i), ou seja, ocorreram fibrilações, inchamento e dobras nas fibras. Verificou-se uma remoção de 34% de lignina e 14% de hemicelulose para o bagaço parcialmente deslignificado e para o híbrido os valores foram de 33% e 16%, respectivamente. A remoção de lignina e hemicelulose foi muito semelhante nos pré-tratamentos das amostras de bagaço.

A hidrólise enzimática do bagaço deslignificado (10,5% de lignina residual) promoveu 63% de conversão da celulose em 24 h. A conversão enzimática do bagaço híbrido (16,3% de lignina) ficou próxima a 45% (Figura 20). Este valor foi semelhante ao obtido com o bagaço de usina pré-tratado com NaOH com 96h de hidrólise enzimática. Estes dados sugerem que programas de melhoramento visando seleção de plantas com menor teor de lignina favoreceriam o uso de pré-tratamentos mais brandos no âmbito das biorefinarias. Consequentemente as polpas obtidas seriam hidrolisadas de forma mais eficiente pelas enzimas. No entanto, o presente estudo, mostrou que o benefício das plantas com teor inicial de lignina reduzido tornou-se mais significativo quando o teor de lignina foi reduzido para aproximadamente metade de seu valor original.

Figura 20: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por processo quimio-mecânico alcalino: (-●-) bagaço de usina; (-▲-) bagaço híbrido e (-■-) bagaço parcialmente deslignificado. Os símbolos vazios referem-se à mesma amostra, porém com acréscimo de enzimas após 48hs de reação. As barras de erro representam a variação entre a hidrólise com duas repetições. Quando não estiver visível a barra de erro, indica que o erro foi menor que o símbolo.

A figura 20 mostra que a hidrólise da celulose e hemicelulose praticamente se estabilizou após 48 horas de ensaio, apresentando uma variação de no máximo 2% nos valores. Tipicamente, a taxa de hidrólise enzimática dos polissacarídeos decresce rapidamente com o tempo. Este comportamento leva à redução no rendimento de formação de açúcares solúveis, longos tempos de processo e altas dosagens enzimáticas. Muitas hipóteses têm sido apresentadas para explicar este fato, incluindo a instabilidade térmica das celulasas, inibição pelos produtos da hidrólise, transformação do substrato em uma forma mais recalcitrante e heterogeneidade do substrato (YANG et al, 2006). Esses efeitos poderiam ser superados aumentando a concentração da enzima na reação ou pela adição de mais enzima ao substrato que já havia sido parcialmente hidrolisado. Assim, depois de 48 horas de hidrólise adicionou-se uma segunda carga de enzima ao ensaio (Figura 20 - símbolos vazios). Observou-se que mesmo com o acréscimo de enzima não houve aumento na conversão de celulose (Figura 20a), porém houve um pequeno aumento na conversão de hemicelulose (Figura 20b). Este tipo de experimento tem sido usado para identificar os fatores que controlam a hidrólise da celulose (DESAI; CONVERSE, 1997; ZHANG et al., 1999), e alguns resultados indicam que a redução na taxa de hidrólise da celulose pode ser explicada pelo declínio na reatividade do substrato (ZHANG et al., 1999). É que depois de um curto período de digestão do substrato, este se torna enriquecido em lignina tornando-se progressivamente mais recalcitrante e com maior chance de ocorrência de adsorção improdutiva das celulasas e hemicelulasas na lignina residual (RYU; KIM, 1998, PALONEN et al., 2004). Porém, a reatividade do substrato pode não ser a única causa para o declínio da hidrólise da celulose. Através da reaplicação de enzima ao ensaio poderiam ser tiradas informações sobre a reatividade do substrato, desde que houvesse completa remoção da celulase adsorvida antes de segunda adição de enzima. Em nossos ensaios apesar da carga de enzima usada ter sido baixa (8,8 FPU/g bagaço), a ineficiência da segunda adição de enzima em aumentar a hidrólise da celulose pode ter ocorrido pela obstrução do acesso aos polissacarídeos pela própria celulase. Uma parte da celulase provavelmente não se desdorta da celulose, ficando o substrato indisponível para novas hidrólises. Estudos com adição prévia de albumina bovina (BSA) ao substrato lignocelulósico mostraram uma melhora na adsorção improdutiva das celulasas, visto que BSA

adsorve seletivamente à lignina deixando a celulose livre para a ação das celulasas (YANG; WYMAN, 2006). Um tratamento do substrato parcialmente hidrolisado com proteases antes da adição de enzima fresca poderia ser usado para limpar a superfície do substrato e verificar se haveria um aumento na taxa de hidrólise com o tempo (YANG et al, 2006).

5.3.EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO SULFITO-NAOH NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS POLISSACARÍDEOS

O tratamento químico-mecânico do bagaço foi feito com solução NaOH/sulfito mantendo-se a relação de 1:2. O estudo da concentração da solução requerida para se atingir um determinado grau de deslignificação foi realizada com diferentes concentrações de NaOH e sulfito as quais proporcionaram intensidades distintas de deslignificação do bagaço. Na Tabela 6 está apresentada a composição química do bagaço e o balanço de massa dos componentes para uma massa inicial de bagaço de 100 g (base seca).

Verifica que com 2,5% de NaOH e 5% de sulfito ocorreu a solubilização de 24,6% de lignina e uma pequena solubilização de celulose e hemicelulose (menos de 2%) em relação à massa de bagaço inicial. Com o aumento da carga química para 3,75% de NaOH e 7,5% de sulfito houve solubilização de 42,6% de lignina, 12,4% de hemicelulose e 3,8% de celulose. A maior remoção de lignina, de celulose e hemicelulose ocorreu com 5% de NaOH e 10% de sulfito e foi de 53,2%, 7,5% e 28,5% , respectivamente. Assim, com aumento da concentração de NaOH e sulfito houve maior deslignificação do material lignocelulósico, o que está de acordo com o objetivo do pré-tratamento.

Tomando como base o trabalho de Rehbein et al., (2010) que relaciona o grau de sulfonação da lignina com a sua solubilização em meio ácido, os dados da Tabela 7 indicam a presença de uma lignina residual mais sulfonada após o pré-tratamento sulfito-alcalino. Entretanto, não se observou uma correlação positiva entre a concentração de reagentes e a lignina solúvel. Em meio sulfito-alcalino ocorre a fragmentação da lignina e subsequente solubilização, enquanto

que na ausência de NaOH a sulfonação da lignina é acelerada (REHBEIN et al., 2010).

Tabela 6: Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar de usina tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.

Tratamento do bagaço		Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Rendimento (%)	Lignina g/100g de bagaço	Celulose g/100g de bagaço	Hemicelulose g/100g de bagaço
NaOH (%)	Na ₂ SO ₃ (%)							
0	0	24,4	43,7	27,3	100	24,4	43,7	27,3
2,5	5,0	19,0	47,0	27,7	96,8	18,4	45,5	26,8
3,75	7,5	15,9	47,4	27,0	88,6	14,0	42,0	23,9
5	10	15,3	54,5	26,9	74,9	11,4	40,4	19,5

Tabela 7: Conteúdo de lignina solúvel e insolúvel do bagaço de cana de açúcar de usina tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.

Tratamento do bagaço		Lignina (%)	Lignina insolúvel (%)	Lignina solúvel (%)	Lignina solúvel/ lignina insolúvel (%)
NaOH (%)	Na ₂ SO ₃ (%)				
0	0	24,4	22,4	2,02	9
2,5	5,0	19,0	15,9	3,1	19,5
3,75	7,5	15,9	13,5	2,34	17,3
5	10	15,3	13,6	1,7	12,5

As amostras de bagaço de usina obtidas dos diferentes tratamentos com solução NaOH/sulfito apresentaram diferenças na hidrólise enzimática (Figura 21) e isso pode estar relacionado com o teor de lignina e hemicelulose residual nas amostras, pois esses componentes lignocelulósicos apresentam-se como uma

barreira limitante ao acesso das celulasas a celulose, reduzindo a eficiência da hidrólise enzimática (MUSSATO et al.,2008).

Comparando-se os resultados de hidrólise do bagaço tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito (Figura 21), observa-se que o bagaço tratado com 2,5% de NaOH e 5% de sulfito resultou numa baixa conversão enzimática. Nessa amostra a maior conversão de celulose foi 36,3% e de hemicelulose 26,4%, após 96 horas de reação. Nos bagaços pré-tratados com NaOH-sulfito nas proporções 3,75%-7,5% e 5%-10%, observa-se um aumento na sacarificação da celulose de 71,93% para 84,4% e hemicelulose de 58,5% para 65,4%. Esse aumento provavelmente aconteceu devido a menor quantidade de lignina e hemicelulose na amostra.

Figura 21: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar de usina pré-tratado por processo químo-mecânico: (●) 2,5% de NaOH e 5% de sulfito; (■) 3,75% de NaOH e 7,5% de sulfito (▲) e 5% de NaOH e 10% de sulfito. As barras de erro representam a variação entre a hidrólise com duas repetições. Quando não estiver visível a barra de erro, indica que o erro foi menor que o símbolo.

Realizou-se o tratamento quimio-mecânico do bagaço híbrido a fim de verificar qual a concentração de solução NaOH/sulfito requerida para se alcançar os mesmos níveis de deslignificação do tratamento com o bagaço de usina. A tabela 8 apresenta os efeitos do tratamento na composição do material.

Tabela 8: Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar híbrido tratado com diferentes concentrações de NaOH e sulfito.

Tratamento do bagaço		Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Rendimento (%)	Lignina g/100g de bagaço	Celulose g/100g de bagaço	Hemicelulose g/100g de bagaço
NaOH (%)	Na ₂ SO ₃ (%)							
0	0	19,12	41,98	27,03	100	19,12	41,98	27,03
2,5	5,0	19,21	45,25	26,26	88,36	16,97	39,98	23,20
3,75	7,5	16,12	47,95	26,77	85,79	13,82	41,13	22,96
5	10	11,38	51,16	27,54	77,93	8,86	39,86	21,46

Os dados de rendimento mostram a solubilização de 11,6%, 14,2% e 22,1% do material com o aumento de concentração de NaOH e sulfito. O principal componente removido com o pré-tratamento foi a lignina. No tratamento com 2,5%-5% de NaOH-sulfito houve remoção de 11,2 % de lignina, com 3,75 %-7,5% NaOH-sulfito, 27,7 % e com 5%-10% NaOH-sulfito, 53,7 %. A porcentagem de celulose removida do material foi muito pequena (5%) na concentração mais alta dos reagentes. Ocorreu também a remoção de 14,2 %, 15,0 % e 20,6 % de hemicelulose com o aumento da concentração da solução.

A hidrólise enzimática das polpas de bagaço do híbrido revelou que na condição de pré-tratamento mais branda obteve-se uma baixa hidrólise dos polissacarídeos. A conversão de celulose a glicose foi 35,5% e da hemicelulose a xilose, 27,2% (Figura 22).

Figura 22: Conversão de celulose (a) e hemicelulose (b) após a hidrólise enzimática de três amostras de bagaço de cana-de-açúcar híbrido pré-tratado por processo quimio-mecânico: (-●-) 2,5% de NaOH e 5% de sulfito; (-■-) 3,75% de NaOH e 7,5% de sulfito e (-▲-) 5% de NaOH e 10% sulfito. As barras de erro representam a variação entre a hidrólise com duas repetições. Quando não estiver visível a barra de erro, indica que o erro foi menor que o símbolo.

O bagaço híbrido tratado com 3,75%-7,5% de NaOH-sulfito converteu aproximadamente 60% de celulose a glicose e 48,7% de hemicelulose a açúcares em 48 h de reação e depois deste tempo a hidrólise dos polissacarídeos apresentou um pequeno aumento. O tratamento do bagaço híbrido com 5%-10% de NaOH-sulfito apresentou uma curva de hidrólise um pouco mais acentuada alcançando uma conversão 92,3% da celulose e de 77,1% de hemicelulose, demonstrando que com este tratamento o material ficou mais susceptível ao acesso das enzimas, possibilitando essa alta conversibilidade.

Sob outro ponto de vista, os dados da Figura 23 mostram que as polpas obtidas do bagaço híbrido apresentaram melhor hidrólise quando comparadas com as polpas obtidas do bagaço da usina obtidas na mesma concentração de sulfito-NaOH. O tempo necessário para hidrolisar 70% da celulose do bagaço híbrido foi metade daquele necessário para hidrolisar o bagaço de usina.

Figura 23: Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar da usina e híbrido pré-tratados por processo químico-mecânico com 5% de NaOH e 10% sulfito. Híbrido com teor inicial de lignina 19,1% (-▲-) e bagaço de usina com teor inicial de lignina 24,4% (-◆-).

As três condições de tratamento com NaOH-sulfito empregadas para os bagaços foram capazes de produzir polpas com níveis de degradação enzimática bastante distintos. A carga de sulfito-NaOH que produziu 50% de conversão de celulose a partir do bagaço híbrido é cerca de 1,5 pontos percentuais menor do que a necessária para o tratamento do bagaço de usina (Figura 24).

Figura 24. Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar da usina e híbrido a partir da aplicação de diferentes cargas de NaOH-sulfito para tratamento quimio-mecânico. Híbrido com teor inicial de lignina 19,1% (-▲-) e bagaço de usina com teor inicial de lignina 24,4% (-◆-).

Na figura 25 está representada a hidrólise enzimática das polpas produzida pelo pré-tratamento quimio-mecânico do bagaço híbrido (5%-10% de NaOH-sulfito) e do bagaço deslignificado (5% de NaOH). Apesar dos reagentes usados no pré-tratamento das amostras terem sido diferentes, o teor de lignina residual foi semelhante. No bagaço híbrido foi determinado 8,9% de lignina e no bagaço deslignificado, 9,3%. Comparando-se a hidrólise enzimática das amostras verificam-se resultados muito diferentes. No bagaço híbrido a hidrólise da celulose chegou a 92,3% e da hemicelulose a 77,1%, comparativamente bem superior ao obtido com o bagaço deslignificado pré-tratado apenas com NaOH. Esse

resultado evidencia a grande importância da incorporação de sulfito ao tratamento dos bagaços, pois conforme amplamente discutido neste trabalho a adição de grupos sulfônicos à lignina confere maior hidrofiliabilidade do material (SJOSTROM, 1993). Sendo assim, espera-se uma menor adsorção improdutiva nesta lignina residual e uma maior acessibilidade enzimática devido ao inchamento da fibra.

Figura 25: Conversão de celulose dos bagaços de cana-de-açúcar deslignificado quimicamente (5% NaOH) e híbrido pré-tratados por processo quimio-mecânico com 5% de NaOH e 10% sulfito. Híbrido com teor residual de lignina 8,9% (-▲-) e bagaço deslignificado com teor residual de lignina 9,3% (-●-).

6.CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- O tratamento mecânico do bagaço promoveu absorção de água determinado pela diminuição do grau de *Freeness*, porém apenas este procedimento não foi suficiente para uma melhora na conversão enzimática da celulose e da hemicelulose.
- O tratamento quimio-mecânico do bagaço aumentou a eficiência de conversão enzimática do bagaço, principalmente com acréscimo de sulfito à solução alcalina.
- As amostras tratadas quimio-mecanicamente com NaOH apresentaram pouca alteração no rendimento da sacarificação após 48hs de hidrólise enzimática e isso pode ser justificado por efeitos de modificação estrutural do bagaço.
- As maiores conversões de celulose e de hemicelulose ocorreram após 96 horas de reação nos bagaços tratados quimio-mecanicamente com 5% de NaOH e 10% de sulfito, resultado do baixo teor de lignina dessas amostras.
- Amostras com menos lignina foram hidrolisadas num menor tempo de reação (24 h) e o valor de conversão da celulose foi da mesma ordem de grandeza que obtido após 96h de hidrólise do bagaço de usina pré-tratado com NaOH. Estes dados sugerem que programas de melhoramento visando seleção de plantas com reduzido teor de lignina favorecem o uso de rápidos pré-tratamentos no âmbito das biorefinarias.
- Os resultados da conversão enzimática do bagaço híbrido e de usina tratados com diferentes concentrações de NaOH e sulfito foram semelhantes por apresentarem após o tratamento teores de lignina aproximadamente iguais.

REFERÊNCIAS

ASHWINI, T.; MAHESH, B.; JYOTI K.; UDAY, A. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.56, p.7644–7648, 2008.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 305–350, 2003.

BASTAWDE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p.353-368, 1992.

BAUDEL, H.M.; ZAROR, C.; ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.309-315, 2005.

BENAR, P. **Ligninas acetosolv e formacell de eucalipto e de bagaço de cana: isolamento, fracionamento, caracterização e uso como componente de resinas fenólicas do tipo resol**. Tese (Doutorado): Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1996.

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

BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖN, M. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.255–264, 2003.

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

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

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

BIERMANN C.J. Essentials of Pulping and Papermaking. **Academic Press**, San Diego, p. 32-48, 1993.

BRIENZO, M; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.1195-1205, 2010.

BROWING, B. **Methods of Wood Chemistry**. New York: John Wiley and Sons, p.882, 1967.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia para “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, 48-52, 2009.

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

CASTRO, A.M.; JUNIOR, N.P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química. Nova**, v.15, p. 1-8, 2009.

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

CHEN, H-T.; FUNAOKA, M.; LAI, Y-Z. Characteristics of Bagasse Lignin in Situ and in Alkaline Delignification. **Holzforschung**, v.52, p.635-639, 1997.

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

CHESSON, A.; GARDNER, P.T; TIMOTHY, J. Wood cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. **Journal Science Food Agricultural**, v. 75, p.289-295, 1997.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, G. **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**. London:Academic Press Limited, 1988, p.11-30.

DESAI, S.G.; CONVERSE, A.O. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 56, p.650–655, 1997.

DENCE, C. W.; LIN, S.Y. **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin:Ed. Springer, 1992, p.33-62.

DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57-58, p. 171-182, 1996.

DIVNES, C.; STAHLBERG, J.; REINKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J.K.C.; TEERI, T.T.; JONES, A. The three-dimensional crystal structure of catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v.265, p. 524-528, 1994.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y.H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987.

FERNANDEZ, N.; MORCK, R.; JOHNSRUD, S.C.; KRINGSTAD, K.P. Carbon-13 NMR Study on Lignin from Bagasse. **Holzforschung**, v.44, p.35-38, 1990.

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

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

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.19, p. 1–13, 2007.

FINCH, P.; ROBERTS, J. C. **Cellulose Chemistry and Its Applications**. Nevell Zeronian: John Wiley e Sons, 1985, v.12, p.312-343.

FREDHEIM, G.; CHRIDTENSEN, B.E. Polyelectrolyte Complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan. **Biomacromolecules**, p.232-239, 2003.

GALVÃO, M.L.; RAMOS, L. P.; ECHTERHOFF, M.M.; FONTANA, J. D. Autohydrolysis and acid-catalyzed steam explosion of sugarcane bagasse. In: **BRAZILIAN SYMPOSIUM CHEMISTRY LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS**, 6, 2001, p.200-205.

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

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

GILKES, N. R.; HENRISSAT, B; KILBURN, D. G; MILLER, R. C. JR ; WARREN, R. A. J. Domains in Microbial β 1-4 glycanase sequence conservation, function and enzyme families. **Microbilological Reviews**, v. 55, p. 305-305, 1991.

GORING, D.A.I. Some aspects of the topochemistry of lignin in softwoods and hardwoods.In: **ISWPC STOCKHOLM**,1,1981, p.1-10.

GREY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10,p.141-146, 2006.

GUSAKOV, A.V.; SAHOVICK, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.M.; BAEZ, M.; SINITSYNI, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hidrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97,p.1028-1038, 2007.

GUSTAFSON, R.R.; JIMÉNEZ ,G.; MCKEAN ,W.T.; CHIAN, D. The role of penetration and diffusion in no uniform pulping of softwood chips. **Tappi Journal**, v.72, p.163–167,1989.

HERSCHMILLER, W. A new process for pulping with high hidrosufide concentration. **Tappi Journal**, v. 80, p.115-121, 1997.

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

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

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

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

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

JACKSON L.,A; SHADLE G.,L; ZHOU R.; NAKASHIMA J.; CHEN F.; DIXON R.,A.; Improving saccharification efficiency of alfalfa stems through modification of the terminal stages of monolignol biosynthesis. **Bioenergy Resource**, v.1,p.180-192, 2008.

JAYME, G.; TORGERSEN ,H.F. Topochemie der Delignifizierung beim Aufschluss von Fichtenholz nach dem Sulfit- und Sulfatverfahren. Teil I: Ultraviolett-mikroskopische Untersuchungen an teilweise delignifizierten Fichtenholz. **Holzforschung**, v. 21, p. 110–116, 1967.

JEFFRIES, T.; KLUNGNESS, J. H.; SYKES, M.; CROPSEY, K. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. **Tappi Journal**, v. 77, p. 173–177, 1994.

JONES, T.,G.; RICHARDSON, J.,D. Chemimechanical pulping of New Zealand-grown *Eucalyptus regnans*, **Appita**, v.54, p. 265–271, 2001.

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

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

JUNG, H.G.; DEETZ, D.A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1993, p.315-346.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. **Review Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review**. Department of Biological and Agricultural Engineering. Raleigh: North Carolina State University, 2009, p.1515–1523.

KHRISTOVA, P.; KORDSACHIA, O.; PATT, R. ; KARAR, I.; KHIDER, T. Environmentally friendly pulping and bleaching of bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.23, p.131-139, 2006.

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers*, v.51, p.281–300, 2003.

KLYOSOV, A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry**, v.29, p.10577-10585, 1990.

KOCH, G.; PULS, J.; BAUCH, J. Topochemical characterization of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). **Holzforschung**, v.57, p.339–345, 2003.

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

KONG, C.R.E.; SOLTES, E.J.F. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34-35, p. 23–35,1992.

KONN, J.; HOLBOM, B.; NICTULL,O. Chemical reactions chemimechanical pulping: material balances of wood components in a CTMP process. **Journal of Pulp and Paper Science**, v.28, p.395-399, 2002.

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

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

KUMAR, R.; SINGH,S.; SINGH,O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass:biochemical and molecular perperctives. **J. Ind. Microbial Biotechnol.**, v.35,p.377-391,2008.

LADISCH, M.R.; LIN, K.W.; VOLOCH, M.; TSAO, G.T. Process considerations in the enzymatic-hydrolysis of biomass. **Enzyme Microbiology Technology**, v.5, p.82–102,1983.

LANN, T.B.; IYAMA, K., STONE, B.A. Hotalkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Loliumperenne* and their relation to in vitro wall digestibility. **Phytochemistry**, v.64, 603-607,2003.

LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1368-1376, 2009.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.66, p. 506, 2002.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotech. & Bioeng.*, v.77,p.467-475,2002.

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

LOBO, P.C.; JAGUARIBE, E.F.; RODRIGUES, J.; ROCHA, F.A.A. Economics of alternative sugar cana milling options. *Applied Thermal Engineering*, v.27, p.1405-1413, 2006.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. Cellulase Adsorption and an Evaluation of Enzyme Recycle During Hydrolysis of Steam-Exploded Softwood Residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*,v. 98-100, p.641-654,2002.

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

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

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

MOIGNE, N.; JARDEBY, K., NAVARD, P. Structural changes and alkaline solubility of wood cellulose fibers after enzymatic peeling treatment. **Carbohydrate Pol.** v.79, p.325 -332, 2010.

MOUSAVIOUN, P.; DOHERTY W.O.S. Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. **Ind Crops Prod.**,v.31,p.52-58,2010.

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

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

NGUYEN, D.; ZHANG, X.; JIANG, Z.; AUDET, A.; PAICE, M. G.; RENAUD, S.; TSANG, A. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: accessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 130-136, 2008.

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

OINONEN, A.M. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. **VTT Technical Research Centre of Finland**, p.15-19, 2004.

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

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

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

POLCIN, J.; FARKAS, J.; KARHANEK, M. Morphological structure changes of cellulose fibres during sulphate delignification investigated by electron microscope. **Pulp Paper Magaz.**, v.68, p.537–584, 1967.

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

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

RAMOS, R.L.B.; TOVAR, F. J.; JUNQUEIRA, R. M.; LINO, F.B.; MARTINS-SACHETTO, G. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.235-241, 2001.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P.F.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S.A.; CHISTENSEN, J.H.; BOERJN, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry**, v.3, p.29–60, 2004.

REILLY, P. J. Xylanases: Structure and function. In: Alexander Hollaender. **Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals**, p.111-129, 1981.

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

RIPOLI CC, RIPOLI MLC. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques, 2004, p.1-11, p.57- 61.

RICHARDSON, G.; SUN, Y.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A.M. Effects of Ca- and Na-lignosulfonate on starch gelatinization and network formation. **Carbohydr. Polym.**, v.57, p. 369, 2004.

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

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

SAHA, B., C. α -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p.403-442, 2000.

SAHA, B., C. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from newly isolated *Fusarium proliferatim*. **Biorsource**, v. 90, p.33-38, 2003b.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270-5295, 2008.

SANJUAN, R., ANZALDO, J., VARGAS, J., TURRADO, J., PATT, R. Morphological and chemical composition of pitch and fiber from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und wekstoff**, v.59, p.447-450, 2001.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v.32, p.36662-667, 2009.

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

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

STENIUS, P. **Forest products chemistry**.Papermaking Science and technology,Fapet Dy: Gummerus, 2000, p.83.

STICKLEN, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol . **Nature reviews-genetics**, v. 9, p. 433- 443, 2008.

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

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

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

VALLANDER, L. ;ERIKSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.**, v.27, p.650-659, 1985.

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

WANG, D.L.K.; PATT,R. Alkaline sulfite-antraquinone pulping of bagasse. **Holzforschung**, v.43, p. 261-264, 1989.

WANG GS, PAN XJ, ZHU JY, GLEISNER R, ROCKWOOD D. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnol Progress.**;25: 1086-1093,2009.

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

WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**,v. 18, p.75–90,1988.

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

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

YANG,B.;WILLIES, D.M; WYMAN, C.E. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94,p.,2006.

YOUSEF,A. H.; SAKHAWY-EL,M.; KAMEL, S. Multi-stage bagasse pulping by using alkali/Caro's acid treatment. **Industrial Crops and Products**, v.21,p.337–341,2005.

ZANUTTINI, M.; MOCCHIUTTI, P.; INALBON, M.C. The deacetylation reaction in Eucalyptus wood: Kinetics and effects on the effective diffusion. **Bioresource Technology**, v.100 ,p.2254–2258, 2009.

ZHANG, S.; WOLFGANG, D.E.; WILSON, D.B. Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis. **Biotechnology Bioengineering**, v.66,p.35–41.,1999.

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

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

ZHU, L.;DWYER, J.P.;CHANG,V.S.;GRANDA,C.B.;HOLTZAPPLE,M.T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, p.1-12,2007.

ZHU, L.; DWYER, J.P.; CHANG, V.S.; GRANDA, C.B; HOLTZAPPLE, M.T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**,v.99, p.3817-3828, 2008.

ZHU, J.Y.; PAN, X. J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource technology**, p.2411-2418, 2009a.

ZHU, J.Y.;WANG,G.S.;PAN,X.J.; GLEISNER,R. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment softwood for enzymatic saccharification. **Chemical Engineering Science**, v.64,p.474-485, 2009b.

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

ZHU W, ZHU JY, GLEISNER R, PAN XJ. On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine.**Bioresource Technology**, v.101, p. 2782–2792,2010.