UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GERMANO ANDRADE SIQUEIRA

**Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e
distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na
parede celular**

Lorena – SP

2011

GERMANO ANDRADE SIQUEIRA

**Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e
distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na
parede celular**

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

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

Lorena – SP

2011

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

Siqueira, Germano Andrade

Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular. / Germano Andrade Siqueira. – 2011.

99 p. : il.

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

Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Lignina 3. Hidrólise enzimática 4. Topoquímica 5. Ácidos hidroxicinâmicos. I. Título

664.113 - CDU

*Dedico esse trabalho aos meus
pais, Carlos e Maria, pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade para seguir esse caminho e chegar até aqui, me dando força e coragem para vencer os desafios.

Aos meus pais, Carlos e Maria, pelo apoio, presença, amor e carinho, nos momentos de alegria e de dificuldades.

Aos meus irmãos, Guilherme e Giovani, pela cumplicidade, amor e respeito. E pelos momentos de diversão!

Aos meus avós Jairo, *in memorian*, Conceição, Ary e Glória pelo carinho e amor.

A quem sempre esteve comigo, torcendo por mim, como uma luz iluminando meu caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Adriane, pela orientação, paciência, apoio, dedicação e confiança, sempre acreditando que conseguiríamos. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. André Ferraz, pela disposição, pelos conselhos, sempre construtivos, e apoio durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Walter de Carvalho, pelo apoio e sugestões.

À Natasha, pelo amor e carinho, paciência, principalmente durante a produção desse trabalho.

Aos meus grandes amigos, Lucas, Tchá-Tchá, Gabriel, Fernanda e Monique, que, mesmo distantes, sempre estiveram presentes. Obrigado, amigos!

Aos amigos de laboratório, Cecéu, Victor, Paula, Fernanda, Joseana, Sérgio, Débora Laurito, Michel, Hugo, Dani Gurpilhares, Dani Cortez, Robson, Debora Grinet, Jéssica, Thiago e Renato por ajudar a conduzir as atividades de pesquisa e também pelos momentos de diversão e alegria durante o trabalho.

Aos demais companheiros do Departamento, pelos momentos de descontração nos corredores nos horários de café.

À Juliete, pela importante ajuda no trabalho.

Ao Zé Moreira, Zé Cobrinha e Djalma, pela constante ajuda e disposição.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro no Projeto Temático BIOEN/PRONEX 08/5625-5.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar mais essa etapa!

“Algumas pessoas vêem as coisas como elas são
e se perguntam: Por quê? Eu sonho com coisas
que nunca foram e pergunto: Por quê não?”

(Bernard Shaw)

RESUMO

SIQUEIRA, G.A. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular.** 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

O bagaço de cana-de-açúcar é um material rico em celulose, molécula que pode ser convertida enzimaticamente em glicose pela ação de celulases. No entanto, no bagaço, a celulose está associada à hemicelulose e à lignina, componentes que limitam a sua digestibilidade enzimática. A lignina é o principal limitante da hidrólise da celulose, reduzindo a acessibilidade das enzimas celulolíticas. A hemicelulose também limita a ação das celulases e a presença de ácidos hidroxicinâmicos, como ferúlico e cumárico contribuem para reduzir os níveis de hidrólise. Nesse trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar foi tratado com clorito de sódio em meio ácido com o objetivo de remover seletivamente a lignina e produzir modelos com teores reduzidos desse componente. O bagaço de cana controle continha 22,8% de lignina e após a deslignificação por 4 horas, materiais com até 6,8% de lignina foram obtidos, mantendo quase inalteradas as frações celulósicas e hemicelulósicas. Os bagaços foram submetidos à hidrólise enzimática com celulases comerciais. Apenas 26% da celulose de bagaço controle foram convertidos em glicose e 11% da xilana foram convertidos em xilose, com 72 horas de hidrólise. Nos bagaços com menores teores de lignina, os valores de conversão de celulose e de xilana alcançaram 85% e 64% no mesmo tempo de hidrólise, respectivamente. Os resultados mostraram que existe uma correlação inversa entre o teor de lignina e a conversão de polissacarídeos e que a remoção de 60% da lignina confere níveis elevados de hidrólise. Para reduzir a inibição pelos produtos de hidrólise da celulose, foi adicionada β -glicosidase ao meio reacional. Com a adição dessa enzima, os bagaços mais deslignificados alcançaram 100% de conversão de celulose e 82% de xilana, com 48 horas de hidrólise. No presente trabalho, o efeito da lignina não ligada aos polissacarídeos também foi avaliado. Para isso, lignina de bagaço de cana foi adicionada ao cartão de celulose, e este foi submetido à hidrólise enzimática. Não houve diferença entre os níveis de hidrólise na presença e ausência de lignina, indicando que a lignina limita a hidrólise dos polissacarídeos quando ligada a eles. Foi utilizada a técnica de microespectrofotometria ultravioleta para detectar a lignina e os ácidos hidroxicinâmicos em fibras, vasos e células de parênquima das regiões de córtex e de medula, deslignificados e controle. Os espectros UV dos três tipos celulares mostraram bandas em 278 nm, associada à lignina, e em 315 nm, associada aos ácidos hidroxicinâmicos. Os vasos foram os tipos celulares mais lignificados, seguidos pelas fibras e células parenquimatosas. O tratamento com clorito causou uma rápida remoção dos ácidos hidroxicinâmicos das células de parênquima, enquanto que as fibras foram deslignificadas apenas com 4 horas de tratamento. As amostras de córtex e de medula também foram submetidas à hidrólise com celulases. A região de medula não tratada foi prontamente hidrolizada, alcançando 63% de conversão de celulose com 72 horas, enquanto que o córtex não tratado atingiu apenas 20%. O tratamento com clorito de sódio não aumentou os níveis de hidrólise da medula. No entanto, a remoção de lignina do córtex aumentou consideravelmente a conversão.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Lignina. Hidrólise enzimática. Topoquímica. Ácidos hidroxicinâmicos.

ABSTRACT

SIQUEIRA, G.A. **Enzymatic hydrolysis of delignified sugarcane bagasse and topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in the cell wall.** 2011. 99 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

The sugarcane bagasse is a material rich in cellulose, which can be enzymatically converted into glucose by the action of cellulases. However, in the bagasse, it is associated to hemicellulose and lignin, components that limit its enzymatic digestibility. Lignin is the main limitant of the enzymatic hydrolysis of cellulose, reducing the accessibility of cellulases. Hemicellulose also limits the cellulase action and the presence of the hydroxycinnamic acids, as ferulic and coumaric, contribute to reduce the hydrolysis levels. In this work, the sugarcane bagasse was treated with acid sodium chlorite, aiming to selectively remove the lignin and produce models with lower contents of this component. The control bagasse had 22.8% of lignin and after a 4-hour delignification, materials with up to 6.8% of lignin were obtained, retaining the cellulosic and hemicellulosic fractions almost unchanged. The bagasses were submitted to the enzymatic hydrolysis with commercial cellulases. Only 26% of the cellulose of the control bagasse were converted into glucose and 11% of the xylan were converted into xylose, with 72 hours of hydrolysis. In the bagasses with lower lignin content, the cellulose and xylan conversion values reached 85% and 64% in the same time of hydrolysis, respectively. The results showed that there is an inverse correlation between the lignin content and the enzymatic conversion of polysaccharides and that the removal of 60% of the lignin results in high levels of hydrolysis. To reduce the inhibition by the products of the cellulose hydrolysis, β -glucosidase was added to the reaction medium. With this enzyme, the most delignified bagasses reached 100% of cellulose and 82% of xylan conversion, with 48 hours of hydrolysis. In this work, the effect of non-linked lignin was also analysed. For this, sugarcane bagasse lignin was added to cellulose card, and it was submitted to the enzymatic hydrolysis. There were no differences between the hydrolysis levels in the presence or absence of lignin, suggesting that lignin only limits hydrolysis when linked to the polysaccharides. The ultraviolet microspectrophotometry technique was used to detect lignin and hydroxycinnamic acids in fiber, vessels and parenchyma cells in rind and pith regions, delignified and control. The UV spectra of the three cell types showed bands in 278 nm, related to lignin, and 315 nm, related to the hydroxycinnamic acids. The vessels were the most lignified cell type, followed by fibers and parenchyma cells. The chlorite treatment caused a rapid removal of hydroxycinnamic acids from parenchyma cell walls, while fibers were delignified only with a 4-hour treatment. The rind and pith samples were also submitted to enzymatic hydrolysis. The untreated pith region was promptly hydrolysed, reaching 63% of cellulose conversion in 72 hours, while untreated rind reached only 20%. The sodium chlorite treatment did not enhance the pith hydrolysis levels. However, the lignin removal in rind samples substantially enhanced the conversion.

Keywords: Sugarcane bagasse. Lignin. Enzymatic hydrolysis. Topochemistry. Hydroxycinnamic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar evidenciando diferenças entre células de parênquima, fibras e vasos das regiões de córtex e medula.	22
Figura 2 - Micrografia evidenciando as camadas da parede celular e a lamela média. O espaço limitado pela parede celular é chamado de lúmen.	23
Figura 3 - Molécula de celulose composta por unidades estruturais de anidroglicose (RAMOS, 2003).	24
Figura 4 - Associação de cadeias celulósicas formando a microfibrila elementar (A) e a organização dessas fibrilas, formando as microfibrilas (B) (Adaptado de RAMOS, 2003).	24
Figura 5 - Representação de xilana de gramínea, evidenciando os monômeros e as suas ligações. (1) D-xilopirranose; (2) L-alfa-arabinose; (3) ácido 4-O-metilglucurônico e (4) grupo acetila (PITARELLO, 2007).	26
Figura 6 - Representação esquemática da esterificação do ácido ferúlico com a arabinose de uma molécula de xilana (Adaptado de WENDE; FRY, 1996).	26
Figura 7 - Estrutura hipotética representando as ligações presentes na molécula de lignina (CARVALHO et al., 2009).	28
Figura 8 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i> (MARTINS, 2005).	29
Figura 9 - CBH II de <i>T. reesei</i> , mostrando o túnel catalítico de 20 Å (DAVIES; HENRISSAT, 1995).	31
Figura 10 – Estrutura tridimensional do domínio catalítico de CBH I de <i>T. reesei</i> , evidenciando um celooligossacarídeo no túnel catalítico (IGARASHI et al., 2009).	32

Figura 11 - Domínio catalítico de endoglucanase II de <i>T. fusca</i> . Em vermelho, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise (DAVIES; HENRISSAT, 1995).	33
Figura 12 - Tipos de enzimas e locais de clivagem da hemicelulose (Adaptado de SHALLOM E SHOHAM, 2003).	34
Figura 13 - Limitantes da hidrólise enzimática da celulose: inibição pelo produto (1); adsorção improdutiva na celulose (2); diminuição da acessibilidade das enzimas pelas hemiceluloses (3) e pela lignina (4); adsorção improdutiva na lignina e inativação das enzimas (adaptado de JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007)	35
Figura 14 – Esquema representativo do sistema de lavagem do bagaço. Está evidenciada a coluna de PVC (A), o recipiente para reter água (B) e a bomba para recirculação (C).	43
Figura 15 - Representação do corte transversal de um entrenó de cana-de-açúcar, evidenciando as regiões divididas: medula (A); interface medula e córtex (B); córtex (C) e região externa, contendo casca e epiderme (D).	52
Figura 16 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) em função do teor de lignina, com 48 horas de hidrólise. Foram testados três teores de sólidos: (- ◆-) 2%, (- ■-) 5% e (- ▲-) 10%.	58
Figura 17 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) em função do percentual de lignina extraída, a média das conversões nas diferentes consistências, com 72 horas de hidrólise. 62	
Figura 18 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) dos bagaços de cana com 5% de consistência. (- ◆-) Bagaço não tratado; (- ■-)bagaço trata do por 1 hora; (- ▲-) bagaço tratado por 2 horas; (- x -) bagaço tratado por 3 horas; (-●-) bagaço tratado por 4 horas...63	
Figura 19 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) em função do tempo de hidrólise. (◆) Não tratado, (■) tratado por 15 minutos, (▲) tratado por 1 hora, (x) tratado por 2 horas, (*) tratado por 3 horas, (●) tratado por 4 horas.	65
Figura 20 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) em função da extração de lignina, na presença (-●-) e ausência (-◆-) de β-glicosidases, a 2% de consistência.....	66

Figura 21 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) na presença e ausência de lignina, variando a carga enzimática.....68

Figura 22 – Espectro ultravioleta de cada tipo celular da camada S2 de cana-de-açúcar não tratado, mostrando córtex (A) e medula (B). (■) Vasos, (●) fibras e (▲) células de parênquima.....72

Figura 23 – Micrografias digitalizadas através da varredura de cortes transversais de células de cana-de-açúcar, no comprimento de onda de 278 nm.....74

Figura 24 – Espectro de absorvância no ultravioleta de vasos, fibras e células de parênquima de córtex e medula, tratados com clorito de sódio em meio ácido. (●) Amostras não tratadas, (■) tratadas por 1 hora e (▲) tratadas por 2 horas com clorito de sódio.....75

Figura 25 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) nas amostras de medula tratadas com clorito de sódio em meio ácido. (- ◆ -) Amostra não tratada, (- ■ -) tratada por 1 hora e (- ▲ -) tratada por 2 horas78

Figura 26 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) nas amostras de córtex tratadas com clorito de sódio em meio ácido. (- ◆ -) Amostra não tratada, (- ● -) tratada por 1 hora, (- ▲ -) tratada por 2 horas e (- ■ -) tratada por 4 horas.....79

Figura 27 – Correlação entre a conversão de celulose com as absorvâncias a (A) 315 nm e (B) 280 nm e com (C) o teor de lignina, após 48 horas de hidrólise das amostras de córtex. (▲) Vasos, (■) fibras e (◆) células de parênquima.80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas do complexo celulolítico e o seu modo de ação (Adaptado de BHAT; BHAT, 1997).	30
Tabela 2 - Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar tratados com clorito de sódio em meio ácido por diferentes tempos.....	55
Tabela 3 - Atividades das enzimas hidrolíticas e teor de proteínas das enzimas comerciais.	57
Tabela 4 - Conversão de celulose e xilana dos bagaços de cana tratados com clorito de sódio, hidrolisados por 48 horas com celulasas.....	60
Tabela 5 - Composição química das amostras de medula e córtex de cana-de-açúcar pré-tratadas com clorito de sódio.	70

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1.	Cana-de-açúcar	21
2.2.	Parede celular	23
2.2.1.	Celulose	23
2.2.2.	Hemiceluloses	25
2.2.3.	Lignina	27
2.3.	Hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses	28
2.3.1.	Celulases	28
2.3.2.	Hemicelulases	34
2.4.	Fatores que limitam a hidrólise da celulose	35
2.4.1.	A lignina como limitante da hidrólise	37
2.4.2.	Redução dos níveis de hidrólise pelas hemiceluloses	38
2.5.	Distribuição topoquímica da lignina	39
2.6.	Remoção seletiva da lignina	40
3.	OBJETIVOS	42
3.1.	Metas	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1.	Bagaço de cana-de-açúcar	43
4.2.	Determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar	44
4.3.	Preparo dos substratos modelo com teores reduzidos de lignina	44
4.4.	Determinação de açúcares totais	45
4.5.	Determinação do teor de proteínas	45
4.6.	Determinação das atividades enzimáticas	46
4.6.1.	Preparo das curvas de calibração	46
4.6.2.	β -glicosidase	47
4.6.3.	Endoglucanase	47

4.6.4.	Celulases totais	48
4.6.5.	β -D-xilanase.....	48
4.6.6.	β -xilosidase	49
4.7.	Sacarificação enzimática do bagaço de cana	50
4.7.1.	Preparações enzimáticas comerciais	50
4.7.2.	Condição de hidrólise enzimática dos bagaços.....	50
4.7.3.	Hidrólise com celulases e β -glicosidase	51
4.8.	Efeito da adição de lignina na hidrólise de cartão de celulose	51
4.9.	Ensaio com entrenós de cana-de-açúcar.....	52
4.9.1.	Preparação de bagaço deslignificado para hidrólise enzimática.....	52
4.9.2.	Análises microespectrofotométricas ultravioleta.....	53
4.9.3.	Hidrólise enzimática das amostras.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	Tratamento do bagaço com clorito de sódio em meio ácido	55
5.2.	Caracterização das enzimas comerciais	56
5.3.	Hidrólise enzimática dos bagaços deslignificados com clorito de sódio	58
5.4.	Hidrólise dos bagaços suplementada com β -glicosidase	64
5.5.	Efeito da adição de lignina na hidrólise de polissacarídeos.....	67
5.6.	Ensaio com as amostras de cana-de-açúcar.....	70
5.6.1.	Composição química das frações.....	70
5.6.2.	Anatomia celular e distribuição topoquímica dos componentes aromáticos	71
5.6.3.	Hidrólise enzimática das amostras de córtex e medula	76
6.	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE	97

1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um material co-produzido na indústria sucroalcooleira que tem despertado grande interesse comercial e científico, devido à potencial aplicação dos produtos gerados a partir dele. Como os demais lignocelulósicos, é constituído basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que se distribuem nas diferentes camadas da parede celular.

Grande atenção tem sido dirigida à celulose. Aplicações desse polissacarídeo vão desde a produção de etanol, a partir da liberação de seus monômeros, à produção de membranas, compósitos e plásticos. No entanto, nos substratos lignocelulósicos, a presença de hemicelulose e lignina dificulta o uso da celulose para esses fins. Considerando a produção de glicose a partir de celulose, esses dois componentes conferem recalcitrância ao material, limitando o acesso das enzimas hidrolíticas à molécula de celulose.

Muito tem sido estudado sobre o efeito da lignina na hidrólise dos materiais lignocelulósicos. A análise da composição, do teor e da distribuição desse componente tem sido o objetivo de diversos projetos de pesquisa, visando reduzir seu efeito negativo na conversão de polissacarídeos. Com o objetivo de melhorar a conversão, muitos estudos envolvendo engenharia genética estão em desenvolvimento, não só para produção de variedades com menor teor de lignina, mas também com variações estruturais desse componente. Exemplo disso é o estudo do pré-tratamento e sacarificação enzimática realizado com seis linhagens transgênicas de alfafa, reguladas negativamente para a expressão de genes da via de biossíntese de lignina, que mostraram resultados mais eficientes em linhagens com menor teor de lignina (CHEN; DIXON, 2007). Outro estudo, com híbridos de álamo contrastantes quanto ao teor de lignina e a proporção entre os precursores dessa molécula, mostrou que as duas variáveis influenciaram na conversão de hemicelulose (DAVISON et al., 2006). Outro trabalho interessante, conduzido por Keith e colaboradores (1979), mostra que mutantes de milho com teor reduzido de lignina são degradados mais facilmente por microrganismos do rúmen de bovinos que as linhagens selvagens. Esses resultados mostram que existe uma relação entre o teor e a composição da lignina na biomassa e que é importante compreender a sua influência na hidrólise enzimática.

Vários grupos de pesquisa estão envolvidos em projetos multidisciplinares visando a seleção de variedades de cana-de-açúcar com a finalidade de encontrar clones com reduzido teor de lignina ou visando a regulação negativa da biossíntese de lignina em

plantas transgênicas (BARBOSA et al., 2004, SELMAN-HOUSSEIN et al., 2000). Em todos os casos, a idéia é eliminar a necessidade de tecnologias severas de pré-tratamentos.

Uma questão que surge é o quanto de lignina deve ser removido para melhorar a digestibilidade do substrato. Neste contexto, neste trabalho foram produzidos modelos com diferentes teores de lignina, preparados quimicamente a partir de uma variedade comercial de cana-de-açúcar, para demonstrar os padrões de hidrólise de celulose nesses substratos. A metodologia usada para reduzir seletivamente o teor de lignina foi o tratamento com clorito de sódio em meio ácido. Amostras da região de entrenó da cana-de-açúcar e também amostras de bagaço foram deslignificadas em diferentes graus para avaliar a influência da presença da lignina na hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta perene que apresenta metabolismo C4, características que a torna uma das mais produtivas plantas cultivadas. Cerca de oito milhões de hectares são destinados ao plantio de cana-de-açúcar no Brasil, distribuídos em praticamente todas as regiões do país, e a produtividade é estimada em torno de 78.000 kg/ha. Estima-se que na safra 2010/2011 sejam moídas mais de 624 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, das quais 46% serão destinadas à produção de açúcar e 54% à produção de etanol (CONAB, 2011).

Considerando que cada tonelada de cana-de-açúcar moída gere aproximadamente 280 kg de bagaço (CERQUEIRA; RODRIGUES FILHO; MEIRELES, 2007), são estimadas 175 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar para a safra atual. A maior parte desse bagaço é queimada na própria indústria sucroalcooleira para geração de energia elétrica, garantindo sua autossuficiência energética (PANDEY et al., 2000). No entanto, um grande excedente ainda é produzido (CERQUEIRA; RODRIGUES FILHO; MEIRELES, 2007) e este pode ser usado como matéria-prima para diversos produtos, como os baseados na fermentação, polpa e papel e derivados de celulose (CERQUEIRA; RODRIGUES FILHO; MEIRELES, 2007; PANDEY et al., 2000).

Aproximadamente 50% do bagaço de cana-de-açúcar é celulose. A outra metade é dividida em hemicelulose e lignina, em proporções semelhantes, podendo conter aproximadamente 2,5% de cinzas (PANDEY et al., 2000). Os três principais componentes possuem potencial aplicação industrial e tem sido alvo de diversos estudos. A celulose pode ser utilizada na produção de bioetanol, compósitos, membranas e filmes óticos (EDGAR et al, 2001). A hemicelulose, além de poder ser utilizada na produção de bioetanol (VLEET; JEFFRIES, 2009), pode ser convertida em xilitol (CARVALHO, et al., 2002) e xilooligossacarídeos (VÁZQUEZ et al., 2000). A lignina pode ser utilizada na fabricação de esponjas de poliuretano, resinas e biodispersantes (LORA; GLASSER, 2002).

A cana-de-açúcar possui grande heterogeneidade morfológica. É constituída por feixes de fibras e outros elementos estruturais como vasos, parênquima e células epiteliais.

A parte mais interna, chamada de medula (Figura 1), contém principalmente vasos, células epiteliais e células de parênquima. O córtex é a parte mais externa (Figura 1), possui poucas células de parênquima e contém principalmente feixes vasculares. Estes são formados por vasos circundados por fibras. Os vasos e as células de parênquima apresentam parede fina e lúmen largo, enquanto que as fibras possuem parede celular espessa e lúmen estreito (MOORE, 1987; SANJUÁN, 2001).

Figura 1 - Corte transversal de entrenó de cana-de-açúcar evidenciando diferenças entre células de parênquima, fibras e vasos das regiões de córtex e medula.

2.2. Parede celular

A parede celular é composta por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais que se distribuem nas diferentes camadas da parede celular (Figura 2). A primeira camada formada é a parede primária, da qual 90% são carboidratos. Internamente à parede primária, cessado o crescimento celular, se forma a parede secundária, subdividida em camadas S1, S2 e S3, sendo que esta última pode estar ausente. Nas células com parede secundária, as duas paredes vizinhas aparecem ligadas pela lamela média, composta principalmente por lignina. O principal componente da parede secundária é a celulose, seguida pela hemicelulose.

Figura 2 - Micrografia evidenciando as camadas da parede celular e a lamela média. O espaço limitado pela parede celular é chamado de lúmen.

2.2.1. Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante no planeta, sendo o principal componente da parede celular de plantas. Constantemente reposta através da fotossíntese, sua biossíntese está em torno de 10^{11} toneladas anuais (SUN et al., 2004). Sua estrutura envolve ligações β -1,4-glicosídicas entre unidades repetitivas de anidroglicose (Figura 3). A ligação equatorial entre as suas unidades monoméricas faz com que a molécula de celulose se apresente em uma conformação linear (MATTHEWS et al., 2006). As cadeias

da celulose podem fazer interações inter e intramoleculares, explicadas pela presença de grupos hidroxila com diferentes polaridades. Cada molécula de anidroglicose apresenta hidroxilas secundárias no segundo e terceiro carbonos e uma hidroxila primária no sexto carbono. A presença dessas hidroxilas equatoriais permite a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias dispostas lateralmente, ao passo que os hidrogênios axiais fazem com que as partes superiores e inferiores das moléculas de celulose sejam hidrofóbicas, permitindo interações de Van der Waals (KADLA; GILBERT, 2000; LYND et al., 2002).

Figura 3 - Molécula de celulose composta por unidades estruturais de anidroglicose (RAMOS, 2003).

A associação das cadeias de celulose ocorre durante a sua biossíntese. Aproximadamente 30 moléculas de celulose interagem entre si, formando um arranjo conhecido como fibrila elementar (Figura 4). O agrupamento de fibrilas elementares forma uma estrutura supramolecular chamada de microfibrila. Um terceiro nível organizacional envolve a associação de microfibrilas na chamada fibra de celulose (DING; HIMMEL, 2006; LYND et al., 2002).

Figura 4 - Associação de cadeias celulósicas formando a microfibrila elementar (A) e a organização dessas fibrilas, formando as microfibrilas (B) (Adaptado de RAMOS, 2003).

A interação entre as moléculas de celulose forma regiões cristalinas, com arranjo paralelo e organizado. Esse arranjo confere rigidez e hidrofobicidade às fibras de celulose, além de dificultar a penetração de moléculas, mesmo pequenas, como a água. Regiões cristalinas alternam com regiões amorfas, nas quais a organização e rigidez não são elevadas como nas regiões cristalinas. Essas regiões amorfas são importantes, uma vez que conferem elasticidade e flexibilidade à parede celular, necessárias durante o crescimento (LYND et al., 2002; MATTHEWS et al., 2006).

O número de resíduos de glicose unidos na cadeia de celulose representa o grau de polimerização dessa molécula. Na natureza, são encontradas desde moléculas de celulose com grau de polimerização baixo (menores que 100 resíduos de glicose) a moléculas com elevado grau de polimerização, com até 15.000 resíduos de glicose unidos (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2.2. Hemiceluloses

Hemiceluloses são constituídas de monômeros de pentoses, como D-xilose e L-arabinose, e de hexoses, como D-manose, D-galactose e D-xilose, ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetilas. A cadeia principal das hemiceluloses de folhosas e gramíneas é a xilana, enquanto que a glucomanana prevalece em coníferas (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003). Dos componentes do material lignocelulósico, é o mais sensível a tratamentos químicos e térmicos. A degradação tem início nas ramificações, seguida pela remoção da cadeia principal (LEVAN; ROSS; WINANDY, 1990).

Na cana-de-açúcar, um tipo de gramínea, a hemicelulose predominante é a glucuronoarabinoxilana (Figura 5). A cadeia de xilana (ligações β -1-4-glicosídicas entre resíduos de D-xiloses) faz ligações com L-arabinoses no oxigênio do carbono 3 da xilose e com ácido glucurônico ou metil glucurônico no oxigênio do carbono 2, formando as ramificações do heteropolímero. Além desses substituintes, grupos acetila e ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e cumárico) também são encontrados (WENDE; FRY, 1996).

Figura 5 - Representação de xilana de gramínea, evidenciando os monômeros e as suas ligações. (1) D-xilopiranosose; (2) L-alfa-arabinose; (3) ácido 4-O-metilglucurônico e (4) grupo acetila (PITARELLO, 2007).

Os ferulatos são responsáveis pela ligação entre carboidratos e lignina, elo que garante a organização e integridade estrutural da parede celular. A ligação é do tipo éster entre o carbono 5 da L-arabinose e o carbono carbonílico do ácido ferúlico (Figura 6) (HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999).

Figura 6 - Representação esquemática da esterificação do ácido ferúlico com a arabinose de uma molécula de xilana (Adaptado de WENDE; FRY, 1996).

2.2.3. Lignina

A lignina é uma das mais abundantes biomoléculas presentes na parede celular dos vegetais superiores. De natureza hidrofóbica, não polissacarídica, interage com a celulose e hemicelulose, conferindo rigidez à parede celular. É o mais complexo dos constituintes do material lignocelulósico, formado por componentes fenólicos e alifáticos (HENRIKSSON, 2009). É formada pela polimerização desidrogenativa de alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico (LEWIS; YAMAMOTO, 1990; SUN et al., 2003)

São três os principais grupos de lignina, divisão baseada na proporção entre as unidades de fenilpropano: ligninas de coníferas, ou ligninas G (guaiacil), que contêm principal ou quase exclusivamente derivados de álcool coniferílico; ligninas de folhosas, ou ligninas GS (guaiacil-siringil), da qual as unidades estruturais derivam dos alcoóis coniferílico e sinapílico; e ligninas de gramíneas, ou ligninas HGS (hidroxifenil-guaiacil-siringil), que contêm os três precursores em sua estrutura (BURANOV; MAZZA, 2008; HENRIKSSON, 2009).

A ligação mais comum entre as unidades estruturais da lignina é do tipo β -O-4, uma ligação éter entre o carbono β da cadeia alquílica e o quarto carbono do anel fenólico. Essa ligação também é a mais suscetível a ataques químicos. Outras ligações comuns são do tipo β -5, β - β , 5-5, e β -1, ligações carbono-carbono, além de α -O-4 e 5-O-4, também ligações éter (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). A Figura 7 representa uma estrutura hipotética de lignina, mostrando os tipos de ligações possíveis entre as suas unidades estruturais.

Figura 7 - Estrutura hipotética representando as ligações presentes na molécula de lignina (CARVALHO et al., 2009).

2.3. Hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses

2.3.1. Celulases

Uma eficiente hidrólise da celulose requer uma ação sinérgica de enzimas, divididas em três grupos principais: exo-1,4-β-D-glucanases, ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que movem progressivamente na cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose; endo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente no interior da cadeia e 1,4-β-D-glicosidases, ou celobiasas, (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose em

glicose, além de clivarem celuoligossacarídeos. Os três grupos catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 glicosídicas, conforme mostrado na Tabela 1, e atuam sinergicamente, criando novos sítios para hidrólise e reduzindo a inibição pelo produto (Figura 8) (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2009; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). O produto da ação da CBH, celobiose, inibe a ação da endoglucanase e da própria CBH, de forma que a presença da celobiase diminui essa inibição pelo produto (LYND et al., 2002). As CBHs e as endoglucanases também são inibidas por xilobiose e xilo-oligômeros (BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

Quando o complexo celulolítico atua no material lignocelulósico, três processos acontecem simultaneamente: mudanças físicas e químicas da fração insolúvel; uma hidrólise primária, na qual produtos solúveis com menor grau de polimerização são liberados; e uma hidrólise secundária, correspondente à ação das enzimas celulolíticas nos produtos de hidrólise solúveis, resultando em pequenos oligômeros e glicose (ZHANG; LYND, 2004).

Figura 8 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (MARTINS, 2005).

Tabela 1 - Enzimas do complexo celulolítico e o seu modo de ação (Adaptado de BHAT; BHAT, 1997).

Enzima	Código EC	Sinônimo	Modo de ação
Endo-(1-4)-β-D-glucanase	EC 3.2.1.4	Endoglucanase	<p>Cliva aleatoriamente na cadeia de celulose</p>
Exo-(1-4)-β-D-glucanase	EC 3.2.1.91	Celobiohidrolase ou exoglucanase	<p>Libera celobiose de extremidades redutoras e não redutoras</p>
B-glicosidase	EC 3.2.1.71	Celobiase	<p>Libera glicose a partir de celobiose e de pequenos oligossacarídeos</p>

Como a celulose é um polímero insolúvel em meio aquoso, as enzimas do complexo celulolítico necessitam de um sítio especial para sua adsorção na molécula, permitindo a ação do domínio catalítico. Esse domínio, chamado de domínio de ligação à celulose (CBD) está presente tanto nas exoglucanases quanto nas endoglucanases (ZHANG; LYND, 2004).

As exoglucanases, ou celobiohidrolases (CBH), são específicas para ligações β-1-4 nas extremidades da cadeia de celulose. São encontradas pelo menos duas exoglucanases em *T. reesei*, CBH I e CBH II, representando 60 e 20% das celulasas respectivamente, e diferenciam entre si principalmente pelo mecanismo de ação. As CBH I atuam preferencialmente na extremidade redutoras da cadeia, ao passo que a CBH II hidrolisa a extremidade não redutora (LYND et al., 2002). O sítio ativo da CBH I é um túnel de 40 Å, contendo sete sítios de ligação a açúcares (DIVNE et al., 1994), enquanto que nas CBH II, o sítio ativo é um túnel de 20 Å (Figura 9), mantido por duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína (ROUVINEN et al., 1990). A importância desse túnel está na clivagem

processiva da cadeia de celulose, permitindo que a enzima deslize pela molécula a uma velocidade de $3,5 \text{ nm s}^{-1}$ (IGARASHI et al., 2009).

Figura 9 - CBH II de *T. reesei*, mostrando o túnel catalítico de 20 Å (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

O domínio catalítico das CBHs (Figura 10) está separado do CBD por uma sequência de aminoácidos altamente glicosilada. O CBD de CBH I e CBH II de *T. reesei* é formado pelo arranjo espacial de uma sequência de 20 a 30 aminoácidos. A remoção desse domínio, responsável pela adsorção da enzima, não afeta a eficiência da hidrólise de substratos solúveis. No entanto, a ação da CBH em moléculas de celulose insolúvel é reduzida consideravelmente se esse domínio está ausente (BHAT; HAZLEWOOD, 2001). A adsorção da CBH depende da presença de três resíduos de tirosina e um de glutamina no CBD e a interação ocorre com partes hidrofóbicas da celulose cristalina (IGARASHI et al., 2009; LINDER et al. 1995).

Figura 10 – Estrutura tridimensional do domínio catalítico de CBH I de *T. reesei*, evidenciando um celooligossacarídeo no túnel catalítico (IGARASHI et al., 2009).

As endoglucanases atuam no interior da cadeia de celulose amorfa, gerando novas extremidades susceptíveis à ação das CBH. Como as endoglucanases tem a possibilidade de atuar em mais regiões da cadeia de celulose, a concentração de endoglucanases adsorvidas no substrato é maior que a de CBH (LEVINE et al., 2010), e a redução do grau de polimerização da celulose ocorre principalmente por esse grupo de enzimas. São encontradas cinco endoglucanases em *T. reesei* e estas representam cerca de 20% das celulasas totais desse fungo (LYND et al., 2002). Estima-se que a grande variedade de endoglucanases secretadas pelos microrganismos seja para promover a hidrólise mais eficiente de substratos complexos (BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

O domínio catalítico das endoglucanases (Figura 11) não apresenta a estrutura de túnel, como as CBHs, e sim uma fenda. Essa característica faz com que o sítio ativo das endoglucanases seja mais hidrofílico, quando comparado ao sítio ativo das CBHs (HENRIKSSON et al., 1996).

Como as CBHs, as endoglucanases também apresentam um CBD, e a eficiência da hidrólise está diretamente relacionada com o potencial de adsorção da enzima (KLYOSOV, 1990).

Figura 11 - Domínio catalítico de endoglucanase II de *T. fusca*. Em vermelho, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico é o das β -glicosidases, ou celobiasas, que são responsáveis pela hidrólise de celobiose ou pequenos celuoligossacarídeos, liberando glicose (BHAT; HAZLEWOOD, 2001). A ação das celobiasas é de extrema importância para a hidrólise eficaz do material lignocelulósico, já que elas são responsáveis pelo consumo dos oligossacarídeos solúveis, que inibem a ação das CBHs e das endoglucanases (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Diferentemente dos dois grupos anteriores, as celobiasas não possuem CBD (SIPOS et al., 2010).

2.3.2. Hemicelulases

O sistema hidrolítico das hemiceluloses é mais complexo, devido à maior heterogeneidade desse polissacarídeo. É composto por endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações internas na cadeia de xilana; 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que atacam os xilooligossacarídeos no terminal não redutor e liberam xilose; endo-1,4- β -D-mananases (EC 3.2.1.78), que clivam ligações internas da manana e 1,4- β -D-manosidases (EC 3.2.1.25), que clivam os mananoligossacarídeos em manose. Os grupos laterais são removidos por outras enzimas acessórias: α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), que liberam os monômeros de galactose; α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que hidrolisam as ligações entre a arabinose e a cadeia principal; α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), que liberam unidades de ácido glucurônico; acetil-xilana esterases (EC 3.1.1.72), que clivam a ligação éster com o ácido acético e feruloil e p-cumaril esterases (3.1.1.73), que atuam na hidrólise das ligações com os ácidos ferúlicos e cumáricos, respectivamente (BEG, et al., 2001; SHALLOM; SHOHAM, 2003; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A Figura 12 representa algumas das enzimas responsáveis pela hidrólise das hemiceluloses e seu sítio de ação.

Figura 12 - Tipos de enzimas e locais de clivagem da hemicelulose (Adaptado de SHALLOM E SHOHAM, 2003).

2.4. Fatores que limitam a hidrólise da celulose

A conversão da celulose em seus monômeros possui algumas limitações, que podem ser relativas às características estruturais do substrato e ao mecanismo de ação das enzimas hidrolíticas (Figura 13). As características estruturais podem ser químicas, quando relacionadas à composição do material lignocelulósico, ou físicas, se relacionadas ao grau de polimerização, à cristalinidade, à área superficial e volume de poro, ao tamanho de partícula e à distribuição da lignina e da hemicelulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; ZHU et al., 2008).

Figura 13 - Limitantes da hidrólise enzimática da celulose: inibição pelo produto (1); adsorção improdutiva na celulose (2); diminuição da acessibilidade das enzimas pelas hemiceluloses (3) e pela lignina (4); adsorção improdutiva na lignina e inativação das enzimas (adaptado de JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007)

A cristalinidade da celulose pode ser um fator importante para a sua conversão. Como a região cristalina da celulose é mais compacta, o acesso das endoglucanases é dificultado nessas regiões, de forma que a hidrólise ocorre principalmente pela ação das

celobiohidrolases. Nas regiões amorfas, o acesso das endoglucanases é menos restrito e a hidrólise é mais eficaz (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

O volume de poros e a região acessível às enzimas hidrolíticas influenciam a hidrólise do material lignocelulósico. Para que o complexo celulolítico atue no material lignocelulósico, é necessário que as enzimas tenham acesso às ligações glicosídicas, o que depende do volume de poros acessíveis às celulasas (GRETHLEIN, 1985). Stone et al. (1969) mostraram que a digestibilidade de diversos materiais lignocelulósicos, utilizando celulasas de *T. viride*, é diretamente proporcional à acessibilidade de moléculas de 30-40 Å, sugerindo que o diâmetro das celulasas esteja nessa faixa. Grethlein (1985), em um trabalho semelhante, relacionou a conversão enzimática de celulose com o tamanho de poros e observou proporcionalidade para as sondas com 51 Å, evidenciando que as celulasas de *T. reesei* tem diâmetro aproximado de 50 Å.

Como a hidrólise do material lignocelulósico ocorre em fase heterogênea, a adsorção das enzimas hidrolíticas no material é um pré-requisito para que ocorra a reação. Dessa forma, quanto maior for a relação superfície/volume do material, maior será a quantidade de sítios de adsorção por massa de substrato, e consequentemente, maiores valores de conversão de polissacarídeos (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; YEH; HUANG; CHEN, 2010).

A adsorção de proteínas nos materiais lignocelulósicos é medida baseado na diferença na concentração de proteínas livres adicionadas na fração líquida e depois do tempo determinado para adsorção (PALONEN et al., 2004; YANG; WYMAN, 2006). Frequentemente, a adsorção de celulasas nos materiais lignocelulósicos é modelada satisfatoriamente pela isoterma de Langmuir, um modelo simples que pode ser utilizado para comparar propriedades cinéticas de vários sistemas celulase-celulose (ZHANG; LYND, 2004).

Klyosov et al. (1981) relacionaram o potencial hidrolítico de complexos celulolíticos de 12 fontes microbianas com a quantidade de enzima adsorvida em celulose microcristalina e observaram que a conversão variou de aproximadamente 10 a 100%, de forma que as mais eficientes adsorviam melhor no material. Sipos et al. (2010) avaliaram a adsorção de celulasas de *T. reesei* em abeto (*Abies sp.*) tratado por explosão a vapor na presença e ausência de polietilenoglicol (PEG). Com PEG, foi observado um decréscimo na concentração de proteínas livres nas primeiras horas de hidrólise, seguido por um leve aumento. Nos materiais hidrolisados sem PEG, a concentração de proteínas no hidrolisado caiu também nas primeiras horas, atingindo valores menores que com PEG, mas não foi

observado o aumento anterior. Isso pode ser explicado pela ação do PEG, que diminui a adsorção improdutiva na lignina, de forma que à medida que a celulose é hidrolisada, as enzimas celulolíticas são liberadas (SIPOS et al., 2010).

2.4.1. A lignina como limitante da hidrólise

Como no material lignocelulósico a lignina é responsável por manter a rigidez da parede celular e proteger do ataque de microrganismos (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), fica claro que a sua associação com as cadeias celulósicas dificulta o acesso das enzimas hidrolíticas ao material, agindo como uma barreira para essas moléculas (MOONEY et al., 1998).

Considerando a recalcitrância que a lignina confere ao material lignocelulósico, vários trabalhos tem buscado tratamentos que visem remover grande quantidade desse componente, atingindo, dessa forma, maiores valores de conversão de polissacarídeos (HIMMEL et al., 1997; MOSIER, 2005).

O principal efeito da lignina como limitante da sacarificação enzimática da celulose está relacionado à diminuição da acessibilidade das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas. Isso tem sido confirmado por muitos trabalhos, nos quais a remoção da lignina aumentou consideravelmente os níveis de hidrólise do material. A remoção da lignina gera poros no material, aumentando a área acessível as enzimas hidrolíticas (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; LEE et al., 2009; MOONEY et al., 1998; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). Outra confirmação desse efeito é que a realocização da lignina na parede celular, causada por alguns pré-tratamentos, garante também maiores valores de conversão, sem alterar, contudo, a quantidade de lignina no material (DONOHOE et al. 2008).

No entanto, muitos trabalhos mostram que a lignina é capaz de limitar a hidrólise enzimática de outra forma. As enzimas hidrolíticas podem adsorver na lignina, principalmente através de interações hidrofóbicas, reduzido a quantidade de enzimas disponível para atuar na fibra celulósica. Esse fenômeno é conhecido como adsorção improdutiva, e tem sido considerado um fator limitante importante da hidrólise dos materiais lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005; PALONEN, et al., 2004). A adsorção improdutiva pode ser reduzida pela adição de surfactantes (ERIKSSON; BÖRJESSON;

TJERNELD, 2002), polímeros (BÖRJESSON; PETERSON; TJERNELD, 2007) ou outras proteínas (YANG; WYMAN, 2006), que adsorvem na lignina, permitindo que as celulasas adsorvam na molécula de celulose. Além disso, durante a hidrólise, componentes de baixa massa molar da lignina são solubilizados na fase aquosa e esses compostos exercem também influência negativa nos níveis de hidrólise enzimática da celulose (BERLIN et al., 2006).

A composição da lignina também é um importante fator limitante da hidrólise dos polissacarídeos da parede celular. Modificações na composição da lignina (relação S/G, por exemplo) podem alterar os níveis de conversão, mesmo mantendo o mesmo teor (CHEN; DIXON, 2007; DAVISON et al., 2005; GRABBER et al., 2004).

2.4.2. Redução dos níveis de hidrólise pelas hemiceluloses

As hemiceluloses, assim como a lignina, diminuem a acessibilidade das celulasas às fibras de celulose, uma vez que estão fisicamente associadas a esse polímero e formam uma matriz amorfa ao redor dele (HIMMEL et al., 2007; MUSSATO et al., 2008).

Como o principal componente das hemiceluloses da cana-de-açúcar é a xilana, as enzimas hidrolíticas agem nessa molécula e liberam não apenas xilose, sua unidade estrutural. Oligômeros com variados graus de polimerização também são liberados. Esses oligômeros são capazes de inibir a atividade das celulasas, e quanto maior o grau de polimerização, maior o efeito inibitório (QING; YANG; WYMAN, 2010). Os monossacarídeos liberados pela hidrólise, como manose e galactose, também conferem efeito inibitório às enzimas do complexo celulolítico (XIAO et al., 2004)

Os ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e *p*-cumárico), que fazem a conexão entre hemicelulose e lignina, também são responsáveis por limitar a hidrólise enzimática da biomassa (GRABBER, 2005). Esses ácidos são esterificados na arabinose da hemicelulose e eterificados na molécula de lignina. Estima-se que os ácidos fenólicos constituam um sítio de iniciação da biossíntese da lignina, uma vez que em plantas jovens, observa-se mais a presença de ligações do tipo éster e, à medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de ligações éter aumenta (DESCHAMPS; RAMOS, 2002). A remoção desses compostos ou até mesmo a seleção de plantas com teores menores desses ácidos

torna mais fácil a ação das enzimas do complexo celulolítico (GRABBER; RALPH; HATFIELD; 1998; CASLER; JUNG, 1999). Os ácidos hidroxicinâmicos também podem estar presentes na parede celular na forma de dímeros (RALPH; GRABBER; HATFIELD, 1995; HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999) e dessa forma podem limitar ainda mais a sacarificação dos polissacarídeos (GRABBER; HATFIELD; RALPH, 1998).

2.5. Distribuição topoquímica da lignina

Os níveis de hidrólise dos materiais lignocelulósicos não variam apenas entre diferentes materiais lignocelulósicos. Em uma mesma planta, diferentes tipos celulares respondem diferentemente à ação das enzimas hidrolíticas. No tecido vascular, por exemplo, que garante suporte à planta e é altamente recalcitrante, a conversão de polissacarídeos é baixa, principalmente quando comparada a células de parênquima de medula, que são menos lignificadas (AKIN, 1989; JUNG; CASLER, 2006). As proporções das subunidades estruturais siringil, guaiacil e *p*-hidroxifenil também variam nas paredes celulares de fibras, vasos e parênquima (HE; TERASHIMA, 1990; HE; TERASHIMA, 1991). A lamela média, apesar de ser a região mais lignificada, não é a principal influência negativa na hidrólise da parede, já que a ação das enzimas ocorre do lúmen para a parede primária. No entanto, a remoção de lignina da lamela média pode aumentar consideravelmente a hidrólise, como foi observado por Hallac et al. (2010), que obtiveram aumento de conversão de celulose de 68 para 96% removendo a lignina dessa fração. Esse resultado mostra que a remoção da lignina da lamela permite que as enzimas hidrolíticas atuem diretamente na parede primária.

As diferenças estruturais de regiões de medula e córtex sugerem que estas podem necessitar de condições diferentes para a sua hidrólise. Uma vez que a medula é constituída principalmente por células de parênquima, armazenadoras de sacarose, são esperados maiores valores de conversão de polissacarídeos da parede celular. Já no córtex, rico em feixes vasculares mais lignificados, a hidrólise é dificultada, uma vez que esse material é estruturalmente mais recalcitrante (MOORE, 1987).

Diversas técnicas tem sido desenvolvidas para avaliar a distribuição da lignina em diferentes tipos celulares. A lignina pode ser detectada na parede celular através da bromação das suas estruturas fenólicas, seguida pela análise dispersiva de raio-X (EDX)

(FROMM et al., 2003). O permanganato de potássio também pode ser utilizado, uma vez que seu potencial de redução permite a oxidação das unidades fenólicas da lignina. Sua forma reduzida, dióxido de manganês, precipita e pode ser detectada por microscopia eletrônica, indicando a presença da lignina na parede celular (DONALDSON, 1994; FROMM et al., 2003). A coloração de lignina com floroglucinol, uma técnica imunocitoquímica, também pode ser aplicada para detecção desse componente na parede (LIGRONE et al., 2008; MÖLLER et al., 2005).

A distribuição topoquímica da lignina e dos compostos aromáticos nos materiais lignocelulósicos tem sido analisada com sucesso pela técnica de microespectrofotometria no ultravioleta (KOCH; KLEIST, 2001; KOCH, 2004; KIM et al., 2008; REHBEIN, 2010). Essa técnica se baseia na retenção da luz incidida sobre cortes do material em comprimentos de onda definidos e depende da absorvidade da molécula de lignina em comprimentos de onda determinados. A absorção da luz está principalmente relacionada com a presença de duplas ligações e grupos carbonila (FROMM et al., 2003). Conhecendo o comprimento de onda de absorção da molécula alvo, que no caso da lignina é 278-282 nm, é possível analisar a distribuição desse componente na parede celular e em diferentes células. Também é possível avaliar a distribuição de ácidos hidroxicinâmicos no material, uma vez que estes absorvem a luz de comprimento de onda entre 315 e 320 nm (KOCH; KLEIST, 2001; LYBEER; KOCH, 2005).

2.6. Remoção seletiva da lignina

Como dito anteriormente, a lignina e as hemiceluloses conferem recalcitrância à parede celular vegetal. Muitos tratamentos químicos se baseiam na remoção desses componentes, visando aumentar os níveis de hidrólise da celulose. Dentre eles, podem ser citados tratamentos com hidróxido de sódio, dióxido de enxofre, amônia, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio alcalino e ácido sulfúrico (RAMOS, 2003).

Alguns tratamentos removem de forma eficaz a lignina, mantendo quase inalterada a proporção celulose/hemicelulose. Perez e Curvelo (2010) mostraram que utilizando acetona-água (1:1) a lignina foi removida quase que seletivamente nos estágios iniciais de tratamento. Outra técnica que tem despertado a atenção é a aplicação de líquidos iônicos para dissolver lignina. Os líquidos iônicos são sais orgânicos que tem ponto de fusão

inferior a 100°C (FU; MAZZA; TAMAKI, 2010) e são capazes de dissolver todos os componentes do material lignocelulósico (KILPELÄINEN et al., 2007). Alguns líquidos iônicos solubilizam exclusivamente lignina e mantem inalterados os polissacarídeos da parede celular. Essa solubilização seletiva da lignina depende da porção aniônica do sal e gera um material mais acessível às enzimas celulolíticas (LEE et al., 2009; PU, 2007).

A remoção da lignina também pode ser feita por métodos oxidativos, como é o caso do tratamento com clorito de sódio na presença de ácido acético diluído. Esse tratamento é utilizado para obtenção de holocelulose e alcança bons resultados de remoção seletiva de lignina quando até 60% desse componente é removido. A partir desse valor, os carboidratos da parede celular começam a ser degradados (AHLGREN; GORING, 1971). O grau de polimerização da celulose após o tratamento é reduzido, provavelmente devido à hidrólise ácida ou clivagem oxidativa da cadeia celulósica (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010). O tratamento com clorito pode remover arabinose e degradar unidades de ácido *p*-cumárico (FORD, 1986). A reação consiste na formação de ácido cloroso, que se decompõem em dióxido de cloro como produto principal e íons cloreto e clorato como produtos secundários. As reações que ocorrem não são claramente definidas e os produtos dependem da temperatura, pH e outros fatores (BROWNING, 1967).

3. OBJETIVOS

A finalidade deste trabalho foi verificar se a hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar aumenta com a redução do teor de lignina e se ela depende da distribuição topoquímica dos ácidos hidroxicinâmicos e da lignina presentes na parede celular.

3.1. Metas

- Tratar o bagaço de cana-de-açúcar com clorito de sódio e caracterizar quimicamente os modelos gerados;
- Avaliar a influência do teor de lignina na sacarificação enzimática dos modelos gerados pelo tratamento químico;
- Analisar a distribuição topoquímica da lignina e de ácidos hidroxicinâmicos no córtex e na medula de cana-de-açúcar;
- Obter uma relação entre a distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos e a eficiência da sacarificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana utilizado nos experimentos foi fornecido pela Companhia Açucareira do Vale do Rosário, em Orlândia, São Paulo. . O bagaço foi lavado em uma coluna de PVC (Figura 14) com uma tela de nylon de 200-mesh em sua base para a retirada de impurezas e da sacarose residual. Para evitar a perda de fibras menores que 0,05 mm, o eluído foi recirculado repetidas vezes até que visualmente não fosse observada turbidez. Em seguida, mais água foi adicionada, sem recirculação, e a lavagem prosseguiu até que não fossem detectados açúcares pelo método fenol – ácido sulfúrico (item 4.4).

O material lavado foi distribuído em uma bandeja e colocado em uma estufa de circulação FANEM 320-SE a 30°C. O bagaço permaneceu na estufa até que a umidade atingisse um valor próximo de 10%.

Figura 14 – Esquema representativo do sistema de lavagem do bagaço. Está evidenciada a coluna de PVC (A), o recipiente para reter água (B) e a bomba para recirculação (C).

4.2. Determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar

As amostras de bagaço (3 g de amostra moída a 20-mesh) foram extraídas com 95% de etanol por 6 h, em aparelho Soxhlet. As amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% a 30°C por 60 minutos (300 mg de amostra e 3 mL de ácido sulfúrico). Ao material foram adicionados 79 mL de água e a mistura foi autoclavada a 121°C / 1 atm por 60 minutos. Depois de resfriado, o material foi filtrado em filtro de vidro poroso número 3 e seco a 105°C até massa constante para a determinação da lignina insolúvel. A lignina solúvel e os açúcares foram medidos no filtrado. A concentração de lignina solúvel foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível HITACHI U-2001 a 205 nm utilizando a absorvidade molar de 105 L/g.cm. As concentrações de açúcares na fração solúvel foram determinadas por HPLC usando a coluna BioRad HPX-87H a 45°C e a fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol/L, a uma vazão de 0,6 mL/min. Os açúcares foram detectados com temperatura controlada (35°C) em detector de índice de refração (WATERS 2414) (FERRAZ et al., 2000).

4.3. Preparo dos substratos modelo com teores reduzidos de lignina

Os bagaços com teores reduzidos de lignina foram preparados segundo a metodologia de Browning (1967) para preparo de holocelulose. O método baseia-se na solubilização da lignina por soluções ácidas de clorito de sódio.

Para cada grama de bagaço de cana-de-açúcar, foram utilizadas 0,3 g de clorito de sódio (Fluka), 0,1 mL de ácido acético (Synth) e 32 mL de água destilada. O frasco foi colocado em banho aquecido com temperatura entre 70-80°C. A cada hora de reação foram adicionados mais 0,1 mL de ácido acético e 0,3 g de clorito de sódio, até o tempo de 4 horas. Foram retiradas amostras após cada hora de reação. As amostras foram resfriadas a 10°C, filtradas em filtros de placa porosa nº 2 e lavadas com 80 mL de água destilada e 20 mL de acetona.

4.4. Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico, conforme proposto por Dubois et al. (1976). Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL da amostra a ser analisada. Em seguida, foram adicionados 25 µL de fenol 80% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, vagarosamente. Os tubos foram agitados e resfriados à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 490 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em açúcares através de uma curva de calibração previamente construída utilizando concentrações conhecidas de glicose.

4.5. Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado seguindo a metodologia proposta por Ghose (1987). Foram preparados 3 reagentes para determinação de proteínas: Reagente A – 20 g de Na_2CO_3 e 4 g de NaOH, dissolvidos em água destilada até atingir o volume final de 1000 mL; reagente B1 – 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em água destilada, volume final 100 mL; reagente B2 – 2 g de tartarato de sódio e potássio dissolvido em água destilada, volume final 100 mL; reagente C – misturaram-se 1 mL do reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do reagente A, nessa ordem.

O extrato enzimático foi diluído (500x) e as proteínas presentes foram precipitadas adicionando 1 mL do extrato e 1 mL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi mantida a 4°C por 60 minutos. Passado esse tempo, a mistura foi centrifugada por 30 min, 4.600 g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi solubilizado em 2 mL do reagente A. Foram misturados 0,5 mL dessa solução à 5 mL do reagente C. Depois de 10 minutos, adicionaram-se 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu (1 N), seguida de agitação vigorosa. Após 30 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de proteínas usando a curva de calibração de albumina, variando sua concentração (0,067; 0,1; 0,125; 0,17; 0,25; 0,33; 0,5; 0,67 e 1 mg/mL).

4.6. Determinação das atividades enzimáticas

4.6.1. Preparo das curvas de calibração

4.6.1.1. Curva de *p*-nitrofenol (*p*NP)

Construiu-se uma curva de pNP misturando em tubos de ensaio 0,1 mL de soluções de pNP com diferentes concentrações (0,18; 0,54; 0,72; 1,08 e 1,44 $\mu\text{mol/mL}$) a 0,4 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. Em seguida, foi adicionado 1 mL de bicarbonato de sódio 10% (m/v) em cada tubo. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 410 nm. O branco foi feito substituindo a solução de pNP por solução tampão. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de pNP e a curva de calibração foi obtida.

4.6.1.2. Curva de glicose

A curva de glicose foi construída misturando 0,1 mL de soluções de glicose (1,39; 2,78; 5,56; 8,34 e 11,12 $\mu\text{mol/L}$) e 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH4,8. Foram adicionados 1,5 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) e a mistura foi fervida por 5 minutos. Depois de esfriar, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi feito substituindo a solução de glicose por solução tampão. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de glicose e a curva de calibração foi obtida.

4.6.1.3. Curva de xilose

A curva de xilose foi obtida de forma semelhante à curva de glicose (item 4.6.1.2), substituindo as soluções de glicose por soluções de xilose, nas concentrações de 4, 8, 12,

16 e 20 $\mu\text{mol/L}$. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de xilose e dessa forma obteve-se a curva de calibração.

4.6.2. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), através da liberação de *p*-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG).

Uma alíquota de 0,8 mL de pNPG 0,1% foi adicionada a 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância foi medida a 410 nm. O branco foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, o bicarbonato antes do extrato enzimático.

Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de *p*-nitrofenol por minuto, a 45°C.

4.6.3. Endoglucanase

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo Tanaka et al. (1981). O método consiste na hidrólise de carboximetilcelulose, resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de carboximetilcelulose (SIGMA C5013) 0,44% foi adicionada a 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 45°C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 45°C.

4.6.4. Celulases totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). 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 aquecidos em banho a 45°C por 60 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 3,0 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Foram adicionados então 20 mL de água destilada em cada tubo e agitou-se a mistura para que ficasse homogênea. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. 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 de calibração e usados para construir um gráfico relacionando 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 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulases totais do extrato FPU/mL.

A curva de calibração usada no cálculo da atividade de FPU foi preparada uma solução de glicose de 10 mg/mL. Aliquotas de 1,0 mL dessa solução foram adicionadas em 4 tubos e a em cada um desses tubos foram adicionadas diferentes volumes (4,0; 2,0; 1,0 e 0,1 mL) de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A curva de calibração de glicose foi construída através da relação entre massa de glicose em 0,5 ml (1,0; 1,6; 2,5 e 3,4 mg) e a absorbância em 540 nm, utilizando 0,5 mL de cada solução, 1,0 mL de tampão e 3,0 mL de DNS.

4.6.5. β -D-xilanase

A atividade de xilanase foi determinada segundo Bailey, Biely e Poutanen (1992).

Um volume de 0,9 mL de uma solução de xilana de birchwood 1% foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e a mistura foi incubada a 45°C por 5 minutos. A reação foi

interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose. O branco foi feito adicionando o DNS antes do extrato enzimático.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 45°C.

4.6.6. β -xilosidase

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

Um volume de 0,4 mL de solução de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX) 0,1% foi adicionado a 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído. A mistura foi incubada a 45°C por 30 minutos. Após esse tempo, 1,0 mL de bicarbonato de sódio 10% foi adicionado para parar a reação. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de *p*NP utilizando a curva de calibração previamente construída.

Uma unidade de β -xilosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*NP por minuto, a 45°C.

4.7. Sacarificação enzimática do bagaço de cana

4.7.1. Preparações enzimáticas comerciais

Foram utilizadas preparações comerciais de celulasas de *Trichoderma. reesei* ATCC 26921 e celobiase de *Aspergillus niger* (Novozymes, Dinamarca)

4.7.2. Condição de hidrólise enzimática dos bagaços

Os bagaços deslignificados por clorito e uma amostra referência do bagaço de cana-de-açúcar foram tratados com celulasas. A carga enzimática utilizada de celulasas foi 10 FPU/g de bagaço preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 para um volume final de 10 ml. Foram avaliadas as concentrações de 2, 5 e 10 % de bagaço. A reação foi conduzida sob agitação de 120 ciclos por minuto a 45°C. Amostras foram coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para interromper a hidrólise, o material foi fervido por 5 minutos e em seguida centrifugado a 11.260 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi analisado por CLAE para estimar a concentração de açúcares liberados pela hidrólise.

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.

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

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

4.7.3. Hidrólise com celulasas e β -glicosidase

Foi realizada uma hidrólise combinando os extratos de *T. reesei* (contendo celulasas) e de *A. niger* (contendo celobiase), para avaliar o efeito da adição de β -glicosidase na sacarificação enzimática dos materiais.

Ensaio contendo celulasas (10 FPU/g de bagaço) e 20 UI de β -glicosidase por grama de material foram realizados. A hidrólise dos materiais tratados e não-tratados foi avaliada, na concentração de substrato de 2%. Foram coletadas alíquotas de 250 μ L nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas. A parada da hidrólise foi feita pela fervura do material por 5 minutos, seguida por centrifugação a 11.260 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi analisado por CLAE e a CEC e CEH foram calculadas, usando as equações 1 e 2, respectivamente. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.8. Efeito da adição de lignina na hidrólise de cartão de celulose

Para avaliar o efeito inibitório da presença da lignina na hidrólise enzimática, foi realizado um experimento utilizando cartão de celulose (polpa Kraft de eucalipto braqueada), material proveniente da polpação em indústrias de papel e celulose e lignina de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor e precipitada com HCl. A composição química do cartão de celulose foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.

Para simular a hidrólise de um material contendo teor elevado de lignina (25%), misturou-se 0,134 g de lignina e 0,402 g do cartão de celulose em frascos Erlenmeyers de 125 mL. As enzimas utilizadas foram os extratos comerciais usados no item 4.7.3. Variou-se a carga enzimática em 2, 4, 6, 8 e 10 FPU/g (celulasas) e 4, 8, 12, 16, 20 UI/g (β -glicosidase). O controle para cada carga de enzima foi feito utilizando apenas o cartão de celulose, sem adição de lignina. Foi adicionado tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH4,8 para completar o volume para 10 mL, de forma que o teor de sólidos fosse 5%. Alíquotas de 250 μ L foram retiradas nos tempos de 1, 2, 4 e 8 horas, fervidas e centrifugadas a 11.260 x g por 15 minutos, para posterior análise por CLAE conforme item 4.7.2. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.9. Ensaaios com entrenós de cana-de-açúcar

4.9.1. Preparação de bagaço deslignificado para hidrólise enzimática

Colmos de cana-de-açúcar de 18 meses de uma plantação em Lorena, São Paulo, foram cortados. Cortes cilíndricos de 25 mm de comprimento foram obtidos do terceiro ao sétimo entrenó, a partir da base do colmo. Com o auxílio de um furador de rolhas, esses cilindros foram separados em quatro partes, conforme mostrado na Figura 15: parte externa de 2 mm de espessura, contendo casca e epiderme, que foi descartada; região central, com 11 mm de diâmetro, correspondente à amostra de medula; anel próximo a região central, com 9 mm de espessura, que corresponde à interface medula e córtex e também foi descartado; e a região restante, com aproximadamente 10 mm de espessura, que foi cortada em pedaços menores com aproximadamente 10x10x25 mm, correspondente à amostra de córtex.

Figura 15 - Representação do corte transversal de um entrenó de cana-de-açúcar, evidenciando as regiões divididas: medula (A); interface medula e córtex (B); córtex (C) e região externa, contendo casca e epiderme (D).

As amostras de córtex e medula foram extraídas com água em Soxhlet, usando ciclos de 8 horas de extração, para remover sacarose. Depois de cada ciclo de extração,

foram determinados açúcares totais (item 4.4) no extrato. Cada ciclo foi feito com nova água e a extração procedeu até que o extrato estivesse livre de açúcares. Uma parte do material extraído foi separada e usada como referência nos ensaios de análise microespectrofotométrica. A outra parte do material foi tratada com clorito de sódio / ácido acético, conforme descrito no item 4.3. Para evitar o colapso das amostras após longo período de deslignificação, as amostras foram amarradas com fio de nylon.

Depois de lavadas com água e acetona, as amostras foram mantidas em geladeira até serem utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática e análises microespectrofotométricas. As amostras foram caracterizadas quimicamente conforme metodologia descrita no item 4.2.

4.9.2. Análises microespectrofotométricas ultravioleta

Para realizar as análises espectroscópicas UV, pequenos cortes de aproximadamente 1x1x0,5 mm foram retirados das regiões de córtex e medula. As amostras foram desidratadas em gradiente de acetona analisada em microscópios acoplados com detectores de UV disponibilizados pelo Instituto de Biologia da Madeira em Hamburgo, Alemanha (trabalho realizado em colaboração com o Prof. Gerald Koch, durante estadia de pesquisa do Prof. André Ferraz em Hamburgo). Cada amostra foi previamente impregnada em resina epóxi Spurr e posteriormente cortada no sentido transversal das fibras com 1 μm de espessura usando um ultra-micrótomo (Mendonça et al, 2004). Os cortes foram fixados sobre lâminas de quartzo e analisados por microscopia. Os espectros UV foram registrados a partir de áreas selecionadas nas paredes celulares e corresponderam a quadrados de 1 μm^2 . O microscópio usado nesses experimentos foi um equipamento Zeiss/J&W. O aumento usado para a localização das áreas de interesse foi de 400 vezes. Os comprimentos de onda selecionados foram 278 e 315 nm, para detecção da distribuição de lignina e ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente. As amostras também foram analisadas através da varredura de comprimentos de onda de 240 a 400 nm, em pontos de 1 μm^2 , usando o UVMSP (Tidas MSP 80, J&M). Foram gerados pelo menos cinco espectros de cada tipo celular e de cada camada da parede celular.

4.9.3. Hidrólise enzimática das amostras

As amostras de córtex e medula foram moídas (20-mesh) e digeridas com celulasas (10 FPU/g) e β -glicosidase (20 UI de β -glicosidase por grama de substrato). As hidrólises ocorreram em tubos de centrifuga de 50 mL contendo 200 mg de material (massa seca), os preparados enzimáticos e solução tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, suficiente para completar o volume para 10 mL, de forma que a concentração de substrato fosse 2%). Os tubos foram incubados em banho com aquecimento a 45°C, com agitação recíproca de 120 ciclos por minuto. Aliquotas de 250 μ L foram retiradas nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas, fervidas e centrifugadas a 11.260 x g por 15 minutos. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. A detecção de glicose, celobiose e xilose foi feita por CLAE, conforme descrito no item 4.2. As CEC e CEH foram determinadas utilizando as equações 1 e 2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um material rico em celulose que pode ser convertida enzimaticamente em glicose. No entanto, a associação desse polímero com a lignina e com a hemicelulose dificulta a ação das enzimas celulolíticas. Os resultados apresentados a seguir se referem à remoção da lignina do bagaço de cana para avaliar o efeito desse componente na hidrólise enzimática dos polissacarídeos.

5.1. Tratamento do bagaço com clorito de sódio em meio ácido

Os bagaços de cana-de-açúcar foram deslignificados e a composição química foi determinada (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar tratados com clorito de sódio em meio ácido por diferentes tempos.

Tempo de tratamento (h)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
0	46,6	27,2	22,8
0,25	46,5 ± 4,2	27,9 ± 1,6	18,2 ± 1,9
1	49,2 ± 7,9	29,2 ± 3,2	17,4 ± 3,8
2	50,0 ± 6,7	29,2 ± 2,2	12,4 ± 4,2
3	52,4 ± 6,0	28,0 ± 3,0	8,4 ± 1,0
4	53,2 ± 5,2	28,2 ± 3,2	9,0 ± 3,0

O teor de celulose nos bagaços aumentou de 46,6%, no bagaço não tratado, para 53,2%, no bagaço tratado por 4 horas. Apesar de o teor de lignina continuar diminuindo com o tempo de tratamento, o aumento mais expressivo do teor de polissacarídeos ocorre na primeira hora de tratamento. Uma explicação para essa observação é a solubilização parcial dos polissacarídeos no tratamento com clorito de sódio por tempo prolongado.

Ahlgren e Goring (1971) observaram que esse tratamento é seletivo para remoção de lignina até 60% de deslignificação. A remoção de lignina acima desse percentual é acompanhada da remoção de polissacarídeos.

O tratamento com clorito de sódio pode causar a oxidação de celulose em meio com pH neutro. Para evitar esse efeito, é adicionado ácido acético ao meio reacional (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010). No entanto, a redução do valor de pH pode causar a hidrólise ácida da cadeia de celulose, diminuindo o seu grau de polimerização e podendo assim, solubilizar parte da molécula (MILLETT; MOORE; SAEMAN, 1954). Hubbell e Ragauskas (2010) mostraram que celulose microcristalina e de papel de filtro podem ter seus graus de polimerização reduzidos em até 5 e 35%, respectivamente, quando tratados com clorito de sódio em meio ácido.

Durante o tratamento com clorito, parte da hemicelulose também foi extraída. Uma pequena fração dos carboidratos das hemiceluloses, como a arabinose, é solubilizada quando submetida a esse tratamento (FORD, 1986). Ahlgren e Goring (1971) mostraram que glucomananos e galactanas são mais suscetíveis à degradação pelo tratamento com clorito que as xilanas e arabinanas. Como a hemicelulose de bagaço de cana é composta principalmente pelos dois últimos, a solubilização dessa fração foi pequena. No entanto, comparativamente à celulose, houve maior solubilização da hemicelulose pelo tratamento com clorito.

5.2. Caracterização das enzimas comerciais

Os extratos enzimáticos utilizados nesse trabalho foram obtidos da empresa Novozymes. Como se tratava de preparações comerciais brutas, as atividades das enzimas de interesse para ser utilizada na hidrólise da celulose e hemicelulose, bem como o teor de proteínas, foram determinados (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividades das enzimas hidrolíticas e teor de proteínas das enzimas comerciais.

	Celulases de <i>Trichoderma. reesei</i> ATCC 26921	Celobiase de <i>Aspergillus niger</i>
β-glicosidases (UI/mL)	32,3	711,4
Endoglucanases (UI/mL)	1509,2	25,0
Celulases totais (FPU/mL)	41,0	não determinada
β-D-xilanases (UI/mL)	482,9	50,7
β-xilosidases (UI/mL)	39,6	3,9
Teor de proteínas (mg/mL)	183,6	67,6

O extrato enzimático de *T. reesei* ATCC 26921 apresentou elevada atividade de endoglucanases (1509,2 UI/mL). Esse grupo de enzimas é importante na conversão do bagaço de cana, pois é responsável pela despolimerização da celulose, gerando moléculas com menor grau de polimerização (LYND et al., 2002). Essa despolimerização cria novos sítios de ação para exoglucanases, também presentes nesse extrato. No entanto, para conversão satisfatória da celulose em glicose, a presença de celobiasas também é importante, uma vez que é através da ação desse grupo de enzimas que os oligossacarídeos serão hidrolisados, liberando glicose. A atividade de celobiasas no extrato de *T. reesei* ATCC 26921 é baixa (32,3 UI/mL), quando comparada com as atividades de endo e exoglucanases. Dessa forma, a suplementação do extrato com β-glicosidases de *A. niger* (711,4 UI/mL) pode resultar em maiores valores de conversão.

O extrato de *T. reesei* ATCC 26921 apresentou uma alta atividade de xilanases (482,9 UI/mL), característica que faz com que sua utilização seja também importante para a hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana. A presença das hemiceluloses oferece resistência à hidrólise das moléculas de celulose (HIMMEL et al., 2007) e uma das formas de melhorar a conversão de celulose em glicose é combinar a ação de celulases com xilanases (TABKA et al., 2006).

5.3. Hidrólise enzimática dos bagaços deslignificados com clorito de sódio

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes teores de lignina foram submetidas à hidrólise com celulases de *T. reesei* ATC26921, utilizando a carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço. Foi feita uma avaliação do efeito do teor de sólidos na hidrólise dos polissacarídeos. Os teores de sólidos avaliados foram 2, 5 e 10%. Foram retiradas amostras nos tempos de 24, 48 e 72 horas, porém, a partir de 48 horas de hidrólise não foi observado aumento na liberação de açúcares. Os dados completos desse ensaio estão no Apêndice A. A relação entre o nível de hidrólise de polissacarídeos e o teor de lignina, nos diferentes teores de sólidos, com 48 horas de hidrólise, está representada na Figura 16.

Figura 16 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) em função do teor de lignina, com 48 horas de hidrólise. Foram testados três teores de sólidos: (-◆-) 2%, (-■-) 5% e (-▲-) 10%.

Considerando a conversão de celulose, a concentração de sólidos não exerceu uma influência importante, uma vez que os resultados de hidrólise variaram pouco para a maioria dos bagaços (Tabela 4). No entanto, a conversão de xilana foi maior nas consistências mais elevadas em todos os bagaços testados, diferindo em até 26,7% (entre 2 e 10% de consistência) no bagaço contendo 14,7% de lignina. Esses resultados diferem dos obtidos por Jørgensen et al. (2006), que avaliaram a influência da concentração de substrato na conversão enzimática de polissacarídeos, utilizando palha de trigo. Eles observaram que a conversão, tanto de celulose quanto de hemiceluloses, caiu com o aumento do teor de sólidos, reduzindo em aproximadamente 10% com o aumento da consistência de 2 para 7,5%. Aumentando a consistência para 40%, a queda do nível de hidrólise atingiu 50%.

Em todas as consistências testadas, a conversão, tanto de celulose quanto de xilana, variou inversamente com o teor de lignina. Com 48 horas de tratamento, a conversão de celulose aumentou de 21,5 para 78,3%, de 17,5 para 83,4% e de 20,0 para 81,1%, nas hidrólises conduzidas a 2, 5 e 10% de consistência, respectivamente (Tabela 4). Lee et al. (2009) também observaram uma relação inversa entre o teor de lignina e a conversão enzimática de celulose em madeira tratada com líquidos iônicos. O aumento observado foi de 46% (amostra com 17% de lignina) para 95% (amostra com 8,8% de lignina). No entanto, ele observou que a remoção de lignina de materiais menos lignificados resulta em diferenças menores na conversão de celulose, como foi observado no presente trabalho.

Como o extrato enzimático continha atividade considerável de xilanase e de β -xilosidase, a liberação de xilose foi medida durante a hidrólise. A conversão de xilana, assim como a de celulose, foi influenciada inversamente pelo teor de lignina. A Tabela 4 mostra os valores de conversão de xilana nos bagaços de cana tratados com clorito de sódio. Na hidrólise conduzida a 2% de consistência, a conversão de xilana aumentou de 8,0 para 44,3%, enquanto que nos valores de consistência de 5 e 10%, a conversão aumentou de 8,8 para 52,3% e de 11,0 para 60,3%, respectivamente.

Tabela 4 - Conversão de celulose e xilana dos bagaços de cana tratados com clorito de sódio, hidrolisados por 48 horas com celulases.

		Conversão (%)		
	Teor de lignina (%)			
		2% de consistência	5% de consistência	10% de consistência
Celulose	22,8	21,5	17,5	20,0
	16,9	-	-	44,5
	14,7	34,1	51,2	59,4
	9,4	66,6	73,1	70,8
	7,7	84,7	78,0	71,2
	6,8	78,3	83,4	81,1
Xilana	22,8	8,0	8,8	11,0
	16,9	-	-	32,2
	14,7	24,5	30,7	51,2
	9,4	34,6	45,0	51,4
	7,7	48,4	49,7	53,5
	6,8	44,3	52,3	60,3

A remoção da lignina facilita o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos. Mooney et al. (1998) relacionaram a hidrólise enzimática de polpas de coníferas deslignificada com clorito de sódio e não deslignificada com a adsorção das enzimas nos materiais. Eles observaram que na polpa deslignificada (8% de lignina), a quantidade de enzimas adsorvidas foi maior que na polpa não deslignificada (27% de lignina) e esse aumento da adsorção foi acompanhado da hidrólise completa da celulose.

Muitos estudos têm sido dirigidos para a obtenção de variedades de plantas com teor reduzido de lignina, seja por técnicas de engenharia genética (CHEN; DIXON, 2007; HU et al., 1999), ou por melhoramento genético clássico (DAVISON et al., 2006). Um fator importante para esses estudos é o quanto de lignina é necessário remover para obter níveis mais elevados de conversão de polissacarídeos, com o objetivo de reduzir ou até mesmo dispensar os pré-tratamentos químicos ou físicos. Dessa forma, a relação entre a

conversão de polissacarídeos e o percentual de remoção de lignina foi determinada e está mostrada na Figura 17.

Como pode ser observado, o gráfico apresenta uma curva em forma de uma sigmóide. A explicação para esse comportamento é que não é necessário remover toda a lignina do material para que se alcance a máxima conversão dos polissacarídeos. A Figura 17 mostra um ponto de inflexão na curva, entre 25 e 35%, região que representa um maior incremento na digestibilidade dos bagaços. Esse acréscimo na conversão em função da lignina extraída é grande até 59% de remoção desse componente. A partir desse valor, a remoção de lignina não proporciona aumentos consideráveis do nível de hidrólise. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Lee et al. (2009), que observaram um ponto de inflexão na curva em 30% de remoção de lignina e que a remoção de 50% da lignina de madeira resulta em 90% da conversão de celulose, valor que não foi aumentado em função de maior deslignificação.

Figura 17 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) em função do percentual de lignina extraída, a média das conversões nas diferentes consistências, com 72 horas de hidrólise.

A Figura 18 mostra a cinética da hidrólise dos bagaços deslignificados e controle, na concentração de 5%. No bagaço com menor teor de lignina, ocorreu a maior hidrólise enzimática de celulose e de hemicelulose. No bagaço não tratado a conversão de celulose foi inferior a 20%, já o bagaço com menor teor de lignina (6,8%) a hidrólise da celulose foi superior a 80%.

Figura 18 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) dos bagaços de cana com 5% de consistência. (- ◆ -) Bagaço não tratado; (- ■ -) bagaço tratado por 1 hora; (- ▲ -) bagaço tratado por 2 horas; (- x -) bagaço tratado por 3 horas; (- ● -) bagaço tratado por 4 horas.

A conversão enzimática da xilana também se relacionou positivamente à remoção de lignina, no entanto, a liberação de xilose foi menor que a de glicose, mesmo nos bagaços mais deslignificados, atingindo valores próximos a 50%.

Os tempos de hidrólise analisados nesse ensaio não diferiram substancialmente quanto aos níveis de açúcares liberados. Isso ocorreu porque as maiores taxas de conversão acontecem nas primeiras horas de hidrólise. Katz e Reese (1967) já haviam demonstrado que a hidrólise da celulose era rápida, alcançando altas taxas nas primeiras horas de

hidrólise e diminuindo em função do tempo. Esse perfil cinético pode ocorrer devido à inibição pelo produto de hidrólise, acentuada pela pequena atividade de celobiase no extrato enzimático. Para minimizar esse efeito, foram feitos novos ensaios com adição de β -glicosidase. Outro fator que pode reduzir a velocidade da hidrólise enzimática é o aumento da recalcitrância do material residual, de forma que as porções mais hidrolisáveis são convertidas primeiramente. Esses fatores também podem ser combinados. Mooney et al. (1998) observaram perfil semelhante, atingindo 80% de conversão com 24 horas de hidrólise e não ultrapassando 85% após 140 horas. As amostras de madeira deslignificadas por Lee et al. (2009) também seguiram esse comportamento ao serem digeridas por celulasas, e o máximo de hidrólise observado por eles foi alcançado com tempo de 11 horas. Outro fator que pode reduzir a velocidade da hidrólise enzimática é a inibição pelo produto de hidrólise, acentuada pela pequena atividade de celobiase no extrato enzimático. Para minimizar esse efeito, foram propostos novos ensaios com adição de β -glicosidase.

5.4. Hidrólise dos bagaços suplementada com β -glicosidase

Os ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços deslignificados com adição de β -glicosidase foram conduzidos retirando alíquotas nos tempos iniciais de hidrólise (4 e 8 h) e estendendo até as 72 horas (Figura 19). Os dados completos desse ensaio estão no apêndice B. A conversão dos polissacarídeos aconteceu de forma mais eficaz nas quatro primeiras horas de hidrólise e a taxa de conversão caiu à medida que a reação ocorria. Nas quatro primeiras horas, a liberação de glicose ocorreu a uma taxa de $13,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no bagaço contendo 11,1% de lignina, enquanto que de 8 para 24 horas, a taxa de liberação de glicose foi $1,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no mesmo bagaço. Como discutido anteriormente, a conversão de polissacarídeos fica mais lenta no decorrer da hidrólise devido à recalcitrância mais elevada do material remanescente.

Figura 19 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) em função do tempo de hidrólise. (♦) Não tratado, (■) tratado por 15 minutos, (▲) tratado por 1 hora, (×) tratado por 2 horas, (*) tratado por 3 horas, (●) tratado por 4 horas.

A hidrólise enzimática com celulasas e β -glicosidasas mostrou níveis mais elevados de conversão de polissacarídeos. Com a ação sinérgica das celobiasas, a inibição das celulasas pela celobiose, um dos produtos da hidrólise é reduzida. O consumo desse dissacarídeo, bem como de pequenos oligossacarídeos, proporciona valores maiores de conversão, o que faz com que a necessidade de remoção da lignina seja menor, visando alcançar valores elevados de conversão de polissacarídeos (Figura 20).

Não foi possível observar um ponto de inflexão na curva de conversão de polissacarídeos em função do percentual de lignina extraída. No entanto, pode ser observado claramente que a partir de 35%, o aumento dos níveis de hidrólise devido à remoção adicional desse componente não é tão considerável quanto o aumento da conversão pela extração de lignina nos bagaços mais lignificados. É possível observar também que extraindo 50% da lignina presente nos bagaços a conversão de celulose é completa. Esse resultado é importante e está de acordo com o que foi observado por Lee e al. (2009), que obteve conversão máxima de celulose (95%) removendo 50% da lignina de madeira, e com Mendes et al. (2011), que obteve aumento considerável dos níveis de hidrólise (11 para 85%) ao remover 55% da lignina de bagaço de cana.

Figura 20 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) em função da extração de lignina, na presença (●) e ausência (◆) de β-glicosidases, a 2% de consistência.

A conversão de xilana também aumentou com a adição de β -glicosidase (Figura 20). Sabe-se que as hemiceluloses limitam a conversão enzimática da celulose, uma vez que atuam como uma barreira dificultando o acesso das celulasas à molécula de celulose (HIMMEL et al., 2007). No entanto, considerando que a celulose e hemiceluloses estão associadas fisicamente, a remoção de celulose também facilita a hidrólise das hemiceluloses, já que a acessibilidade das hemicelulasas será maior. Como a conversão de celulose foi maior na presença de celobiasas, o acesso das xilanasas à xilana pode ter sido facilitado, de forma que a conversão dessa molécula foi maior na presença de celobiasas.

A Figura 20 mostra que a adição de β -glicosidase no bagaço não deslignificado não representa aumento na conversão de polissacarídeos, enquanto que nos bagaços deslignificados, houve diferença entre os níveis de hidrólise pela adição dessa enzima. Isso indica que em materiais com elevado teor de lignina, o principal limitante da hidrólise enzimática é esse componente. Já nos materiais menos lignificados, a inibição pelos produtos parece ser o fator mais importante, uma vez que na presença de β -glicosidase, a celulose foi totalmente convertida em glicose. Em um trabalho recente, Várnai, Siika-Aho e Viikari (2010) mostraram que em madeira pré-tratada a vapor, a lignina foi o principal limitante da hidrólise e apenas 40% da celulose foi convertida em glicose, com 48 horas de hidrólise. No entanto, ao tratar madeira deslignificada por clorito de sódio com celulasas e β -glicosidase, toda celulose foi convertida em glicose em 48 horas, enquanto que na ausência de celobiasas a conversão foi limitada a 80%, nesse mesmo tempo, indicando que conversão foi limitada pelos produtos da hidrólise da celulose. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado no presente trabalho.

5.5. Efeito da adição de lignina na hidrólise de polissacarídeos

Para avaliar o efeito da lignina na hidrólise dos polissacarídeos, foi realizado um experimento adicionando lignina a uma amostra de cartão de celulose. Este foi caracterizado quimicamente e a celulose representou 76,2% do material e a xilana, 14,8%. A lignina de bagaço de cana-de-açúcar foi adicionada ao cartão, visando simular um material lignocelulósico com 25% de lignina. Variou-se a carga enzimática no experimento para verificar se o efeito inibitório da lignina era mais expressivo quando a quantidade de

enzimas fosse menor. O resultado da conversão de polissacarídeos, variando a carga enzimática, na presença e na ausência de lignina está mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Conversão de celulose (A) e xilana (B) na presença e ausência de lignina, variando a carga enzimática.

Sabe-se que a lignina pode limitar a hidrólise enzimática dos polissacarídeos de parede celular de três formas: redução da acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose e às hemiceluloses (MOONEY et al., 1998), adsorção improdutiva (BERLIN et al., 2005) e pela liberação de compostos de baixa massa molar (BERLIN et al. 2006). No primeiro caso, é necessário que a lignina esteja quimicamente ligada à fração polissacarídica, enquanto que nos dois últimos, é necessário apenas que ela esteja no meio reacional. Esse experimento teve como objetivo avaliar os dois últimos efeitos inibitórios.

A adição de lignina não resultou em valores menores de conversão enzimática dos polissacarídeos. Se as enzimas adsorvessem improdutivamente na lignina, menos enzimas

estariam disponíveis para hidrolisar os polissacarídeos, e com isso, a conversão seria menor. Da mesma forma, se os compostos liberados pela lignina inibissem as enzimas, uma menor quantidade de açúcares seria liberada. No entanto, não foi observado efeito inibitório e a conversão dos polissacarídeos foi semelhante ao adicionar lignina no cartão de celulose.

Para verificar se houve liberação de compostos fenólicos que pudessem inibir as celulasas, a absorbância da fração líquida foi medida a 280 nm e o seu valor aumentou de 0 para 0,345 com duas horas de exposição à lignina. Isso confirmou que os compostos fenólicos estavam sendo liberados, mas não estavam inibindo as enzimas.

Os resultados obtidos nesse experimento diferem do que foi observado por Berlin et al. (2006). Ao adicionar lignina à celulose microcristalina, eles observaram uma diminuição acentuada na atividade de celulasas (até 84%) e uma queda menor na atividade de xilanases (até 39%) e celobiasas (até 11%). Essa redução da atividade foi atribuída à inibição das celulasas pelos compostos de baixa massa molar liberados pela lignina. Em outro trabalho, Berlin et al. (2006) observaram a redução da atividade de celulasas em 35%, acompanhada pela adsorção de 50% das proteínas adicionadas. Essas duas informações associadas indicam que as enzimas hidrolíticas adsorveram improdutivamente à lignina, de forma que a quantidade de enzimas disponíveis para hidrolisar a celulose microcristalina foi menor. Outros trabalhos relataram essa adsorção improdutiva das celulasas à lignina (BORJESSON; PETERSON; TJERNELD, 2007; ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; YANG; WYMAN, 2006). No entanto, em um trabalho recente, Nakagame, Chandra e Saddler (2010) testaram o efeito da lignina isolada de doze fontes e observaram que ao adicionar lignina de palha de milho à celulose microcristalina, não houve redução dos níveis de hidrólise. Esse resultado, juntamente com o observado no presente trabalho, indica que o principal efeito inibitório da lignina de gramíneas é a redução da acessibilidade das celulasas à molécula de celulose, e dessa forma, precisa estar ligada à fração polissacarídica para limitar a conversão da mesma.

5.6. Ensaaios com as amostras de cana-de-açúcar

5.6.1. Composição química das frações

Os entrenós de cana-de-açúcar foram divididos em córtex, parte externa do entrenó, e medula, parte interna do entrenó. As amostras obtidas, depois de extraídas em água para remover a sacarose, foram deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido por diferentes tempos e a composição química foi determinada (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição química das amostras de medula e córtex de cana-de-açúcar pré-tratadas com clorito de sódio.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Medula não tratada	53,2	24,3	12,5
Medula tratada por 1 hora	54,2	28,1	7,6
Medula tratada por 2 horas	54,2	28,9	6,6
Córtex não tratado	43,7	30,3	19,4
Córtex tratado por 1 horas	46,1	30,6	16,7
Córtex tratado por 2 horas	48,8	32,6	12,0
Córtex tratado por 4 horas	51,5	34,4	7,5

A região de medula da cana-de-açúcar apresentou uma maior concentração de celulose e menor teor de lignina que a região de córtex. Isso ocorre por que as células de parênquima, que são mais abundantes na medula, são menos lignificadas, ao passo que o córtex é rico em feixes vasculares e tecidos de sustentação que são mais lignificados (AKIN, 2008; MOORE, 1987). Além disso, as paredes das fibras e das células de parênquima são mais espessas no córtex (SIQUEIRA et al., 2011). Essas duas observações explicam o maior teor de lignina de córtex, quando comparado à medula.

O tratamento com clorito de sódio se mostrou seletivo para remoção de lignina das amostras de córtex e medula. Como pode ser observado na Tabela 8, os teores de celulose

e de hemicelulose aumentaram, o que evidencia um enriquecimento dessas frações pela remoção da lignina. Ao final do tratamento por 4 horas, as amostras de córtex atingiram teor de lignina semelhante ao das amostras de medula tratadas por 1 hora.

5.6.2. Anatomia celular e distribuição topoquímica dos componentes aromáticos

As amostras de medula e córtex foram analisadas em um microespectrofotômetro ultravioleta para avaliar a distribuição topoquímica dos componentes aromáticos na parede celular. Foram registrados os espectros na região do ultravioleta de uma área de 1 μm^2 da camada S2 da parede de cada tipo celular, vasos, fibras e células de parênquima. Os espectros de córtex e medula estão mostrados na figura 22.

Os valores mais altos de absorbância foram obtidos no espectro ultravioleta da camada S2 dos vasos, seguidos por fibras e parênquima. É possível observar duas bandas bem definidas nos espectros das paredes celulares de vasos e fibras, em 278 e 315 nm. A banda em 278 evidencia a presença de unidades guaiacil de lignina, enquanto que a banda em 315 nm ocorre devido à presença de ácidos hidroxicinâmicos ligados à lignina e às cadeias de arabino-metil-glucurono-xilana, tipicamente encontrados em gramíneas (AKIN, 2008; HE; TERASHIMA, 1991; LYBEER et al., 2005). Os espectros da camada S2 das paredes de células de parênquima apresentaram valores menores de absorbância, especialmente na região de medula. Nesses espectros, a banda em 278 nm não foi bem resolvida, no entanto, um pico acentuado em 315 nm pode ser observado, devido à predominância dos ácidos hidroxicinâmicos esterificados com arabino-metil-glucurono-xilana (AKIN, 2008; GRABBER et al., 2009).

Figura 22 – Espectro ultravioleta de cada tipo celular da camada S2 de cana-de-açúcar não tratado, mostrando córtex (A) e medula (B). (■) Vasos, (●) fibras e (▲) células de parênquima.

Foram selecionadas regiões de córtex e de medula e estas foram analisadas em comprimentos de onda constantes de 278 e 315 nm, com uma resolução espacial de 0,25 μm . Os sinais do microespectrofotômetro ultravioleta foram convertidos em imagens digitalizadas, através do programa APAMOS (Zeiss, Jena, Alemanha) (Figura 23). As escalas de cores observadas na Figura 26 representam valores crescentes de absorbância do branco para azul marinho. As micrografias digitalizadas de fibras de medula e córtex apresentaram valores similares de absorbância, com máximo de intensidade na região de lamela média. Histogramas de frequência de cada imagem foram avaliados para calcular os

valores médios de absorbância. Em fibras de córtex e medula, os valores médios de absorbância em 278 nm foram 0,40 e 0,39, respectivamente, incluindo todas as camadas da parede celular. Os valores médios de absorbância de células de parênquima foram 0,31 na região de córtex e 0,18 na região de medula. É possível observar que há uma coerência entre dados obtidos nos espectros pontuais dos tipos celulares (Figura 22) com as imagens obtidas pela varredura de células individuais (Figura 23).

As amostras de córtex e medula após deslignificadas também foram analisadas pela técnica espectroscópica (Figura 23). É possível observar que a lignina e os compostos aromáticos presentes nas paredes celulares de fibras da região de córtex resistiram ao processo de deslignificação com clorito de sódio em meio ácido por 1 hora, enquanto que as fibras de medula foram rapidamente deslignificadas (Figura 23 a,b,c,d). De fato, as fibras de córtex necessitaram de um tempo maior de tratamento (4 horas) para remover consideravelmente os compostos aromáticos. Entretanto, na região de córtex, as células de parênquima foram rapidamente deslignificadas (1 hora) pelo tratamento (Figura 23 e,g). Os níveis mais elevados de deslignificação foram observados nas células de parênquima de medula, as quais não apresentaram absorbância na região do ultravioleta após 1 hora de tratamento (Figura 23 f,h).

Figura 23 – Micrografias digitalizadas através da varredura de cortes transversais de células de cana-de-açúcar, no comprimento de onda de 278 nm.

Os espectros ultravioletas obtidos das camadas S2 de fibras, vasos e células de parênquima das amostras tratadas com clorito de sódio em meio ácido estão mostrados na Figura 24.

Figura 24 – Espectro de absorbância no ultravioleta de vasos, fibras e células de parênquima de córtex e medula, tratados com clorito de sódio em meio ácido. (●) Amostras não tratadas, (■) tratadas por 1 hora e (▲) tratadas por 2 horas com clorito de sódio.

As amostras de medula foram tratadas por até 2 horas e as de córtex por até 4 horas, mas em geral, a remoção de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos foi completa após 2 horas de tratamento. Depois desse tempo, a lignina remanescente foi localizada na lamela média. Os espectros ultravioletas revelaram que os ácidos hidroxicinâmicos foram os primeiros a serem removidos, já que as bandas em 315 nm diminuíram mais rapidamente que as

bandas em 278 nm. Nas células de medula, a remoção dos ácidos hidroxicinâmicos foi ainda mais acentuada (Figura 24).

5.6.3. Hidrólise enzimática das amostras de córtex e medula

As amostras de córtex e medula tratadas com clorito de sódio em meio ácido foram digeridas por celulases de *T. reesei* ATCC 26921 e celobiases de *A. niger*. Tanto a celulose quanto a xilana das amostras de medula e córtex foram hidrolisadas (Figuras 25 e 26).

A celulose de medula não tratada foi prontamente digerida, alcançando 63% de conversão após 72 horas de hidrólise (Figura 25), ao passo que a celulose de córtex não tratado alcançou apenas 20% de conversão (Figura 26). Esse é um indicativo de que as células de parênquima, que predominam na região de medula, são consideravelmente menos recalcitrantes que os vasos e fibras predominantes nas regiões de córtex. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Jung e Casler (2006), que observaram que as células de parênquima de caule de milho em diversos estágios de maturação foram preferencialmente degradadas pela biota do rúmen. Hansen et al. (2011) também observaram que células de parênquima de medula de palha de trigo pré-tratada termicamente foram prontamente hidrolisadas por uma mistura de enzimas hidrolíticas. Em um trabalho de revisão, Akin (2008) relatou a degradação diferenciada de diversos tecidos e confirmou que tipos celulares com baixo teor de lignina são os primeiros a serem hidrolisados em muitas espécies vegetais.

A hidrólise de xilana ocorreu devido às xilanases e β -glicosidasas presentes na preparação enzimática de *T. reesei* ATCC 26921 (Tabela 3). Nas amostras de córtex, a conversão de xilana foi similar à conversão de celulose (Figura 26). No entanto, nas amostras de medula, a quantidade de xilana liberada foi bem menor que a quantidade de glicose liberada, o que indica que a hemicelulose presente na fração de medula após a deslignificação foi mais recalcitrante ao ataque enzimático (Figura 25).

Como já relatado, na medula há predominância de células parenquimatosas, com menos lignina que as demais estruturas presentes nessa região, porém com conteúdo elevado de ácidos hidroxicinâmicos (Figura 22). Essa informação possibilita inferir que a ação das enzimas celulolíticas não foi limitada pela presença dos aromáticos na parede das células de parênquima de medula. Além disso, o tratamento com clorito de sódio em meio

ácido não aumentou a conversão de celulose e de xilana nas amostras de medula (Figura 25), indicando que a recalcitrância dessa fração não depende apenas da presença desses compostos aromáticos.

A baixa degradabilidade da xilana de medula resulta em uma limitação da ação das celulasas, uma vez que as hemiceluloses associam-se as moléculas de celulose e reduzem a acessibilidade das enzimas celulolíticas (HIMMEL et al., 2007). Além disso, Qing e Wyman (2010) mostraram que xilo-oligômeros liberados durante o tratamento enzimático de xilana também podem inibir as celulasas. No presente estudo, foi observado que nas amostras de medula havia vasos e fibras parcialmente deslignificados, o que também pode ter contribuído para os valores máximos de conversão de celulose entre 63 e 66%.

As amostras de córtex mostraram comportamento distinto quanto à hidrólise enzimática dos materiais tratados (Figura 26). O tratamento dessa fração com clorito de sódio em meio ácido resultou na remoção considerável de ácidos hidroxicinâmicos e de lignina (Figura 24). A remoção desses componentes aumentou substancialmente os valores de conversão enzimática de celulose e de xilana.

Figura 25 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) nas amostras de medula tratadas com clorito de sódio em meio ácido. (-♦-) Amostra não tratada, (-■-) tratada por 1 hora e (-▲-) tratada por 2 horas

Figura 26 - Conversão de celulose (A) e de xilana (B) nas amostras de córtex tratadas com clorito de sódio em meio ácido. (- ◆ -) Amostra não tratada, (- ● -) tratada por 1 hora, (- ▲ -) tratada por 2 horas e (- ■ -) tratada por 4 horas.

A conversão de celulose apresentou uma correlação negativa com os compostos aromáticos nos vários tipos celulares do córtex. Uma estimativa do teor de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos em cada tipo celular foi feita a partir dos valores de absorbância a 280 e 315 nm (Figura 27) O Apêndice C mostra os valores de absorbância dos tipos celulares em córtex e medula tratados. No córtex, a conversão de celulose foi sempre maior nas amostras com menor conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos (Figura 27A) A correlação entre os dados de absorbância a 280 nm e a conversão de celulose mostrou um bom ajuste

linear, exceto para células de parênquima de córtex, para as quais o valor de r^2 foi 0,655 (Figura 30B). A correlação entre o teor de lignina e a conversão de celulose também foi alta ($r^2 = 0,83$) (Figura 27C), refletindo a média ponderada das absorvâncias a 280 nm para cada tipo celular. A correlação inversa entre o teor de lignina ou absorvância devido à presença de compostos aromáticos com a conversão de celulose está de acordo com o que foi observado por Grabber, Panciera e Hatfield (2002), hidrolisando fibras de alfafa maduras e imaturas, Jung e Casler (2006), com caules de milho em diversos estágios de maturação, Chen e Dixon (2007), com alfafa transgênica, Lee et al. (2009) em madeira deslignificada com líquidos iônicos e Mendes et al. (2011), com bagaço de cana pré-tratado com sulfito-alcálico. No presente estudo, não foram feitas as correlações com as amostras de medula, já que a fração não tratada foi prontamente hidrolisada (63-66%) e não houve aumento de conversão com a remoção de lignina.

Figura 27 – Correlação entre a conversão de celulose com as absorvâncias a (A) 315 nm e (B) 280 nm e com (C) o teor de lignina, após 48 horas de hidrólise das amostras de córtex. (▲) Vasos, (■) fibras e (◆) células de parênquima.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pôde-se concluir que o tratamento com clorito em meio ácido é um método eficaz para a remoção de lignina, apesar de ter sua seletividade reduzida em tempos maiores de tratamento. No entanto, é um tratamento importante para produzir materiais modelos com teores reduzidos de lignina, com pouca alteração dos demais constituintes.

Os bagaços com menores teores de lignina foram mais facilmente hidrolisáveis que os bagaços com mais lignina, indicando que quanto menor o teor desse componente, mais fácil é a conversão dos polissacarídeos.

A maior taxa de conversão ocorreu nas primeiras horas de hidrólise, de forma que a quantidade de açúcares liberados com 72 horas não foi consideravelmente maior que com 24 horas de hidrólise.

Com a presença de β -glicosidase, a conversão de celulose e de xilana aumentaram, evidenciando que as celobiasas são importantes para reduzir o efeito inibitório da celobiose. Além disso, na hidrólise conduzida com celobiasas, a remoção de 60% da lignina é suficiente para a conversão total de celulose.

A adição de lignina ao cartão de celulose não resultou em redução na conversão de polissacarídeos, uma evidência de que o principal efeito na limitação da hidrólise pela lignina está na redução da acessibilidade das enzimas hidrolíticas.

Os espectros ultravioletas das amostras de córtex e medula de cana-de-açúcar mostraram que os maiores valores de absorbância ocorrem em vasos, seguidos pelas fibras e células de parênquima. Em células de parênquima, a absorção principal ocorreu em 315 nm, indicando o elevado teor de ácidos hidroxicinâmicos nas paredes dessas células.

As amostras de medula não tratadas foram prontamente hidrolisadas pelas celulasas, indicando que as células de parênquima predominantes nessa região são menos recalcitrantes que os vasos e fibras, predominantes na região de córtex.

O tratamento com clorito de sódio em meio ácido não contribuiu para o aumento da conversão de celulose e de xilana em células de medula. No entanto, a remoção de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos da região de córtex por esse tratamento resultou em um aumento considerável da conversão de polissacarídeos.

Houve uma correlação inversa entre a conversão de celulose e o teor de lignina e absorbância em 280 e 315 nm no córtex, novamente indicando que quanto menor o teor de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos, maior a conversão de polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

- AHLGREN, P.A.; GORING, D.A.I. Removal of Wood components during chlorite delignification of black spruce. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 1272-1275, 1971.
- AKIN, D.E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 17-25, 1989.
- AKIN, D.E. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. **Biofuels, Bioproducts, Biorefining**, v. 2, p. 288-303, 2008.
- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270.
- BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.V.; PETERNELLI, L.A.; BRESSIANI, J.A.; SILVEIRA, L.C.I.; SILVA, F.L.; FIGUEIREDO, I.C.R. Use of REML/BLUP for the selection of sugarcane families specialized in biomass production. **Crop breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 218-226, 2004.
- 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.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 163-170, 2005.
- BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase, and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198-209, 2006.
- BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BHAT, MK; HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in farm animal nutrition**, 1st ed., Oxfordshire, UK: CAB International, 2001. Cap. 2, p. 11-60.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BÖRJESSON, J.; PETERSON, R.; TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 754-762, 2007.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 120-130, 2009.

BROWNING, B. **Methods of wood chemistry**. New York: Wiley, 1967.

BURANOV, A.U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237-259, 2008.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 109-112, 2002.

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

CASLER, M.D.; JUNG, H.G. Selection and evaluation of smooth bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration. **Crop Science**, v. 39, p. 1866-1873, 1999.

CERQUEIRA, F.M.; RODRIGUES FILHO, G.; MEIRELES, C.S. Optimization of sugarcane bagasse acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 579-582, 2007.

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

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

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**, Brasília, DF, 2011.

DAVIES, G. HERISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.

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

DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P. Método para determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1634-1639, 2002.

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

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

DONALDSON, L.A. Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. **Wood Science and Technology**, v. 28, p. 111-118, 1994.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859-873, 2001.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1976.

EDGAR, K.J.; BUCHANAN, C.M.; DEBENHAM, J.S.; RUNDQUIST, P.A.; SEILER, B.D.; SHELTON, M.C.; TINDALL, D. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1605-1688, 2001.

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

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

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

FORD, C.W. Comparative structural studies of lignin-carbohydrate complexes from *Digitaria decumbens* (pangola grass) before and after chlorite delignification. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 101-117, 1986.

FROMM, J.; ROCKEL, B.; LAUTNER, S.; WINDEISEN, E.; WANNER, G. Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. **Journal of Structural Biology**, v. 143, p. 77-84, 2003.

FU, D.; MAZZA, G.; TAMAKI, Y. Lignin extraction from straw by ionic liquids and enzymatic hydrolysis of the cellulosic residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2915-2922, 2010.

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

GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 193-200, 1998.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D. Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2609-2614, 1998.

GRABBER, J.H.; RALPH, J. LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 455-465, 2004.

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, p. 820-831, 2005.

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

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

HALLAC, B.B.; RAY, M.; MURPHY, R.J.; RAGAUSKAS, A.J. Correlation between anatomical characteristics of ethanol organosolv pretreated *Buddleja davidii* and its enzymatic conversion to glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 795-801, 2010.

HANSEN, M.A.T.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) – the impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic acessibility. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2804-2811, 2011.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 403-407, 1999.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 10, p. 435-459, 1990.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in Monocotyledons. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugar cane and rice plant studied bu ultraviolet microscopic spectrometry. **Holzforschung**, v. 45, p. 191-198, 1991.

HENRIKSSON, H.; STÅHLBERG, J.; ISAKSSON, R.; PETTERSSON, G. The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **FEBS Letters**, v. 390, p. 339-344, 1996.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**, 1st ed. Berlin: De Gruyter, 2009, cap. 6, p. 121-145.

HIMMEL, M.E.; ADNEY, W.S.; BAKER, J.O.; ELANDER, R.; MCMILLAN, J.D.; NIEVES, R.A.; SHEEHAN, J.J.; THOMAS, S.R.; VINZANT, T.B.; ZHANG, M. Advanced bioethanol production Technologies: a perspective. In: SAHA, B.C.;

WOODWARD, J. **Fuels and Chemicals from Biomass**. Washington, DC, 1997. Cap 1, p. 2-45, ACS Symposium Series.

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

HU, W.; HARDING, S.A.; LUNG, J.; POPKO, J.; RALPH, J.; STOKKE, D.D.; TSAI, C.; CHIANG, V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 808-812, 1999.

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

IGARASHI, K.; KOIVULA, A.; WADA, M.; KIMURA, S.; PENTTILÄ, M.; SAMEJIMA, M. High speed atomic force microscopy visualises processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on cristaline cellulose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 36186-36190, 2009.

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

JØRGENSEN, H.; VIBE-PEDERSEN, J.; LARSEN, J.; FELBY, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 862-870, 2006.

JUNG, H.G.; CASLER, M.D. Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. **Crop Science**, v. 46, p. 1801-1809, 2006.

KADLA, J.F. Cellulose structure: a review. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 34, p. 197-216, 2000.

KATZ, M.; REESE, E.T. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 419-420, 1967.

KEITH, E.A.; COLENBRANDER, V.F.; LECHTENBERG, V.L.; BAUMAN, L.F. Nutritional Value of Brown Midrib Corn Silage for Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Sciences**, v. 62, p. 788-792, 1979.

KILPELÄINEN, I.; XIE, H.; KING, A.; GRANSTROM, M.; HEIKKINEN, S.; ARGYROPOULOS, D.S. Dissolution of wood in ionic liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9142-9148, 2007.

KIM, J.S.; LEE, K.H.; CHO, C.H.; KOCH, G.; KIM, Y.S. Micromorphological characteristics and lignin distribution in bamboo (*Phyllostachys pubescens*) degraded by the white rot fungus *Lentinus edodes*. **Holzforschung**, v. 62, p. 481-487, 2008.

KIRK, T.K.; MOORE, W.E. Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood. **Wood and Fiber Science**, v. 4, p. 72-79, 1972.

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

KLYOSOV, A.A., RABINOVICH, M.L., CHERNOGLAZOV, V.M., NGUEN V.V., BEREZIN, I.V. The Effectiveness of Adsorption of Cellulolytic Enzymes as a Factor Which Determines the Reactivity of Insoluble (Crystalline) Cellulose. **Proceedings. Academy of Sciences of the URSS**, v. 260, p. 1481-1486, 1981.

KOCH, G.; KLEIST, G. Application of scanning UVmicrospectrophotometry to localize lignin and phenolic extratives in plant cell walls. **Holzforschung**, v. 55, p. 1-5, 2001.

KOCH, G.; Topochemical characterization of lignins and phenolic extratives in wood cell walls. **Lenzinger Berichte**, v. 83, p. 6-12, 2004.

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

LEVAN, S.L.; ROSS, R.J.; WINANDY, J.E. **Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures**. Madison, WI: U.S. Department of agriculture, Forest service, Forest Products Laboratory, 1990. P. 24, Research Paper FPL-RP-498.

LEVINE, S.E.; FOX, J.M.; BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 37-51, 2010.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 455-496, 1990.

LIGRONE, R.; CARAFA, A.; DUCKETT, J.G.; RENZAGLIA, K.S.; RUEL, K. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and charalean alga *Nitella*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 270, p. 257-272, 2008.

LORA, J.H.; GLASSER, W.G. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 10, p. 39-48, 2002.

LYBEER, B.; KOCH, G. Lignin distribution in the tropical bamboo species *Gigantochloa levis*. **IAWA Journal**, v. 26, p. 443-456, 2005.

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

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

MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 139 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.A.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanical pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395-401, 2011.

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

MILLETT, M.A.; MOORE, W.E.; SAEMAN, J.F. Preparation and properties of hydrocelluloses. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 1493-1497, 1954.

MÖLLER, R.; KOCH, G.; NANAYAKKARA, B.; SCHMITT, U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. **Tree Physiology**, v. 26, p. 201-210, 2005.

MOONEY, C.A.; MANSFIELS, S.D.; TOUHY, M.G.; SADDLER, J.N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 113-119, 1998.

MOORE, P.H. Anatomy and morphology. In: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 85-142.

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

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

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

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

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

PEREZ, D.S.; CURVELO, A.S. Selective acetone-water delignification of *Eucalyptus urograndis*: an alternative towards the biorefinary process. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, p. 145-152, 2010.

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

PU, Y.; JIANG, N.; RAGAUSKAS, A.J. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 27, p. 23-33, 2007.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9624-9630, 2010.

RALPH, J.; GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 167-178, 1995.

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

ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, J.K.C.; JONES, T.A. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 249, p. 380-386, 1990.

SELMAN-HOUSSEIN, G.; LOPEZ, M.A.; RAMOS, O.; CARMONA, E.R.; ARENCIBIA, A.D.; MENENDEZ, E.; MIRANDA, F. Towards the improvement of sugarcane bagasse as raw material for the production of paper pulp and animal feed. **Developments in Plant Genetics and Breeding**, v. 5, p. 189-193, 2000.

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

SIPOS, B.; DIENES, D.; SCHLEICHER, A.; PERAZZINI, R.; CRESTINI, C.; SIIKA-AHO, M.; RÉCZEY, K. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 84-90, 2010.

SIQUEIRA, G.A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p.1-9, 2011.

STONE, J.E.; SCALLAN, A.M.; DONEFER, E.; AHLGREN, E. Digestibility as a simple function of a molecule of a similar size to a cellulase enzyme. In: HAJNY, G.J.; REESE, E.T. **Cellulases and their applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1969. Cap. 13, p. 219-241.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; FOWLER, P. BAIRD, M.S. Inhomogeneities in chemical structure of sugarcane bagasse lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6719-6725, 2003.

SUN, X.F.; SUN, R.C.; FOWLER, P.; BAIRD, M.S. Isolation and characterization of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 379-391, 2004.

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

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

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupencillium javanicum*: Studies on the re-utilization of cellulosic resources(VII). **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 177-183, 1981.

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

VLEET J.H.; JEFFRIES, T.W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 300-306, 2009.

WENDE, G.; FRY, S.C. *O*-Feruloylated, *O*-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1011-1018, 1996.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGS, S. T. **Methods in enzymology**. London: Academy Press, 1988, cap. 9, p. 87-112.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D.J.; SADDLER J.N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1115-1126, 2004.

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.

YEH, A.; HUANG, Y.C.; CHEN, S.H. Effect of the particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 192-199, 2010.

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

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

ZHU, L.; O'DWYER, J.P.; CHANG, V.S.; GRANDA, C.B.; HOLTZAPPLE. M.T. Structural features affecting biomass digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817-3828, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Conversão de celulose e xilana nos ensaios conduzidos com celulases de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 com diferentes teores de sólidos.

Tabela A1 – Conversão de celulose e xilana nos bagaços de cana hidrolisados a 2% de consistência.

	Teor de lignina (%)	Conversão (%)		
		24 horas	48 horas	72 horas
Celulose	22,8	14,9	21,5	26,1
	14,7	21,6	34,1	52,4
	9,4	56,0	66,6	78,7
	7,7	68,7	84,7	81,1
	6,8	61,3	78,3	84,0
Xilana	22,8	5,5	8,0	7,2
	14,7	17,7	24,5	29,9
	9,4	30,1	34,6	48,0
	7,7	39,9	48,4	49,0
	6,8	35,8	44,3	50,6

Tabela A2 – Conversão de celulose e xilana nos bagaços de cana hidrolisados a 5% de consistência.

	Teor de lignina (%)	Conversão (%)		
		24 horas	48 horas	72 horas
Celulose	22,8	18,7	17,5	18,6
	14,7	46,8	51,2	50,3
	9,4	62,6	73,1	71,2
	7,7	63,9	78,0	80,7
	6,8	67,0	83,4	82,0
Xilana	22,8	8,0	8,8	8,9
	14,7	26,9	30,7	40,0
	9,4	39,7	45,0	44,6
	7,7	42,7	49,7	52,2
	6,8	43,4	52,3	52,2

Tabela A3 – Conversão de celulose e xilana nos bagaços de cana hidrolisados a 10% de consistência.

	Teor de lignina (%)	Conversão (%)		
		24 horas	48 horas	72 horas
Celulose	22,8	5,5	8,0	7,2
	16,9	43,0	44,5	40,9
	14,7	17,7	24,5	29,9
	9,4	30,1	34,6	48,0
	7,7	39,9	48,4	49,0
	6,8	35,8	44,3	50,6
Xilana	22,8	9,4	11,0	4,1
	16,9	29,6	32,2	31,5
	14,7	44,9	51,2	56,2
	9,4	45,1	51,4	56,4
	7,7	48,1	53,5	63,8
	6,8	41,1	60,3	63,6

APENDICE B – Conversão de celulose e xilana nos ensaios conduzidos com celulasas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 suplementados com β -glicosídeos de *Aspergillus niger*, a 2% de consistência.

Tabela B1 – Conversão de celulose e xilana nos diferentes tempos de hidrólise.

	Teor de lignina (%)	Conversão (%)				
		4 horas	8 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Celulose	22,8	11,0	15,9	15,5	20,1	24,8
	16,9	27,9	46,0	51,7	61,5	65,8
	14,7	30,7	47,3	51,7	65,4	70,0
	9,4	40,7	59,9	72,9	93,9	92,0
	7,7	41,5	71,2	89,2	100,0	98,1
	6,8	49,2	76,4	91,1	99,0	99,0
Xilana	22,8	5,6	8,6	9,6	13,4	17,2
	16,9	19,1	30,8	36,2	44,5	49,8
	14,7	14,6	32,4	36,0	47,0	52,2
	9,4	33,3	45,5	54,0	70,9	71,8
	7,7	26,0	61,1	72,4	82,5	83,4
	6,8	41,9	54,6	72,9	81,3	83,8

Tabela B2 – Comparativo da hidrólise conduzida a 2% de consistência com e sem suplementação com β -glicosidase.

Teor de lignina (%)	Conversão (%)			
	Sem β -glicosidase		Com β -glicosidase	
	Celulose	Xilana	Celulose	Xilana
23,2	21,9	10,7	24,8	17,2
20,1	57,1	38,0	70,0	52,2
15,3	81,4	56,9	92,0	71,8
9,1	89,3	71,0	98,1	83,4
11,1	88,2	65,2	99,0	83,8

APENDICE C – Valores de absorvância a 280 e 315 nm de vasos, fibras e células de parênquima de córtex e medula tratados com clorito de sódio.

Tabela C1 – Absorvância dos tipos celulares de córtex a 280 e 315 nm tratados com clorito de sódio.

Tempo de tratamento (h)	Absorvância a 280 nm			Absorvância a 315 nm		
	Vasos	Fibras	Células de parênquima	Vasos	Fibras	Células de parênquima
0	0,418	0,357	0,208	0,490	0,400	0,305
1	0,246	0,220	0,200	0,19	0,135	0,146
2	0,089	0,084	0,092	0,023	0,000	0,032

Tabela C2 – Absorvância dos tipos celulares de medula a 280 e 315 nm tratados com clorito de sódio.

Tempo de tratamento (h)	Absorvância a 280 nm			Absorvância a 315 nm		
	Vasos	Fibras	Células de parênquima	Vasos	Fibras	Células de parênquima
0	0,363	0,321	0,113	0,360	0,353	0,145
1	0,247	0,135	0,080	0,120	0,067	0,037