



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO  
CLARO



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

---

**REMOÇÃO DE LIGNINA E HEMICELULOSE: INFLUÊNCIA NA  
ACESSIBILIDADE À CELULOSE E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

**FELIPE LANGE SHIMIZU**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

**Rio Claro - 2018**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

---

**REMOÇÃO DE LIGNINA E HEMICELULOSE: INFLUÊNCIA NA  
ACESSIBILIDADE À CELULOSE E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

**FELIPE LANGE SHIMIZU**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

**Rio Claro - 2018**

333.79 Shimizu, Felipe Lange  
S556r Remoção de lignina e hemicelulose: influência na  
acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática / Felipe  
Lange Shimizu. - Rio Claro, 2018  
73 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Michel Brienzo

1. Energia – Fontes alternativas. 2. Biomassa. 3.  
Bioenergia. 4. Pré-tratamento. 5. Hidrólise. 6. Corantes. I.  
Título.



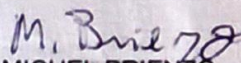
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

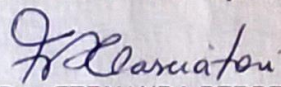
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** REMOÇÃO DE LIGNINA E HEMICELULOSE INFLUENCIA NA ACESSIBILIDADE À CELULOSE E DIGESTIBILIDADE ENZIMÁTICA

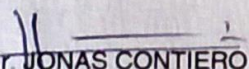
**AUTOR:** FELIPE LANGE SHIMIZU

**ORIENTADOR:** JONAS CONTIERO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. MICHEL BRIENZO  
Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia

  
Profa. Dra. FERNANDA PERPETUA CASCIATORI  
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2018

**Título alterado para: "REMOÇÃO DE LIGNINA E HEMICELULOSE: INFLUÊNCIA NA ACESSIBILIDADE À CELULOSE E NA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA"**

## **AGRADECIMENTOS**

A meu orientador, Prof. Dr. Michel Brienzo, por todo o apoio, atenção, confiança e paciência que teve comigo nos últimos anos.

Ao Gabriel, pela parceria no trabalho e por tudo que me ensinou e suportou durante esse mestrado.

A todos os meus amigos, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis que passaram. Sem eles não teria conseguido.

Aos meus pais e ao meu avô, por acreditarem nas minhas decisões e por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada pela oportunidade.

Ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia, pelo uso dos laboratórios.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, pelo uso dos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança e uso dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, pela confiança e uso dos equipamentos.

A Dr<sup>a</sup>. Luciana Coelho e a Ana María, pela ajuda com os experimentos.

## RESUMO

A biomassa lignocelulósica, como a proveniente da cana-de-açúcar, é uma fonte abundante de resíduo que pode ser usado como matéria-prima na produção de energia. Para melhor aproveitar essa biomassa, moagem e pré-tratamentos podem ser usados para alterar a estrutura do material lignocelulósico, remover lignina e hemicelulose, expondo a celulose e assim aumentando sua acessibilidade. A acessibilidade à celulose tem sido indicada como uma das propriedades mais importantes para uma boa digestibilidade enzimática. Entretanto, as biomassas geradas da cana-de-açúcar possuem características físico-químicas diferentes, respondendo de modo diferente aos pré-tratamentos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da remoção de lignina e hemicelulose das biomassas da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha) na acessibilidade à celulose. A cana-de-açúcar foi fracionada em fração externa, nó, entrenó e folha. Cada fração passou pelos pré-tratamentos ácido (5, 10, 20 %, m/m massa de ácido por massa de material, a 121°C/30 min), alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) e oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 horas com clorito de sódio 30 %). As amostras foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina. A determinação de acessibilidade foi realizada com corantes Direct, Orange (superfície específica externa), Direct Blue (superfície específica interna) e Vermelho Congo (superfície total). A hidrólise enzimática (15 FPU/g de material, Cellic Ctec 2 - Novozymes) foi realizada para avaliar o efeito dos pré-tratamentos e acessibilidade à celulose no rendimento em glicose. O efeito dos pré-tratamentos foi primeiramente analisado pela quantidade de massa recuperada. Todas as frações estudadas apresentaram uma tendência em perder massa com aumento da concentração de reagente utilizado no pré-tratamento. O pré-tratamento ácido resultou em menor recuperação de massa, o que ocorreu em função da solubilização de hemicelulose. A caracterização química apontou a remoção de hemicelulose e principalmente lignina dos materiais em função do pré-tratamento e das suas condições. A deslignificação com clorito de sódio (oxidativo) resultou em remoção de lignina, chegando a quase a sua totalidade em materiais como a folha. A determinação de acessibilidade com os corantes Vermelho Congo, Direct Blue e Direct Orange indicaram que o aumento da concentração de reagentes no pré-tratamento provoca aumento de acessibilidade à celulose. Entretanto, os corantes Direct Orange e Blue foram mais precisos na determinação da acessibilidade à celulose em comparação ao Vermelho Congo. A fração de menor recalcitrância, entrenó, apresentou adsorção de 525,9 mg/g no ensaio com Vermelho congo, o Direct Orange 1333,3 mg/g e o Direct Blue 746,3 mg/g. O rendimento em glicose na hidrólise enzimática seguiu a tendência de melhora com aumento da acessibilidade. Do mesmo modo, a remoção de lignina resultou em maior rendimento em glicose na hidrólise enzimática, o entrenó deslignificado resultou na quase completa conversão da celulose em glicose. Este estudo identificou a fração externa como mais recalcitrante, e entrenó como menos recalcitrante, resultando em menor rendimento e maior de glicose na hidrólise enzimática, respectivamente. A remoção de hemicelulose e lignina por meio de pré-tratamentos influenciou diretamente na acessibilidade à celulose, resultando em melhor ação das enzimas na hidrólise enzimática de todas as frações.

**Palavras-chave:** acessibilidade, pré-tratamento ácido diluído, pré-tratamento alcalino, pré-tratamento oxidativo, hidrólise enzimática, Vermelho Congo.

## ABSTRACT

The lignocellulosic biomass, such as the provided by the sugarcane, is an abundant source of raw materials for energy production. In order to better use this biomass, milling and pretreatments can be employed to alter the structure of the materials, remove lignin and hemicellulose. This effect exposes the cellulose and raises its accessibility, which is one of the most important property to ensure enzymatic digestibility. However, the biomass generated from the sugarcane have different physicochemical characteristics, giving different responses to the pretreatments. In this context, this study aimed to verify the effects of lignin and hemicellulose removal from the sugarcane biomass (external fraction, node, internode and leaf) on cellulose accessibility. The sugarcane was fractioned in external fraction, node, internode and leaf. Each fraction was pretreated with acid (5, 10, 20 % m/m acid mass per material mass, at 121°C/30 min), alkaline (5, 10, 20, 30 % NaOH m/m) oxidative (0,5, 1, 2, 3 h charged with 30 % sodium chlorite). The chemical composition of the samples was determined based on cellulose, hemicellulose and lignin contents. Accessibility was determined by dye adsorption of Direct Orange (external specific surface), Direct Blue (internal specific surface) and Congo Red (total surface). Enzymatic hydrolysis (15 FPU/g of biomass, Cellic Ctec 2 – Novozymes) was used to verify the effects of pretreatments and cellulose accessibility on the glucose yield. All studied fractions showed tendency to lose mass with increasing reagent concentrations used in the pretreatments. Acid pretreatment resulted in low mass recovery due to hemicellulose solubilization. Chemical composition showed hemicellulose removal and significant lignin removal from the materials due to the pretreatments and their conditions. Delignification by sodium chlorite (oxidative) resulted in lignin removal, with almost completely removal with leaf samples. Accessibility determined by Congo Red, Direct Orange and Direct Blue dyes indicated that more aggressive pretreatments improved cellulose accessibility. However, Direct Orange and Direct Blue dyes were more precise than Congo Red while evaluating cellulose accessibility. The less recalcitrant fraction, the internode, showed 525,9 mg/g of Congo Red adsorption, 1333,3 mg/g of Direct Orange and 746,3 mg/g of Direct Blue. Glucose yield during enzymatic hydrolysis improved with higher cellulose accessibility. Lignin removal resulted in higher glucose yield, with delignified internode samples showing almost complete cellulose conversion. This study identified the external fraction as the most recalcitrant and the internode as the least recalcitrant, resulting in lower glucose yield and higher glucose yield, respectively. Hemicellulose and lignin removal by the pretreatments directly influenced cellulose accessibility, resulting in better enzymatic activity across all fractions.

**Keywords:** accessibility, diluted acid pretreatment, alkaline pretreatment, oxidative pretreatment, enzymatic hydrolysis, Congo Red.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
2.1. Objetivos específicos.....	8
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
3.1. Material Lignocelulósico.....	9
3.2. A parede celular vegetal.....	12
3.3. Celulose.....	13
3.4. Hemicelulose (ou polioses) .....	15
3.5. Lignina.....	16
3.6. Acessibilidade.....	18
3.7. Determinação da acessibilidade.....	20
3.8. Pré-tratamentos e seu efeito na acessibilidade à celulose.....	22
3.9. Hidrólise enzimática da celulose.....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Obtenção do material e separação em frações.....	31
4.2. Pré-tratamento alcalino.....	31
4.3. Pré-tratamento oxidativo.....	31
4.4. Pré-tratamento ácido.....	32
4.5. Determinação da acessibilidade à celulose.....	32
4.5.1. Corantes Direct Orange e Direct Blue.....	33
4.5.2. Corante Vermelho Congo.....	33
4.6. Hidrólise enzimática.....	34
4.7. Caracterização Química da biomassa <i>in natura</i> e pré-tratada.....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1. Recuperação de massa.....	35
5.2. Caracterização Química das amostras.....	38
5.3. Acessibilidade à celulose.....	44
5.3.1. Determinação da acessibilidade com Vermelho Congo.....	44
5.3.2. Determinação da acessibilidade com Direct Orange e Blue (Simons' Stain) .....	48
5.4. Hidrólise enzimática.....	52
5.5. Características e propriedades dos materiais.....	56
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59



## 1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um abundante resíduo lignocelulósico gerado pela atividade agrícola, com destaque em países tropicais (FERNANDES et al., 2017). Espera-se que cerca de 585 milhões de toneladas de cana-de-açúcar sejam gerados em 2018 no Brasil (UNICA, 2018). Devido à sua importância como resíduo agroindustrial, há interesse em desenvolver métodos para a produção de biocombustíveis e outros insumos com valor agregado (ADSUL et al., 2004).

O bagaço de cana-de-açúcar é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Estes componentes estão organizados na parede celular vegetal, sendo que presença de lignina e hemicelulose na matriz lignocelulósica dificulta a degradação do material e diminui a acessibilidade à celulose, propriedade chamada de recalcitrância (ZHAO et al., 2012). A lignina é responsável por conferir rigidez a planta, colaborando com sua integridade estrutural (BOZELL et al., 2007; MIEDES et al., 2014). Intimamente associada à celulose está a hemicelulose, conectada por ligações de hidrogênio (FREUDENBERG, 1965). A celulose, pura ou isolada, possui propriedades que dificultam a hidrólise, como cristalinidade e alto grau de polimerização (NADERI, 2017). A conversão da celulose é dificultada devido às propriedades do material lignocelulósico, tornando desafiadora a sua conversão em bioetanol e moléculas de alto valor agregado. A organização da parede celular vegetal mantém a celulose protegida, com baixa acessibilidade à ação de enzimas. Para o sucesso do processo de hidrólise enzimática da celulose, é necessário que a celulose esteja exposta, acessível a ação de enzimas. A hemicelulose e lignina agem como barreira protegendo a celulose, sendo necessária sua remoção ou modificação para expor a celulose. O pré-tratamento ácido remove parcialmente a hemicelulose e modifica a estrutura da lignina. A remoção de hemicelulose se dá pela quebra das ligações glicosídicas, enquanto a modificação da lignina se dá por reações de substituição, causando condensação. O pré-tratamento alcalino remove a hemicelulose e lignina, e assim expõe a celulose. A deslignificação com agentes seletivos para lignina também colabora com a exposição da celulose. Esses pré-tratamentos, através de suas reações específicas, expõem a celulose por remover barreiras físicas que a envolvem, aumentando acessibilidade à celulose, facilitando o acesso de enzimas.

Sabe-se que a remoção de hemicelulose e lignina aumenta a acessibilidade à celulose. Entretanto, não está claro a contribuição das diferentes frações da biomassa de cana-de-açúcar (entrenó, nó, fração externa e folha) na remoção de tais componentes, para garantir o sucesso da etapa de hidrólise enzimática. A fim de avaliar a influência da remoção da

lignina e da hemicelulose na acessibilidade à celulose, este trabalho utilizou pré-tratamentos com ácido diluído (remoção de hemicelulose), hidróxido de sódio (remoção de hemicelulose e lignina) e clorito de sódio (remoção de lignina). Este efeito foi avaliado nas frações de entrenó, nó, fração externa e folha da cana-de-açúcar. A acessibilidade à celulose foi determinada nos materiais pré-tratados utilizando corantes como Direct Orange (superfície específica externa da celulose), Direct Blue (superfície específica interna da celulose) e Vermelho Congo (superfície total).

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo teve como objetivo determinar o efeito de pré-tratamentos que removem/modificam hemicelulose e lignina nas diferentes frações da biomassa de cana-de-açúcar, e sua influência na acessibilidade à celulose.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito dos pré-tratamentos ácido, alcalino e oxidativo na remoção de hemicelulose e lignina das frações da biomassa de cana-de-açúcar (entrenó, nó, fração externa e folha);
- Avaliar os efeitos da remoção de lignina e hemicelulose na acessibilidade à celulose utilizando os corantes Direct Orange, Blue e Vermelho Congo;
- Avaliar o efeito dos pré-tratamentos na hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar (entrenó, nó, fração externa e folha);

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Material lignocelulósico**

A biomassa lignocelulósica é considerada uma matéria-prima promissora e oferece vantagens por ser abundante e barata no contexto da produção de etanol (BROWN et al., 2017). Entretanto, existem alguns problemas tecnológicos que precisam ser resolvidos para sua exploração em potencial, em escala industrial. Este material é composto por hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas e principalmente celulose, que chega a compor 30 % e 40 % das paredes celulares primária e secundária, respectivamente (Figura 1) (MENG et al., 2014; ZHAO et al., 2011). A lignina é uma macromolécula complexa de compostos polifenólicos em uma estrutura tridimensional que parcialmente encapsula os polissacarídeos nas paredes celulares de plantas (DAVISON et al., 2013). Por outro lado, hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos ramificados e amorfos, exibindo baixa recalcitrância comparada com a lignina (DAVISON et al., 2013). Porém, estas macromoléculas estão altamente organizadas na parede celular vegetal, o que confere alta recalcitrância a essa biomassa (SANT'ANNA et al., 2014).

O material lignocelulósico destinado a produção de etanol pode ser dividido em seis grupos: resíduos de cultivo (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e polpa), madeira dura, madeira mole (pinheiro), dejetos celulósicos (papel de jornal, papel de escritório e papel reciclado), biomassa herbácea e resíduos sólidos urbanos (CARDONA et al., 2009). Todos esses materiais contêm celulose em sua composição, e, portanto, apresentam interesse como matéria-prima para processos que tem a glicose como substrato para fermentação.

O bagaço é resíduo da extração do suco (sacarose) da cana-de-açúcar durante a produção de açúcar ou álcool. Dentre esses países encontra-se o Brasil, com uma grande produção de açúcar e etanol (BEZERRA et al., 2016). Tal produção gera grande quantidade de resíduos, tornando a utilização dessa biomassa para produzir combustíveis e produtos de alto valor agregado uma alternativa interessante para a economia e para o meio ambiente (MORENO et al., 2017).

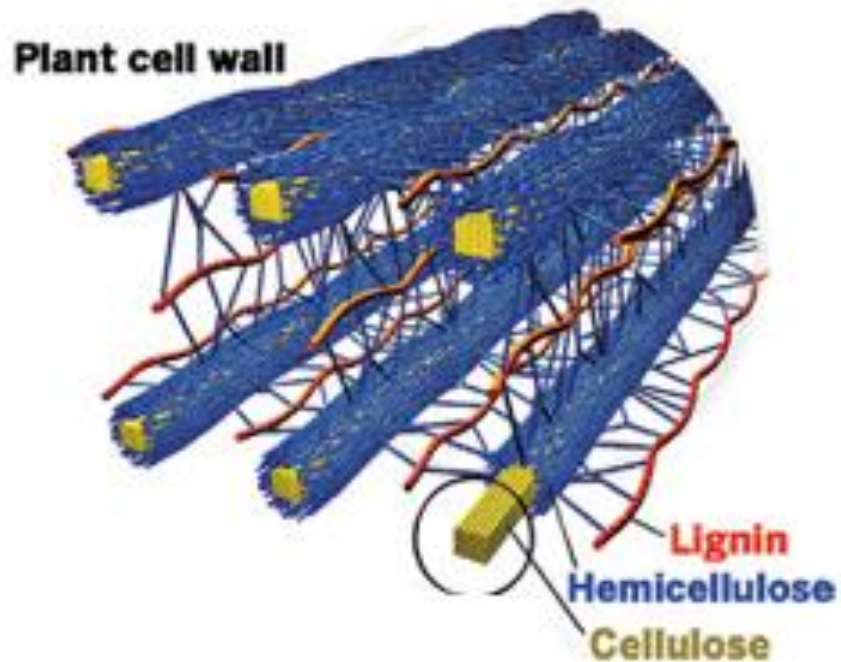
O problema do uso desses materiais para a produção de etanol e produtos de alto valor agregado é a capacidade inata da estrutura química e morfológica da lignocelulose de proteger seus carboidratos contra a ação de microrganismos ou suas enzimas. Esta resistência do material lignocelulósico ao ataque de microrganismos ou agentes químicos é chamada de

recalcitrância (ZHAO et al., 2012). Exemplificando, material lignocelulósico mesmo pré-tratado, se comparado com amido, requer 100 vezes mais enzima para completar a sacarificação (VINZANT et al., 2005).

O fato dos polissacarídeos que compõem o material lignocelulósico terem função estrutural na planta, colabora para recalcitrância do material. Vários fatores têm influência na recalcitrância do material, como a presença de ceras cuticulares e epicuticulares, o arranjo e densidade dos feixes vasculares, a quantidade relativa de tecido esclerenquimatoso, o grau de lignificação, a complexidade e heterogeneidade dos componentes da parede celular, os obstáculos para a ação de enzimas em substratos insolúveis e os fatores nas paredes celulares que podem naturalmente inibir a fermentação ou que são gerados durante os processos de conversão (HIMMEL et al., 2005; SANT'ANNA et al., 2014; WALLACE et al., 2016).

Outro fator que dificulta a conversão por rotas biotecnológicas do material lignocelulósico é a sua heterogeneidade. Usando o colmo de cana-de-açúcar como exemplo, pode-se dividi-lo em diversas frações baseando-se na sua morfologia: fração externa (contendo epiderme), nó e entrenó (BRIENZO et al., 2014; 2016) (Figura 2). Dentre essas frações, a fração externa se mostrou a mais resistente ao pré-tratamento ácido, o qual é um dos pré-tratamentos mais promissores para o uso em escala industrial (CANILHA et al., 2011). Esta característica está relacionada aos tipos celulares que compõem esta fração, uma camada de células rígida e densa na sua extremidade, acompanhada de feixes vasculares (BRODEUR et al., 2011), além de grande quantidade de feixes vasculares próximos a epiderme (BRIENZO et al., 2016). Resumidamente, a epiderme seria uma camada única e alternada de células longas e curtas (MILLER et al., 2012), tendo sua composição variada e dependente do tipo de planta (XU, 2010). A epiderme é uma estrutura impermeável devido à presença de uma parede chamada de cutícula. O entrenó e o nó, frações menos recalcitrantes, são majoritariamente formadas por células de parênquima, a qual tem função de armazenamento e em menor proporção os feixes vasculares (O'BRIEN et al., 1971). Porém, o nó apresenta feixes vasculares em maior número e diâmetro do que o entrenó (BRIENZO et al., 2016). Por fim, a palha é uma fração não provida pelo colmo. Considera-se palha da cana-de-açúcar o topo da planta junto das folhas, posteriormente secos (MORIYA et al., 2007).

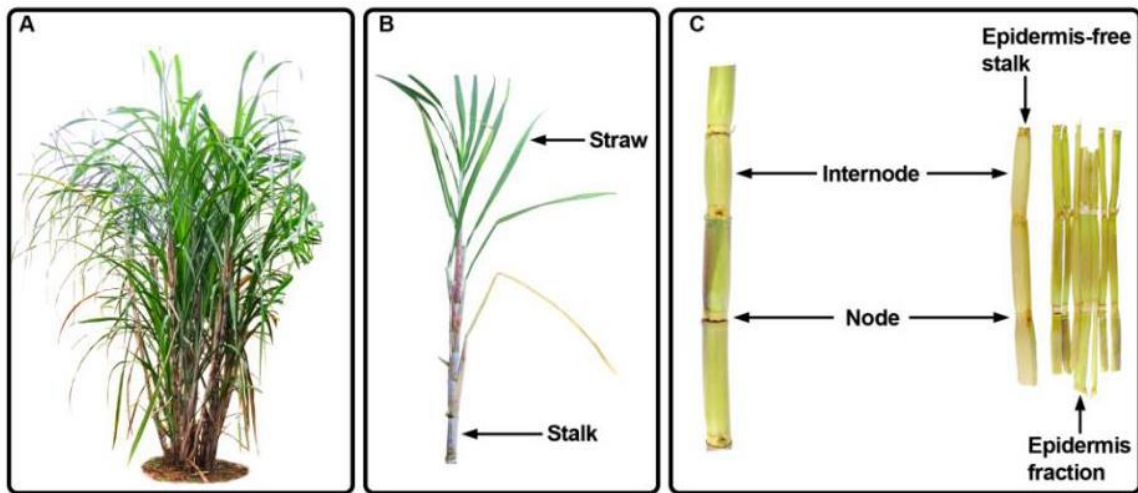
**Figura 1:** Ilustração representando o material lignocelulósico e seus componentes.



(Fonte: Viamahala et al., 2010).

Trabalhos recentes sugerem a utilização de materiais lignocelulósicos providos por espécies como *Cannabis sativa*, capaz de gerar 24 toneladas de biomassa por hectare (KOLARIKOVA et al., 2013) com um ciclo vegetativo de 100 a 120 dias. Esse material pode ser utilizado na produção de um substituto para as fibras de vidro e na geração de um composto similar ao concreto, tendo também aplicações na indústria têxtil (GUERRIERO et al., 2016). Além disso, estudos têm sido feitos na tentativa de se separar os três principais componentes desse material (celulose, hemicelulose e lignina) sem causar degradação que os inutilize, mantendo seu valor de mercado (ALONSO et al., 2017).

**Figura 2:** Ilustração representando as frações (fração externa, nó entrenó e folha) da biomassa da cana-de-açúcar. Onde A é a cana-de-açúcar, B é o bagaço e a palha inteiros e C são as frações do bagaço de cana-de-açúcar.



(Fonte: Sant'anna et al., 2014).

### 3.2. A parede celular vegetal

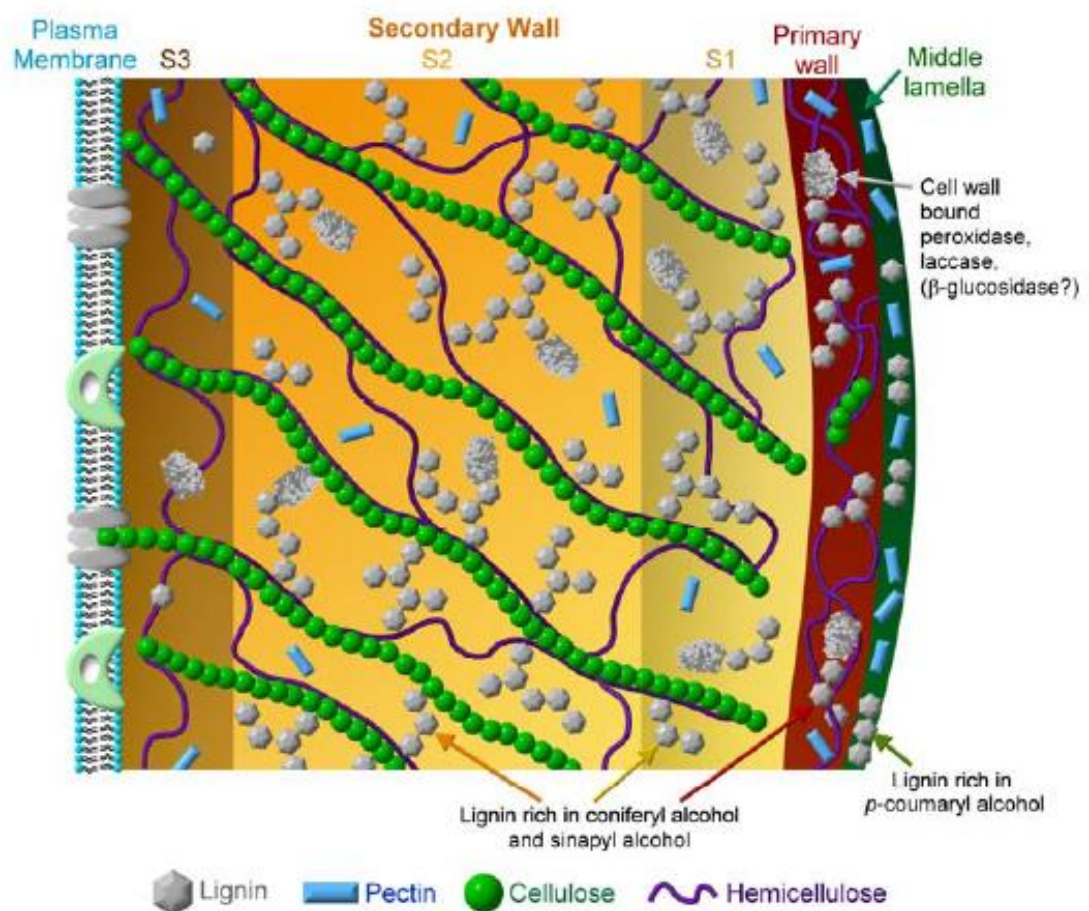
A parede celular vegetal pode ser dividida em três camadas: lamela média, parede primária e parede secundária (Figura 3). A parede primária tem sua estrutura básica formada por um esqueleto de celulose, tendo dois tipos de parede classificados pelos tipos de ligantes. O primeiro tipo é encontrado em dicotiledôneas e possui quantidades iguais de glucana e xiloglucana inseridos em uma matriz de pectina (ZHAO et al., 2011).

O segundo tipo se faz mais presente em cereais e tem glucuroarabinoxilanas como seus ligantes, mas mostra ausência de pectinas e algumas proteínas estruturais (STICKLEN, 2008). A parede secundária é formada por três subcamadas: S1 (camada externa), S2 (camada média) e S3 (camada interna) (CHUNDAWAT et al., 2011). As microfibrilas de celulose da parede secundária estão inseridas em lignina, funcionando comparativamente com uma estrutura contendo “hastes de aço” cobertas por “concreto”, mas mantendo certa flexibilidade (STICKLEN, 2008).

Celulose, hemicelulose, e lignina têm distribuições diferenciadas entre as camadas da parede celular (ZHAO et al., 2011). Nas fibras de madeira, a concentração de celulose aumenta da lamela média para a parede secundária, tendo as regiões S2 (camada média) e S3 (camada interna) como as que possuem as maiores concentrações de celulose (AGARWAL, 2006). As hemiceluloses têm sua distribuição parecida com a celulose, concentrando-se na parede secundária (MCMILLAN, 1994).

Na lamela média (estrutura externa da parede), a lignina se encontra em maior quantidade na porção exterior, tendo sua porcentagem na matriz lignocelulósica diminuída com o aumento da distância em relação a lamela média (ZHAO et al., 2011). Evidência disso é a quantidade significativamente maior de lignina na porção S1 da parede secundária se comparada com as porções S2 e S3 (MCMILLAN, 1994). As extremidades da célula têm as maiores concentrações de lignina, em média (AGARWAL, 2006).

**Figura 3:** Esquema da parede celular vegetal apontando suas camadas e seus componentes.



(Fonte: Achyuthan et al., 2010).

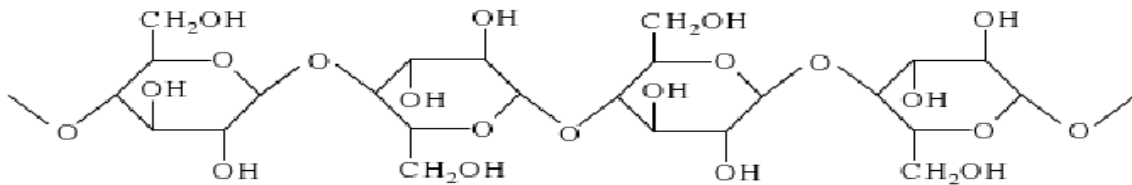
### 3.3. Celulose

A celulose é um carboidrato fibrilar que fornece a estrutura utilizada por todas as plantas superiores (BRETT, 2000), sendo tão abundante no globo que sua biossíntese anual chega a valores entre  $10^{11}$  e  $10^{12}$  toneladas (KUKRETY et al., 2017). Sua cadeia é linear não ramificada, formada por unidades de D-glicose ligadas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (CALIARI et al.,



2017). As moléculas de celulose formam uma rede rígida, resultando a estrutura compacta pela qual é conhecida (Figura 4) (KÖPCKE, 2008).

**Figura 4:** Fragmento de uma cadeia de celulose.

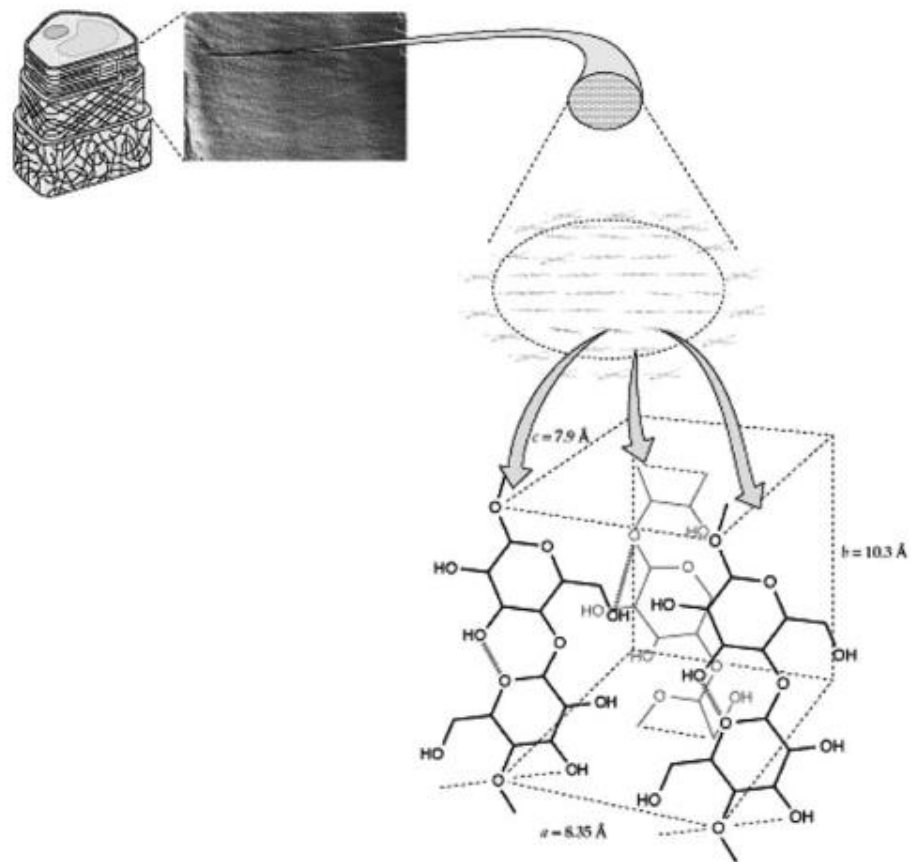


(Fonte: O'Sullivan, 1997)

Nas paredes celulares de plantas a celulose está organizada na forma de longas e organizadas microfibrilas, que resultam em extensas fibras (SOMERVILLE, 2006). A celulose encontra-se associada a outros componentes como hemicelulose, pectina, proteínas e lignina (DAVISON et al., 2013). Em uma visão geral, as moléculas de hemicelulose estruturam as fibras de celulose, e a lignina preenche os espaços entre estes polissacarídeos (Figura 1) (PAGE, 1976).

Uma das propriedades importantes da celulose é a cristalinidade (CALIARI et al., 2017). A celulose possui regiões amorfas e cristalinas com diferentes características. As regiões cristalinas são formadas por microfibrilas, que são arranjos paracristalinos de dezenas de cadeias de (1,4)  $\beta$ -D-glicose unidas por ligações de hidrogênio ao longo do seu comprimento, formando uma cadeia de glicose melhor organizada que as regiões amorfas (Figura 5) (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). A presença das ligações de hidrogênio origina as regiões cristalinas, as quais são mais recalcitrantes, aumentando sua resistência a ação de enzimas e, por consequência, diminuindo a digestibilidade da celulose (ZHU et al., 2008). O método mais utilizado para determinar o grau de cristalinidade do material é a difração de raio-X (ZHAO et al., 2012). As intensidades de difração permitem separar as regiões cristalinas das não-cristalinas (IOELOVICH, 2009).

**Figura 5:** Microfibrila de celulose.



(Fonte: Laureano-Perez et al., 2005).

Outra propriedade importante é o grau de polimerização. A celulose é um carboidrato formado por unidades de glicose, e o número de unidades na cadeia de uma molécula de celulose é o que se chama de grau de polimerização (ZHAO et al., 2012). Um alto grau de polimerização dificulta a ação de enzimas celulolíticas, pois diminui a digestibilidade da celulose oferecendo uma estrutura maior e mais resistente (ZHAO et al., 2012). O grau de polimerização é medido pela viscosidade intrínseca em solução de cuproetilenodiamina (CUEN) (EVANS et al., 1989).

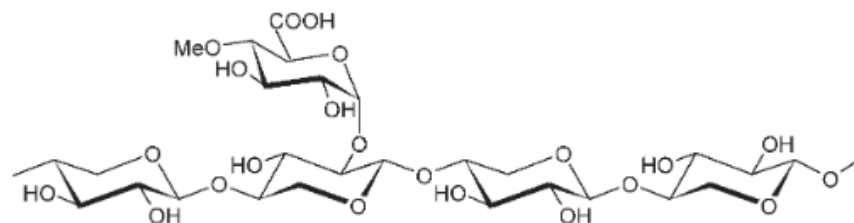
Além de ser utilizada na produção de biocombustíveis, a celulose é empregada na indústria alimentícia, na produção de fibras, cosméticos, aglomerados de madeira, filmes, agentes gelificantes, membranas de papel, adesivos, plásticos, tintas para impressão, revestimentos e nano materiais (GUERRIERO et al., 2016).

### 3.4. Hemicelulose (ou polioses)

Representando até 35 % da massa do material lignocelulósico (TRAJANO et al., 2013), a hemicelulose é uma classe de carboidratos com composição e estrutura variáveis de acordo com o tipo de planta. Mais especificamente, hemiceluloses são polissacarídeos de estrutura amorfa com cadeia ramificada (Figura 6) e podem conter pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -D-galactose) e ácidos urônicos. Além disso, grupos hidroxila nos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila (GÍRIO et al., 2010). Devido à estas características, hemiceluloses oferecem menor resistência à conversão do que a celulose.

Na parede celular vegetal, as cadeias de hemicelulose interagem com as fibrilas de celulose formando ligações não-covalentes. Deste modo, as microfibrilas de celulose estão inseridas em uma matriz de hemiceluloses (DAVISON et al., 2013). Hemiceluloses não são capazes de formar microfibrilas devido à suas ramificações e modificações estruturais (COSGROVE, 2005). No bagaço de cana-de-açúcar, hemiceluloses são compostas por um suporte de xilana onde outros grupos, como ácido glicurônico e arabinose, se ligam (SAAVEDRA et al., 1989).

**Figura 6:** Estrutura representativa de uma molécula de hemicelulose



(Fonte: Ebringerová, 2005).

Hemiceluloses são utilizadas na produção de enzimas, produtos de fermentação como solventes, ração para animais, revestimentos, adesivos, remédios, aditivos plásticos, impressões têxteis e nano partículas (GUERRIERO et al., 2016).

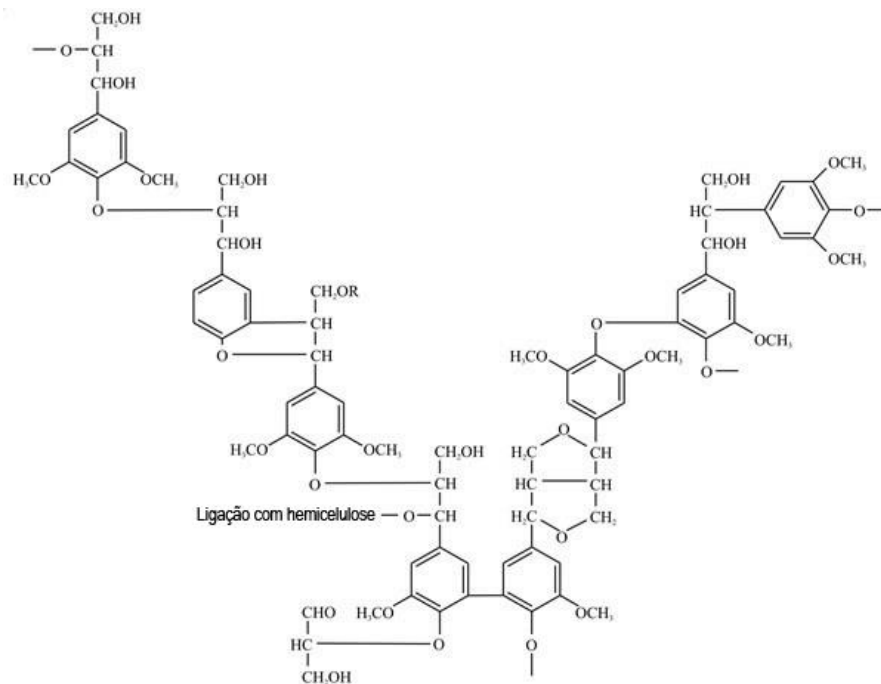
### 3.5. Lignina

Lignina chega a ocupar 33 % da massa de um material lignocelulósico (SAAKE et al., 2007). Ficando apenas atrás de celulose e hemicelulose, a lignina pode ser considerada o terceiro componente mais abundante do planeta, com cerca de 300 bilhões de toneladas por todo o globo (ARGYROPOULOS et al., 1998).

Lignina é uma complexa macromolécula polifenólica tridimensional que se liga à hemicelulose e envolve parcialmente os polissacarídeos e as microfibrilas de celulose na parede celular de plantas (Figura 7). Pode-se dizer que a lignina é um material físico e quimicamente heterogêneo, formado por várias combinações de p-hidroxifenil, guaiacil e siringil (HATAKEYAMA et al., 2009). Pode ser considerada como um resíduo na indústria do papel, sendo utilizada em produtos de baixo valor (KAI et al., 2017).

A lignina proporciona suporte mecânico e elástico, facilita o transporte de água e nutrientes pela planta e dificulta a entrada de patógenos microbianos (DAVISON et al., 2013). Nota-se que é mais abundante em plantas menos lenhosas, garantindo maior resistência à ataques contra sua integridade estrutural (PALONEN, 2004). Tal resistência é um dos maiores obstáculos para o aumento da acessibilidade à celulose, pois a lignina atua como uma barreira física e química para a ação de enzimas celulolíticas (LU et al., 2002). Além da remoção da lignina, estudos abordaram esse problema tentando impedir a ligação das celulasas com a lignina através de lavagem do material ou pela adição de sulfito na reação, formando lignosulfato (WANG et al., 2013).

**Figura 7:** Estrutura representativa da macromolécula de lignina encontrada em angiospermas, contendo ligações com hemiceluloses.



(Fonte: MOORE et al., 2011).

Apesar de não ser desejável em processos de conversão da celulose, pois broqueia o acesso à celulose, a lignina pode ser utilizada na produção de aditivos de cimento, antioxidantes, nano tubos de carbono, resinas, aditivos de combustíveis, lubrificantes, emulsificantes, floculantes, dispersantes, tintas, corantes e graxas (GUERRIERO et al., 2016).

### **3.6. Acessibilidade**

Diversos fatores influenciam a conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol e moléculas de alto valor agregado. Entre estes fatores, podemos citar a acessibilidade à celulose para a hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2015; diversas referencias), e o alto custo das tecnologias utilizadas nos processos de conversão (LANGE et al., 2007). Características do próprio substrato podem aumentar ou diminuir a acessibilidade, como a cristalinidade, o grau de polimerização e a heterogeneidade estrutural, que causa a presença de estruturas mais recalcitrantes ou até inacessíveis (CHANDRA et al., 2008). Uma das maiores barreiras a ser ultrapassada é o limitado acesso a grande parte da celulose que está protegida pelo rígido e organizado conjunto de microfibrilas (ARANTES et al., 2010).

A presença de lignina e hemicelulose também interfere na acessibilidade à celulose, alterando a distribuição de poros e a eficácia de pré-tratamentos e componentes enzimáticos (ESTEGHLALIAN et al., 2001). Materiais lignocelulósicos são substratos heterogêneos e porosos, tendo sua área superficial dividida em externa e interna, cada uma com diferentes afinidades (CHANDRA et al., 2008). A superfície interna pode ter sua acessibilidade medida pelas aberturas superficiais, fendas internas e espaços vazios criados pela retirada de componentes não-celulósicos como hemicelulose e lignina da parede celular. Este efeito é provocado por pré-tratamentos que se utilizam diversos métodos como explosão a vapor, ácido diluído, alcalino, peróxido etc (STONE et al., 1965).

A remoção da hemicelulose é considerada um fator mais impactante na acessibilidade à celulose do que a deslignificação do material para alguns autores (LEU et al., 2013). As hemiceluloses atuam como uma barreira física que dificulta hidrólise enzimática pelo fato de estarem alojadas entre e envolvendo as microfibrilas de celulose nas paredes celulares secundárias (ZHU et al., 2010). Análises feitas utilizando a fase líquida do experimento de extração confirmam que a remoção de hemiceluloses resulta em aumento no rendimento de hidrólise enzimática de celulose (YANG et al., 2004). Reduzindo o conteúdo de xilana de 17 % para 0 %, maiores quantidades de corante Direct Orange foram adsorvidas na superfície exposta da celulose, indicando aumento de acessibilidade (MENG et al., 2015)

A lignina naturalmente inibe o acesso de enzimas celulolíticas por formar uma barreira física que impede e compete por enzimas, causando adsorção não-produtiva e as desativando (XIMENES et al., 2011). A remoção de lignina com o uso de pré-tratamentos adequados pode reduzir ou eliminar a inibição da hidrólise enzimática da celulose (Figura 8) (YANG et al., 2004). Pré-tratamentos com sulfito, amônia e organosolv são capazes de deslignificar o material lignocelulósico de maneira eficaz, mas remover completamente essa lignina seria um processo excessivamente caro para um pré-tratamento (YANG et al., 2015). Confirmando os efeitos da lignina na hidrólise, a adição de lignina por diversos métodos sempre resulta em rendimento menor de hidrólise enzimática (YANG et al., 2015).

Estudos indicam que há uma relação positiva entre área superficial específica interna e taxa de hidrólise enzimática (COSGROVE, 2005), sendo considerada como o maior fator limitante para a hidrólise enzimática de biomassa (Figura 9) (HUANG et al., 2010). No entanto, celulasas só são capturadas em poros como tamanho suficiente (TANAKA et al., 1988), sendo poros com menos de 5,1 nm inadequados por não serem grandes o suficiente para a entrada das enzimas celulolíticas (CHANDRA et al., 2007). Além disso, a hidrólise enzimática de materiais pré-tratados tem sua digestibilidade diminuída após secagem, pois ocorre redução do tamanho dos poros (LUO et al., 2011).

Alguns estudos apontam que o tamanho das partículas do substrato pode estar relacionado com a digestibilidade do material (BRIENZO et al., 2015; CHANDRA et al., 2008). O tamanho e formato exato dessas partículas é difícil de ser medido, pois possuem formas irregulares e tendem a formar aglomerados (EK et al., 1994). Os tamanhos podem ser avaliados visualmente por microscopia e análise de imagens ou por analisadores automáticos de partículas, mas esses métodos não distinguem a topologia da superfície nem rachaduras/fissuras que podem aumentar a área de superfície específica acessível. Mesmo assim, podemos considerar que partículas menores aumentam a digestibilidade por oferecerem maior área superficial específica acessível à hidrólise enzimática (CHANDRA et al., 2008). Deste modo, não só a remoção de hemicelulose e lignina alteram a acessibilidade do material, mas as características físicas do material são igualmente importantes.

Um baixo grau de polimerização oferece um maior número de sítios de ligação para celulasas, favorecendo a hidrólise do material. Porém, a celulose precisa estar acessível para que as enzimas possam agir. De fato, alterações no grau de polimerização sempre estão acompanhadas por mudanças na porosidade e cristalinidade do substrato, pois, após passar por moagem, a biomassa tem suas fibras encurtadas e sua porosidade significativamente aumentada (ZHAO et al., 2012). Por outro lado, a despolimerização é um processo onde

polissacarídeos são convertidos em monômeros ou uma mistura de monômeros (JENKINS et al., 1996). A despolimerização da cadeia de celulose é parte do processo de hidrólise da celulose. As celulasas são os agentes de despolimerização da celulose, pois a quebram em glicose monomérica/monossacarídeo (JEOH et al., 2006). Assim, ação das celulasas, através do rendimento de hidrólise, é um indicativo da acessibilidade à celulose. As enzimas utilizadas na hidrólise, somadas as características do substrato, também são fatores a se considerar pois influenciam no rendimento do processo (WALLACE et al., 2016). A difusão das enzimas pelos poros, os sítios de ligação utilizados durante a hidrólise, a inibição do produto e a presença de outras enzimas que ataquem a parede celular da planta são características que devem ser consideradas ao se estimar a acessibilidade da celulose, com auxílio de celulasas a partir de um substrato celulósico (ESTEGHLALIAN et al., 2001).

### **3.7. Determinação da acessibilidade**

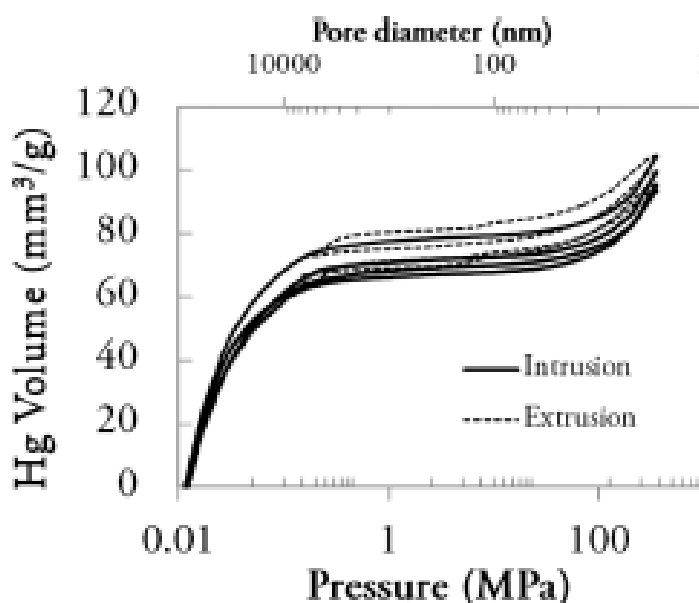
Diferentes métodos podem ser utilizados para medir/estimar a acessibilidade à celulose em materiais lignocelulósicos. Entre os métodos mais usuais cita-se adsorção de corantes, intrusão de mercúrio, adsorção de gás, termoporometria e tomograma de elétrons. Os principais métodos encontrados na literatura estão descritos abaixo.

O método que se utiliza de corantes chamado Simons' Stain foi desenvolvido com o objetivo de medir o dano microscópico causado nas fibras de material lignocelulósico após moagem (SIMONS, 1950). A mistura de corantes utilizada é composta por Direct Blue 1 e Direct Orange 15. As moléculas de Direct Blue que apresentam baixa massa molecular e não tem afinidade pela celulose ocupam os poros menores da fibra. O corante Direct Orange que apresenta maior massa molecular e afinidade à celulose adsorve na superfície externa do material (CHANDRA et al., 2008). Experimentos apontaram que um aumento no tamanho dos poros de um material lignocelulósico por ações físicas ou biológicas resulta no corante Direct Orange ganhando acesso aos poros alargados, removendo o Direct Blue por possuir maior afinidade com os grupos hidroxila da celulose (YU et al., 1995). Esse método se mostrou eficiente na tarefa de comparar a acessibilidade relativa em amostras de celulosas que passaram por diversos tipos de tratamentos (ESTEGHLALIAN et al., 2001). Métodos utilizando corantes apresentam vantagem de não necessitar de equipamentos complexos, e as vezes caros, o que limita o uso das técnicas. Métodos que utilizam apenas um corante, como o Vermelho Congo, também são utilizados. A molécula de Vermelho Congo é pequena ( $7.4 \text{ \AA} \times 4.3 \text{ \AA} \times 26.2 \text{ \AA}$ ), não distinguindo superfícies externa e interna da celulose e medindo a superfície total exposta (PELEKANI et al., 2001). A retirada de Vermelho Congo durante

tratamento de água provinda de indústrias têxteis tem sido estudada recentemente (RAYMUNDO et al., 2010; ZHANG et al., 2011; YU et al., 2017 & PATHRBE et al., 2017).

Para determinar a porosidade do material, pode-se usar o método de intrusão de mercúrio, capaz de caracterizar poros com tamanhos entre 3 nm e 100  $\mu\text{m}$  em celulose nanofibrilada. Este método usa mercúrio líquido para analisar os poros de substratos sólidos ou indefinidos. Mercúrio líquido é uma substância antiaderente, fazendo com que seja necessário o uso de pressão para forçar sua penetração nos poros. A pressão necessária para penetrar nas aberturas dos poros é inversamente proporcional ao raio dos poros, chegando a 350 Mpa para poros de 3 nm. Esta técnica oferece informações não apenas sobre os poros presentes no substrato, mas também sobre fendas entre as partículas presentes em partes menores do substrato. Essa técnica superestima a quantidade de poros, pois leva em conta rachaduras e lesões causadas pelo preparo do material (ORSOLINI et al., 2015).

**Figura 8:** Resultados obtidos usando o método de intrusão de mercúrio.



(Fonte: Orsolini et al., 2015).

Adsorção de gás também pode ser usada para a medição de porosidade. Gases são enriquecidos (adsortivo) em um substrato sólido (adsorvente). Interações de van der Waals determinam a adsorção física que controla as forças intermoleculares entre o adsortivo e o adsorvente bem como as interações binárias entre as moléculas adsortivas. A adsorção isoterma é gerada medindo-se a quantidade de gás adsorvido no substrato em crescente

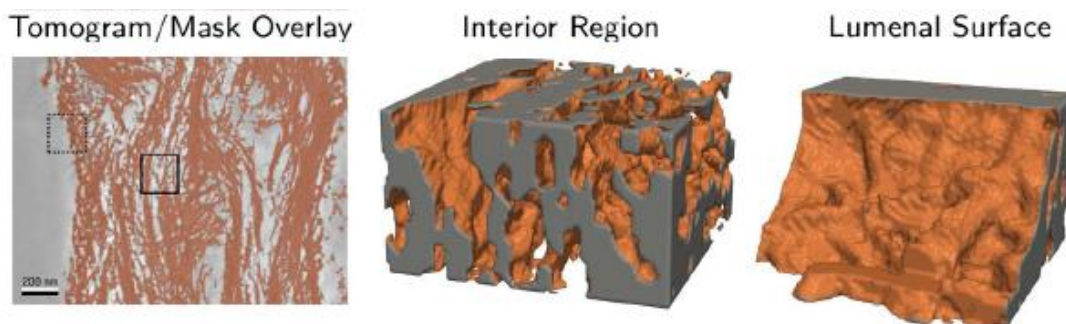


pressão adsorptiva e temperatura constante. Diminuindo-se a pressão, o processo de dessorção pode ser avaliado. Normalmente, as amostras passam por processos de degaseificação em altas temperaturas e baixas pressões. Os resultados de adsorção de gás mediram  $16,8 \text{ m}^2$  de área superficial exposta (ORSOLINI et al., 2015).

Termoporometria é uma técnica que analisa materiais porosos úmidos, não requerendo secagem. A amostra é umidificada em um líquido usado para análise, como água, e passa por mudanças de temperatura que variam entre congelamento e derretimento quando confinada em poros com diâmetros na faixa de submicrômetros. Este procedimento permite associar a variação de temperatura com o raio do poro. Usando excesso de líquido para a medição produz dois picos de entalpia em termogramas de derretimento ou congelamento. Um dos picos é atribuído ao excesso de água livre na superfície da amostra em altas temperaturas e o outro a temperaturas baixas relacionadas a água confinada ou ligada aos poros. Esta variação de temperatura corresponde à diferença entre a posição dos picos de água e livre e água confinada e o raio dos poros. Microporos com menos de 2 nm não podem ser analisados porque o líquido não congela devido à contribuição de energia superficial (ORSOLINI et al., 2015). O inchaço causado no material pelo uso de biomassa úmida mostra poros maiores do que os obtidos em outros métodos (ORSOLINI et al., 2015).

O método de Tomograma de elétrons 3D permite segmentar um tomograma em biomassa e espaços vazios, resultando não só em um mapa volumétrico descrevendo cada tipo de biomassa e fenda (Figura 9), mas também em um meio de estimar a superfície da biomassa. Deste modo, a quantidade de superfície exposta da biomassa acessível a catalisadores de determinados tamanhos pode ser estimada e analisada (HINKLE et al., 2015). Além disso, é possível usar as imagens geradas para medir quantitativamente a distribuição de tamanhos dos poros (MICKEL et al., 2008) e medir a espessura de objetos sólidos (HILDBRAND et al., 1997).

**Figura 9:** Mapas 3D obtidos utilizando o método de Tomograma de elétrons 3D.



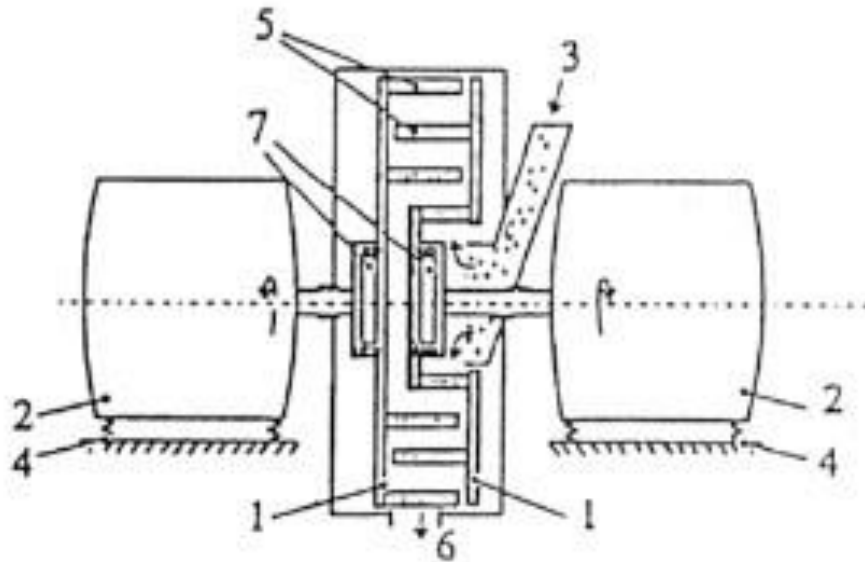
(Fonte: Hinkle et al., 2015).

### 3.8. Pré-tratamentos e seu efeito na acessibilidade à celulose

O material lignocelulósico apresenta tamanho de partícula grande, normalmente inadequado a etapa de pré-tratamento. Vários tipos de moagens podem ser utilizados como um passo anterior ao pré-tratamento. A moagem pode ser aplicada como um método de pré-tratamento, pois pode aumentar o rendimento da hidrólise enzimática (TAHERZADEH et al., 2008). Entretanto, métodos que provocam tal efeito consomem muita energia, e são considerados inviáveis devido ao custo. Deste modo, o material lignocelulósico é moído com a finalidade de reduzir o tamanho de suas partículas e aumentar a superfície de contato. A redução na organização das fibras de celulose é desejável (DA SILVA et al., 2013), diminuiria a recalcitrância do material lignocelulósico.

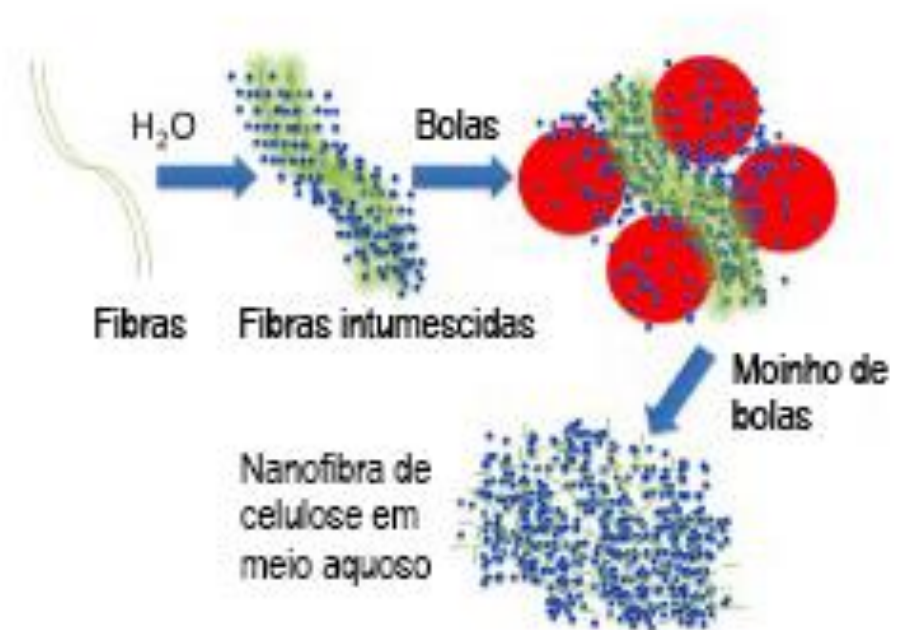
Os moinhos mais utilizados são o de bolas, que usa esferas de diferentes tamanhos e materiais gerando cortes e impactos na biomassa para produzir material em pó (LIN et al., 2010) e o de discos (Figuras 10 e 11), que esmaga a biomassa entre cortes e usa chapas serradas, com pontas ou sulcos para desestruturar a biomassa (HIDENO et al., 2009).

**Figura 10:** Esquema de um moinho de discos e suas estruturas: rotores perfilados (1), botão de energia (2), entrada de material (3), amortecedores (4), discos de moagem (5), escape (6) e controle adaptativo (7).



(Fonte: Kratky et al., 2011).

**Figura 11:** Esquema ilustrando o processo de moagem em um moinho de bolas.



(Fonte: Zhang et al., 2015).

Pré-tratamentos têm como função desestruturar o material e remover/modificar componentes da biomassa. Existem vários tipos de pré-tratamentos, como ácido, alcalino e explosão a vapor (Figura 12). Os custos e complexidade desses métodos devem ser levados

em consideração, pois é comum que sejam necessários em larga escala. Pré-tratamentos que removem a hemicelulose e removem ou modificam a estrutura da lignina são importantes por expor a celulose, aumentando a sua acessibilidade (BRIENZO et al., 2017, 2015).

O pré-tratamento ácido normalmente utiliza ácido sulfúrico a temperaturas que atingem até 150°C e pressões de até 10 atm (SUN et al., 2002). A reação pode ser dividida em sete etapas: difusão de prótons pela matriz lignocelulósica umedecida; protonação da ligação éter-oxigênio entre os açúcares monoméricos; quebra da ligação éter (glicosídica) e produção de um carbocátion intermediário; solvatação do carbocátion com água; regeneração de prótons e açúcares monoméricos, oligômeros ou polímeros dependendo de qual ligação éter foi quebrada; distribuição de produtos na fase líquida; retorno do processo ao segundo passo (HERRERA et al., 2003).

A celulose é resistente ao pré-tratamento ácido, entretanto, dependendo da severidade do processo (concentração de ácido, temperatura e tempo de reação) pode gerar perdas de 2 a 20 % de celulose (TRAJANO et al., 2013). Essa perda de celulose ocorre principalmente na sua fração amorfa. Devido à natureza cristalina da celulose, são necessários pH muito baixo, altas temperaturas e longos tempos de reação para afetar significativamente o material. Porém, condições que favorecem a hidrólise ácida da celulose, atingindo a fração cristalina, degradam a glicose gerada em hidroximetilfurfural, ácido fórmico e levulínico (FITZPATRICK, 2002). Usando condições menos severas de pré-tratamento, o grau de polimerização sofrer mudanças significativas, decaindo rapidamente nos estágios iniciais e se estabilizando após aproximadamente 30 minutos em reação com ácido clorídrico a 40°C (BATISTA, 1950). É provável que o decréscimo inicial do grau de polimerização se dê pela quebra das regiões amorfas da celulose (TRAJANO et al., 2013). A razão entre regiões amorfas e cristalinas da celulose diminuiu após o pré-tratamento devido a remoção parcial de hemicelulose e lignina do material e não pelo aumento de regiões cristalinas (KUMAR et al., 2009). Como resultado ocorre um aumento da cristalinidade do material após o pré-tratamento ácido diluído (BRIENZO et al., 2015).

A hemicelulose tem estrutura ramificada e amorfa, sendo mais susceptível ao pré-tratamento ácido do que a celulose. Sendo assim, a hemicelulose pode ser completamente removida sem causar grandes danos na celulose por meio do pré-tratamento ácido (AGUILAR et al., 2002). A severidade da remoção depende das condições do pré-tratamento. Os açúcares que compõem a hemicelulose podem ser liberados em solução como oligômeros ou monômeros, com razões que variam de acordo com temperatura, tempo e concentração de ácido (TRAJANO et al., 2013). O aumento da temperatura pode gerar aumento na quantidade

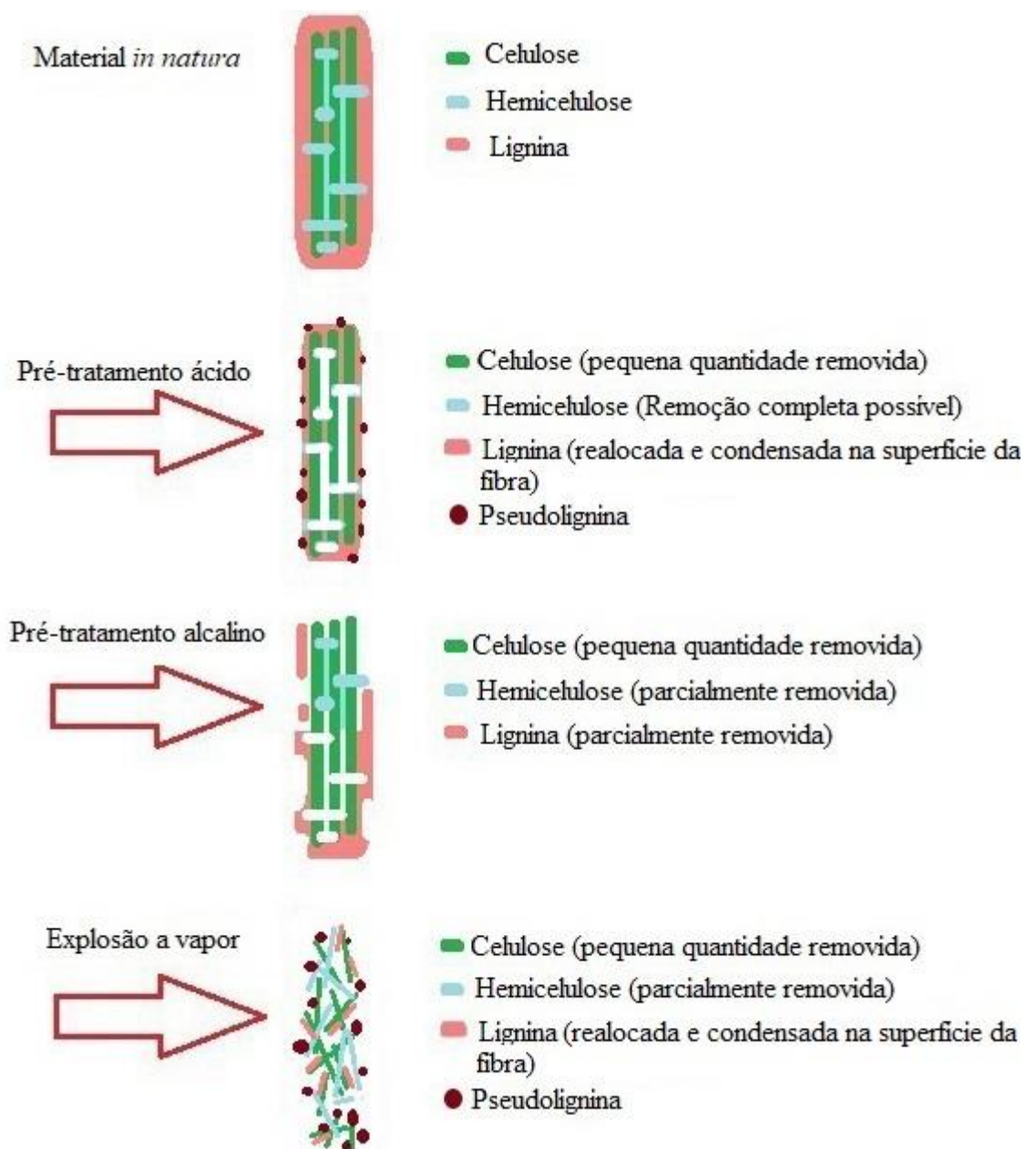
de monômeros (EXCOFFIER et al., 1991) e o aumento na concentração de ácido pode aumentar a remoção de hemiceluloses (KUMAR et al., 2009).

A remoção de lignina em pré-tratamento ácido é baixa independentemente da biomassa utilizada e do agente acidificante (KUMAR et al., 2009). Entretanto, a modificação na estrutura da lignina e sua realocação são fatores fundamentais para diminuir a recalcitrância do material (BRIENZO et al., 2017). A remoção de lignina pode não ser tão baixa se considerar que alguns produtos de degradação de açúcares podem reagir/condensar e formar compostos que são quantificados como lignina (TRAJANO et al., 2013). Ainda assim, adicionar ácido sulfúrico em um reator de batelada pode aumentar a remoção de lignina para até 50 % (LIU et al., 2004). A remoção de lignina é acompanhada pela geração de monômeros aromáticos na fração líquida, com os tipos de fenóis variando de acordo com a biomassa pré-tratada e com as condições do pré-tratamento (DU et al., 2010). Estudos de microscopia com a fração sólida (pré-tratada) revelaram mudanças drásticas na morfologia e distribuição da lignina, onde gotículas esféricas foram observadas na parede celular e apresentaram certo teor de lignina (DONOHOE et al., 2008). A morfologia e localização dessas gotículas sobre a biomassa apontam para um ciclo de quebra e condensação que seria responsável pela remoção (muito baixa) ou acúmulo da lignina (SELIG et al., 2007).

Para pré-tratamentos alcalinos podem ser utilizados diversos reagentes como hidróxido de sódio, cálcio e potássio (SOTO et al., 1994). Durante este tipo de pré-tratamento, as primeiras reações a ocorrer são solvatação e saponificação, que causam inchaço na biomassa e proporcionam maior acessibilidade para enzimas. Condições mais severas de pré-tratamento causam dissolução, “peeling” de grupos redutores, levando a perda de polissacarídeos pela sua solubilização (HENDRIKS et al., 2009). A perda de polissacarídeos ocorre principalmente por reações hidrolíticas e o peeling dos grupos redutores presentes nos açúcares (FENGEL et al., 1984). O principal efeito dos pré-tratamentos alcalinos é a remoção da lignina dos materiais lignocelulósicos, melhorando a reatividade do polissacarídeo devido à redução de obstáculos à ação de enzimas. Acredita-se que esse mecanismo envolve a saponificação intermolecular de ligações éster entre as hemiceluloses e a lignina, aumentando a porosidade do material. A adição de oxigênio na reação aumenta significativamente a deslignificação de materiais ricos em lignina em meio alcalino (DA SILVA et al., 2013). A remoção de grupos acetila das hemiceluloses por meio do tratamento alcalino expõe a celulose, o que aumenta a eficiência de posterior hidrólise enzimática (KUMAR et al., 2009). Além disso, o pré-tratamento alcalino causa remoção parcial da hemicelulose, inchaço da celulose e diminui sua cristalinidade (ZHU et al., 2010). Este método coloca a biomassa em

solução alcalina sob temperaturas amenas durante horas ou dias. Deste modo os açúcares são menos degradados do que nos pré-tratamentos ácidos. Após a reação, o material é neutralizado a fim de ajustar o pH e de remover lignina, inibidores, sais, furfural e ácidos fenólicos (DA SILVA et al., 2013).

**Figura 12:** Efeitos de diferentes pré-tratamentos na estrutura e composição química da biomassa lignocelulósica



(Fonte: Autor)

Na explosão a vapor, a biomassa lignocelulósica é colocada em um recipiente e submetida a altas condições de pressão e temperatura por alguns segundos ou minutos,

passando por rápida descompressão logo em seguida. Tal processo quebra as fibras do material (CHANDRA et al., 2015). Experimentos utilizando  $\text{SO}_2$  2 % a  $200^\circ\text{C}$  por 2 minutos foram capazes de recuperar 65 % de xilana em palha de milho, enquanto tratamentos a  $170^\circ\text{C}$  conseguiram recuperar apenas 18 % (ÖHGREN et al., 2005). O agente acidificante também influencia a remoção de hemiceluloses. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  resultou na completa remoção da hemicelulose, enquanto o método com  $\text{SO}_2$  não conseguiu remover todo o açúcar. Nota-se que apesar de remover toda a hemicelulose, o pré-tratamento com ácido sulfúrico gerou mais produtos de degradação do que o tratamento mais brando por continuar a atacar os açúcares após quebra, gerando furfural (MARTÍN et al., 2002).

A auto-hidrólise é um processo ecologicamente correto (LEI et al., 2013) e que não requer catalisadores ou componentes corrosivos (HONGDAN et al., 2013). A biomassa é aquecida juntamente com a água em temperaturas entre  $130$  e  $230^\circ\text{C}$  em diferentes períodos de tempo (poucos segundos a horas) (BATALHA et al., 2015). Neste pré-tratamento a hemicelulose pode ser parcialmente removida, o que leva ao aumento na acessibilidade à celulose. Outro pré-tratamento que tem se destacado é a ozonólise, processo capaz de quebrar ligações C-C em anéis aromáticos, atacando a lignina ao invés de atacar os carboidratos (TRAVAINI et al., 2016). Trabalhos utilizando irradiação por ultrassom após ozonólise mostraram aumento na eficiência do pré-tratamento com a ação conjunta dos processos (PERRONE et al., 2016). Deste modo, é esperado aumento na acessibilidade à celulose, e consequente melhora na digestibilidade enzimática.

Recentemente, estudos examinando mais detalhadamente os efeitos do pré-tratamento ácido reforçaram a ideia de que a modificação da lignina é mais determinante na acessibilidade à celulose do que mudanças no grau de polimerização e cristalinidade (BRIENZO et al., 2017). Experimentos envolvendo pré-tratamentos em escala piloto utilizaram ácido sulfúrico e ácido oxálico seguidos de explosão a vapor, observando maior sinergia, menores níveis de inibidores e pseudo-ligninas (PAL et al., 2017). Pré-tratamentos biológicos estão sendo explorados por serem menos nocivos ao ambiente e gerarem baixas quantidades de inibidores, apesar de ainda necessitarem de longos períodos de incubação para remover eficientemente a lignina do material (SINDHU et al., 2016).

### **3.9. Hidrólise enzimática da celulose**

Celulases são um sistema enzimático de vários componentes que despolimeriza a celulose em glicose através da quebra das ligações glicosídicas. As celulases são compostas de pelo menos três enzimas: endoglucanases, celobiohidrolases, e  $\beta$ -glicosidases. As celulases

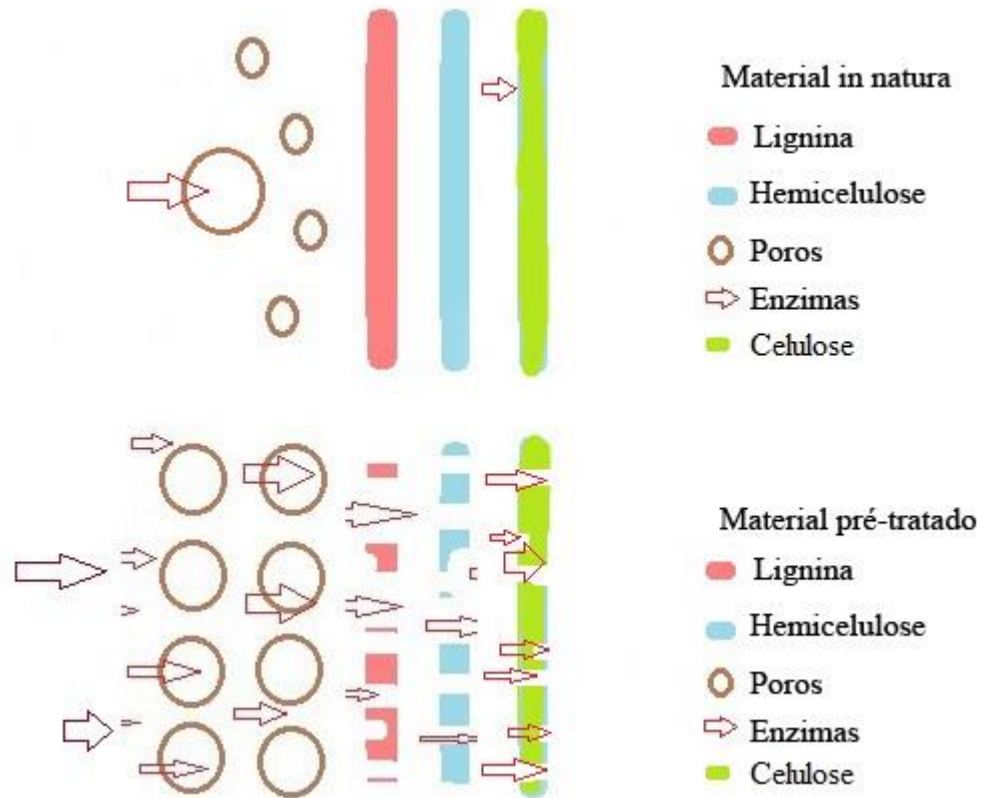
agem em conjunto, com ação sinérgica, onde o efeito das enzimas combinadas é maior do que o efeito de cada uma delas agindo separadamente (JEOH et al., 2002). Dentre as celulases, podemos citar as endoglucanases, responsáveis por clivar a celulose internamente ao longo da cadeia; as celobiohidrolases, capazes de agir nas terminações livres da cadeia (extremidades redutoras e não-redutoras) geradas pelas endoglucanases hidrolisando a celulose e produzindo unidades de celobiose (dímero de glicose), as quais são solúveis em água; e as  $\beta$ -glicosidases, finalizando o processo por meio da hidrólise de celobiose em monômeros de glicose (WALLACE et al., 2016).

A hidrólise da celulose pode ser dividida em 5 passos (LEE et al., 1982): transferência das enzimas de um meio aquoso para a superfície das partículas de celulose; adsorção das enzimas e formação do complexo enzima-substrato; hidrólise da celulose; transferência de oligômeros, glicose e celobiose da superfície das partículas celulósicas para o meio aquoso; hidrólise de oligômeros e celobiose em glicose no meio aquoso (WALKER et al., 1991). Este processo está sob a influência de diversos fatores discutidos anteriormente, como a presença de lignina e hemicelulose no substrato (Figura 13). Propriedades físico-químicas como acessibilidade à celulose é apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso da hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2015).

A deslignificação de materiais lignocelulósicos proporciona maior conversão enzimática da celulose, principalmente quando se reduz a quantidade de lignina a níveis abaixo de 50 % (MOONEY et al., 1998). Além de aumentar a eficiência da hidrólise, a quantidade de enzimas que podem ser recuperadas após o processo também mostra aumento (LU et al., 2002). De fato, amostras com maior conteúdo de lignina provocam maior adsorção improdutiva de enzimas (WALLACE et al., 2016). Quando não retirada, a lignina pode passar por redeposição em superfícies de celulose e ocupar poros antes acessíveis (WONG et al., 1988). Celulases adsorvem na fração de lignina do material lignocelulósico, prejudicando a hidrólise da celulose (OOSHIMA et al., 1990).



**Figura 13:** Efeito do pré-tratamento na parede celular vegetal, mostrando remoção/modificação de hemicelulose e lignina, aumento da acessibilidade à celulose, e consequente melhora na hidrólise enzimática



(Fonte: Autor).

A eficiência da hidrólise enzimática varia de acordo com a biomassa, o pré-tratamento aplicado e suas condições, e com a fração/tecido da biomassa devido a heterogeneidade. Sendo assim, as alterações na estrutura do material por meio de pré-tratamentos devem proporcionar maior mobilidade das enzimas e aumentar a eficiência da hidrólise (AZMAN et al., 2016). Hidrólise enzimática de fração externa (contendo epiderme), nó e entrenó não pré-tratados mostraram rendimento de 5,2, 21,5 e 28,7 % de glicose após 72 horas de reação, respectivamente. Por outro lado, apresentaram rendimento de 18,6% para fração externa, 56,5 % para nó e 75,9 % para entrenó quando pré-tratados com ácido 20 % (m/m). Neste caso, destaca-se que a digestibilidade dos materiais melhorou após o pré-tratamento ácido diluído, porém apresentaram diferente recalcitrância (BRIENZO et al., 2014).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Cana-de-açúcar e separação de frações**

A cana-de-açúcar foi fornecida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de Piracicaba/SP. A cana-de-açúcar foi lavada e posteriormente fracionada manualmente em fração externa (2 a 3 mm da extremidade, contendo epiderme), nó e entrenó (BRIENZO et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2011) e folha. Os materiais resultantes foram lavados e secos em estufas a 45°C até redução da umidade abaixo de 10 %. O material foi moído em moinho de facas e selecionado a partir do que passou por peneiras de 20 mesh.

### **4.2. Pré-tratamento alcalino**

As frações da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha) foram utilizadas e diferentes concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) no pré-tratamento alcalino. Cerca de 5 g de cada fração foram adicionados em frascos tipo Schott com a concentração desejada de NaOH. As quantidades de NaOH utilizadas foram relação em massa de NaOH por massa de material, nas concentrações de: 5, 10, 20 e 30 % (m/m, massa de álcali por massa de material). A solução alcalina teve volume final de 100 mL, utilizando água deionizada. Os frascos foram autoclavados a 121°C, por 30 min (BRIENZO et al., 2016). O meio reacional foi filtrado em papel de filtro e a fração líquida foi descartada. O material sólido pré-tratado foi lavado com água destilada até a obtenção de pH próximo ao neutro na água de lavagem. O material sólido foi seco em estufas a 45°C e armazenado em frascos plásticos.

### **4.3. Pré-tratamento oxidativo**

As frações da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha) foram pré-tratados com clorito de sódio para remoção parcial da lignina, sendo este pré-tratamento utilizado apenas para fins analíticos. Foram adicionados 1,5 g de NaClO<sub>2</sub> e 0,5 mL de ácido acético anidro em 50 mL de água destilada juntamente com 5 g de material. O meio reacional foi aquecido em banho termostaticado a 70°C por 30 minutos, por 1, 2 e 3 horas. Novas cargas/doses de clorito de sódio e ácido acético foram adicionadas nos tempos de 1, 2 e 3 horas (BRIENZO et al., 2015). Após resfriamento, o meio foi filtrado e a fração líquida descartada. A fração sólida foi lavada com cerca de 500 mL de água destilada ou até o pH da água de lavagem atingir o pH próximo a da água destilada (4,5 a 5). O material foi seco em estufa a 45°C e armazenado em frascos plásticos. Feito em triplicata.

#### 4.4. Pré-tratamento ácido

As frações da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha) foram submetidas a diferentes condições de pré-tratamento com ácido diluído ( $H_2SO_4$ ) (ZHENG et al., 2014). A quantidade de material usado foi de 5 g e a reação foi realizada em frascos de 250 mL, com volume reacional de 50 mL, adicionando-se as concentrações de ácido 5, 10 e 20 % (m/m). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 30 min (BRIENZO et al., 2014). Após esfriar, o material foi filtrado em papel de filtro e a fração líquida foi descartada. A fração sólida foi lavada com cerca de 500 mL de água destilada ou até o pH da água de lavagem atingir o pH da água destilada (4,5 a 5). O material foi seco em estufa a 45°C e armazenado em frascos plásticos. Feito em triplicata.

#### 4.5. Determinação da acessibilidade à celulose

##### 4.5.1 Corantes Direct Orange e Direct Blue

A adsorção de corantes nas fibras (SIMONS, 1950) foi determinada pela adição de 50 mg (massa seca) das amostras pré-tratadas em seis tubos de centrifuga de 15 mL e 0,5 mL de solução tampão fosfato salina (pH 6, 0,3 M  $PO_4$ , 1,4 mM NaCl) em cada tubo. A solução Direct Orange (DO) (10 mg/mL) foi adicionada em diferentes volumes (0,06, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75, 1,0 mL) nos tubos contendo amostras (CHANDRA et al., 2008). A solução Direct Blue (DB) (10 mg/mL) também foi adicionada a cada tubo da mesma forma para obter no final um conjunto de tubos com uma mistura 1:1 de corantes DO e DB em diferentes concentrações. Os tubos foram preenchidos em um volume final de 5 mL com água destilada. Foram mantidos a 70°C por 6h e agitação de 120 rpm. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para leitura de absorvância em espectrofotômetro a 624 e 455 nm.

O corante adsorvido na fibra foi indiretamente determinado pela diferença da concentração inicial e final de corante no sobrenadante. A concentração dos corantes DO e DB foram determinados utilizando as seguintes equações:

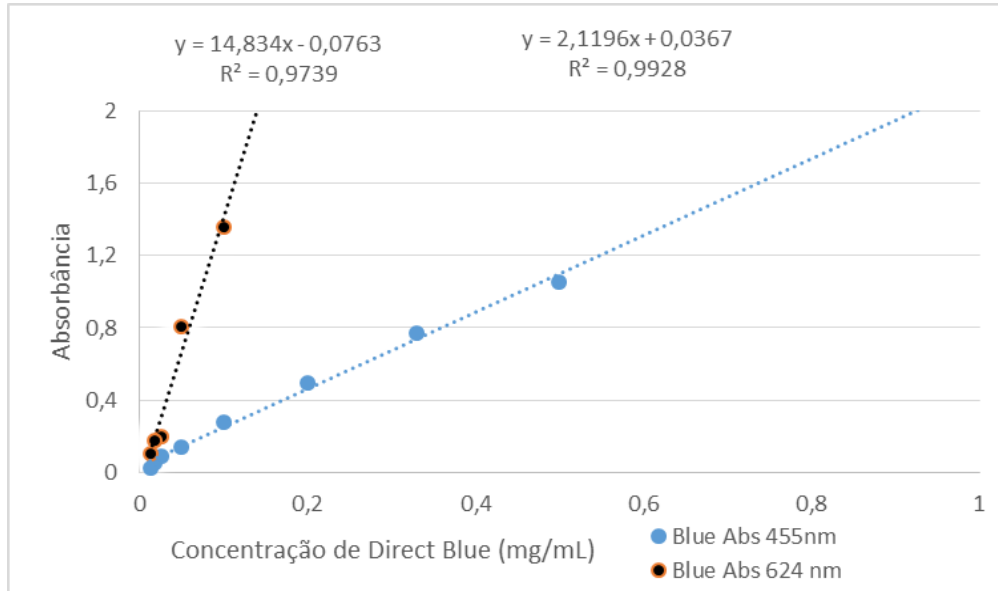
$$A_{455nm} = \epsilon_{O/455} LCO + \epsilon_{B/455} LCB \quad (1)$$

$$A_{624nm} = \epsilon_{O/624} LCO + \epsilon_{B/624} LCB \quad (2)$$

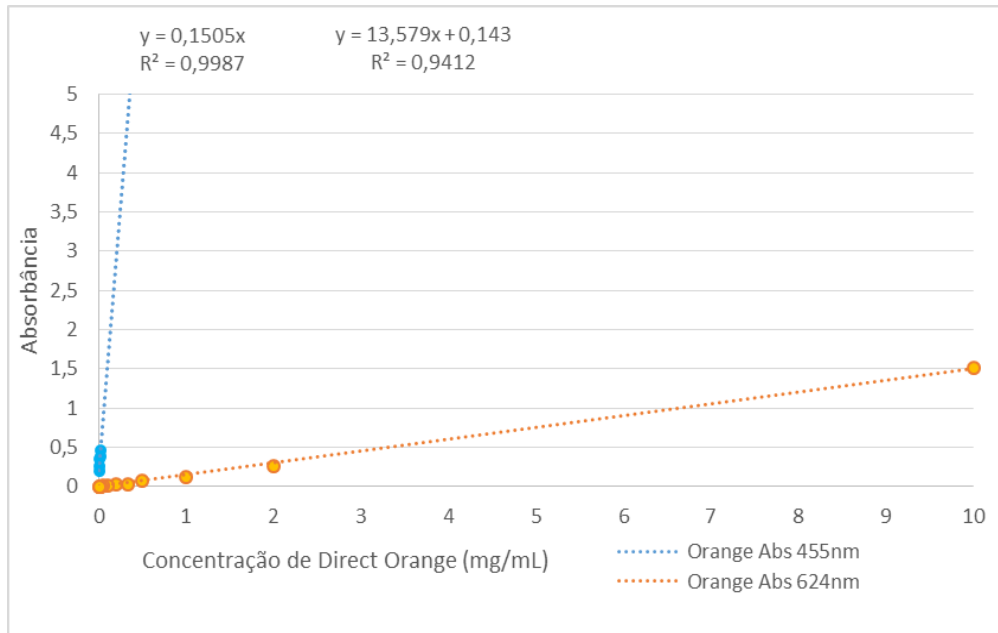
Onde: A é a adsorção da mistura em 450 ou 624 nm,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção de cada componente no respectivo comprimento de onda, e L é o comprimento da cubeta (1 cm). CO é a concentração do corante Direct Orange, e CB a concentração do corante Direct Blue.

Os coeficientes de extinção foram calculados a partir de curvas padrão de corantes e do coeficiente angular de sua absorbância a 455 e 624 nm (Figuras 14 e 15).

**Figura 14:** Curva obtida na determinação do coeficiente de extinção do corante Direct Blue.



**Figura 15:** Curva obtida na determinação do coeficiente de extinção do corante Direct Orange.

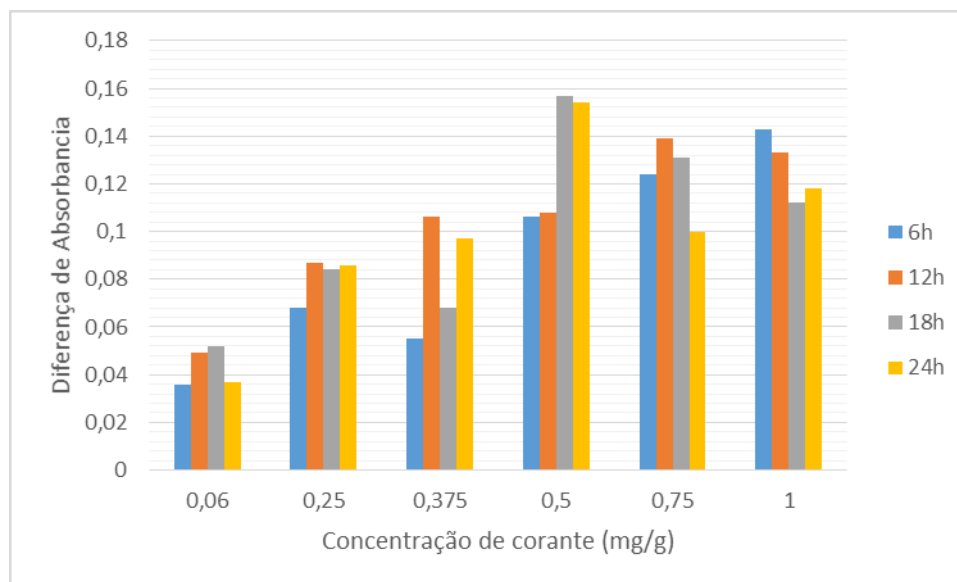


#### 4.5.2 Corante Vermelho Congo

Soluções com volumes de 0,06, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75 e 1,0 mL de corante Vermelho Congo pipetados de uma solução de 10 mg/mL foram testadas em períodos de 6, 12, 18, 24 e

48 horas com 50 mg de fração externa e 0,5 mL de solução tampão em pH 6, 0,3 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  a  $65^\circ\text{C}$  para avaliar concentrações de corante e tempos de reação (Figura 16).

**Figura 16:** Valores obtidos após testes com Vermelho Congo.



Os ensaios subsequentes foram realizados com 1 mL de Vermelho Congo (10 mg/mL) adicionado nos tubos contendo 50 mg de de cada umas das frações. Foi utilizada solução tampão em pH 6, 0,3 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , com incubação de 24 horas a  $65^\circ\text{C}$ , agitação de 150 rpm. Após centrifugação foi realizada leitura em espectrofotômetro a 498 nm. O corante adsorvido na fibra foi indiretamente determinado pela diferença da concentração inicial e final de corante no sobrenadante. Os resultados foram expressos em miligrama de corante adsorvido por grama de material. Feito em triplicata.

#### 4.6. Atividade enzimática – celulase total

A atividade de celulases totais foi determinada conduzindo a hidrólise de papel de filtro Whatman nº 1. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 6 cm), equivalente a 50 mg, foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados a  $50^\circ\text{C}$  por 60 min e a reação foi interrompida com 3 mL de DNS. Os tubos foram fervidos a  $100^\circ\text{C}$  em banho-maria, por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 mL de água destilada e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Foi feito um controle para ajuste do aparelho substituindo o papel de filtro e o volume de enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. Controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático foram usados

para descontar os açúcares que não foram produzidos durante a reação enzimática. A curva padrão foi construída com glicose (Merck) 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg/mL.

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo-se completamente 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio, em 1,4 L de água destilada. A seguir, adicionou-se 30 g de tartarato de sódio e potássio; 7,6 g de fenol (aquecido a 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O volume foi acertado para 1,5 L; filtrado e armazenado em frasco âmbar (MILLER, 1959).

#### **4.7. Hidrólise enzimática**

As amostras de fração externa, nó, entrenó e folha *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído, hidróxido de sódio e clorito de sódio foram submetidas a hidrólise enzimática para avaliar o rendimento de liberação de glicose. Aproximadamente 0,2 g de amostra foram submetidos a hidrólise enzimática para comparar a digestibilidade utilizando coquetéis comerciais (Cellic Ctec 2 - Novozymes), em meio tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 (BRIENZO et al., 2015). Foi utilizada atividade enzimática de 15 FPU/g de substrato em reação a 50°C e agitação de 150 rpm. A fração líquida foi filtrada em filtros de seringa de 0,22 µm e analisada em HPLC para quantificação de glicose liberada, utilizando coluna Aminex HPX-87H a 60°C, eluída com solução de ácido sulfúrico 50 mmol/L em um fluxo de 0,6 mL/min. Os açúcares foram quantificados utilizando detector de índice de refração. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a digestibilidade enzimática do material (anidroglicose liberada em relação ao conteúdo de glucana/celulose) a partir do teor de celulose presente na biomassa.

#### **4.8. Caracterização Química da biomassa *in natura* e pré-tratada**

As amostras de fração externa, nó, entrenó e folha *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído, hidróxido de sódio e clorito de sódio foram caracterizadas quanto ao conteúdo de glucana/celulose, hemicelulose/xilana e lignina. A composição química foi determinada em reação com ácido sulfúrico concentrado com as amostras livres de extrativos (SLUITER et al., 2010). Para a caracterização, 300 mg de cada fração foi pesada e colocada em frasco juntamente com 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (72 %). Os frascos foram colocados em banho a 30°C por 1 h, depois a suspensão foi diluída com adição de 84 mL de água destilada e em seguida autoclavada a 121°C/1 atm por 1 h. Após esfriar, o material foi filtrado em cadinhos de placa porosa número 4, sendo a fração sólida retida no cadinho contendo lignina insolúvel foi seca em estufa a 105°C por 24 horas, e pesados. A fração líquida foi utilizada

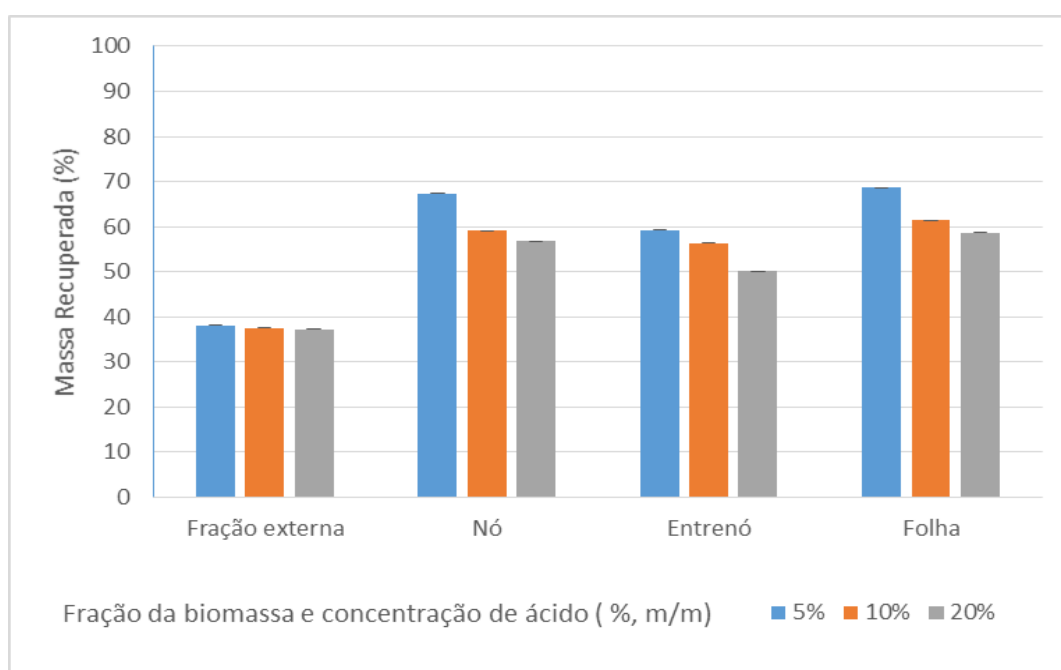
para determinação de lignina solúvel (leitura em espectrofotômetro a 240 nm), e de glicose, xilose e arabinose por cromatografia líquida, utilizando coluna Aminex HPX-87H a 60°C, eluída com solução de ácido sulfúrico 50 mmol/L em um fluxo de 0,6 mL/min. Os açúcares foram quantificados utilizando detector de índice de refração.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Recuperação de massa

A severidade e o tipo de pré-tratamento influenciaram na porcentagem de massa recuperada de cada fração. O pré-tratamento provoca solubilização de açúcares e, no caso do pré-tratamento ácido diluído, principalmente da hemicelulose (AGUILAR et al., 2002). A recuperação de massa pode ser utilizada como uma avaliação inicial da recalcitrância do material, sendo mais recalcitrante o material que apresentar menor variação na recuperação de massa (BENJAMIN et al., 2013). Tendência de perda de massa similares foram apresentados em todas as frações e pré-tratamentos, diminuindo a recuperação de massa com aumento da concentração de ácido (Figura 17).

**Figura 17:** Recuperação de massa após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações de ácido (5, 10 e 20 %  $H_2SO_4$  m/m) com fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar.

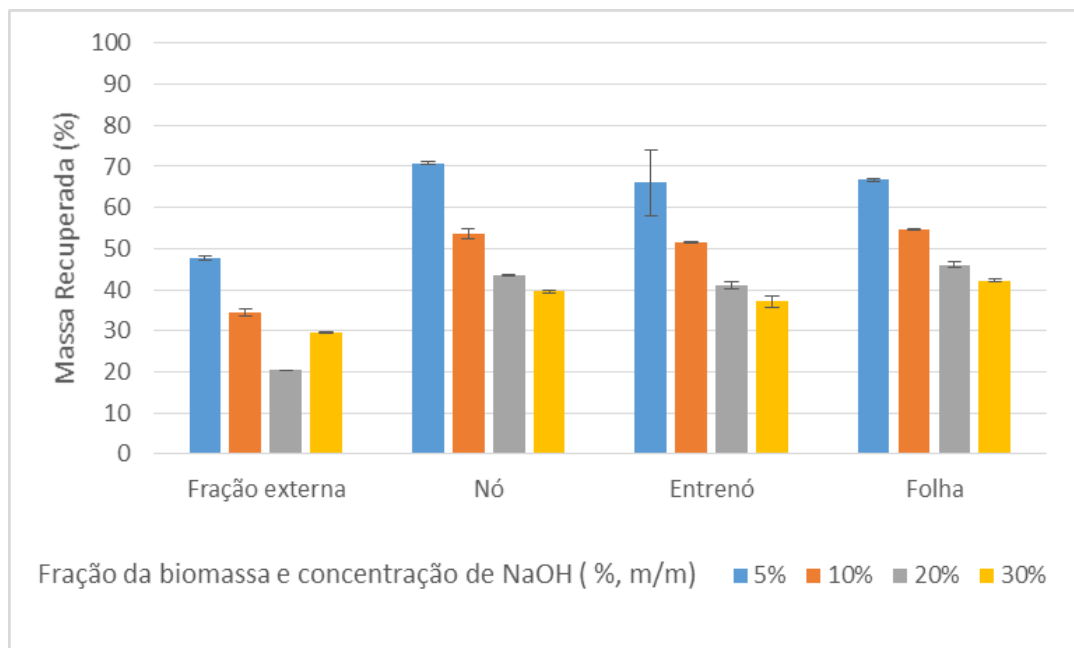


No pré-tratamento ácido, a fração externa apresentou pequena variação na recuperação de massa com o aumento da severidade do pré-tratamento (Figura 18). A recuperação de massa foi de 37,3 % a 38 % de massa recuperada na maior e menor concentração, respectivamente. Para as frações de nó, entrenó e folha as diferenças foram mais acentuadas. O nó, em concentrações de ácido 5 %, resultou em 67,4 % de massa recuperada e 59 % em concentrações de 10%. Na condição mais severa, a porcentagem



diminuiu para 56,7 %. O entrenó apresentou 59,3 % e 56,3 % de massa recuperada em condições mais brandas de pré-tratamento e 50,1 % na concentração de ácido 20 %. A folha resultou em 68,7 % da sua massa inicial recuperada nas condições de ácido 5 %, 61,4 % nas condições de ácido 10 % e 58,6 % na condição mais concentrada (20 %).

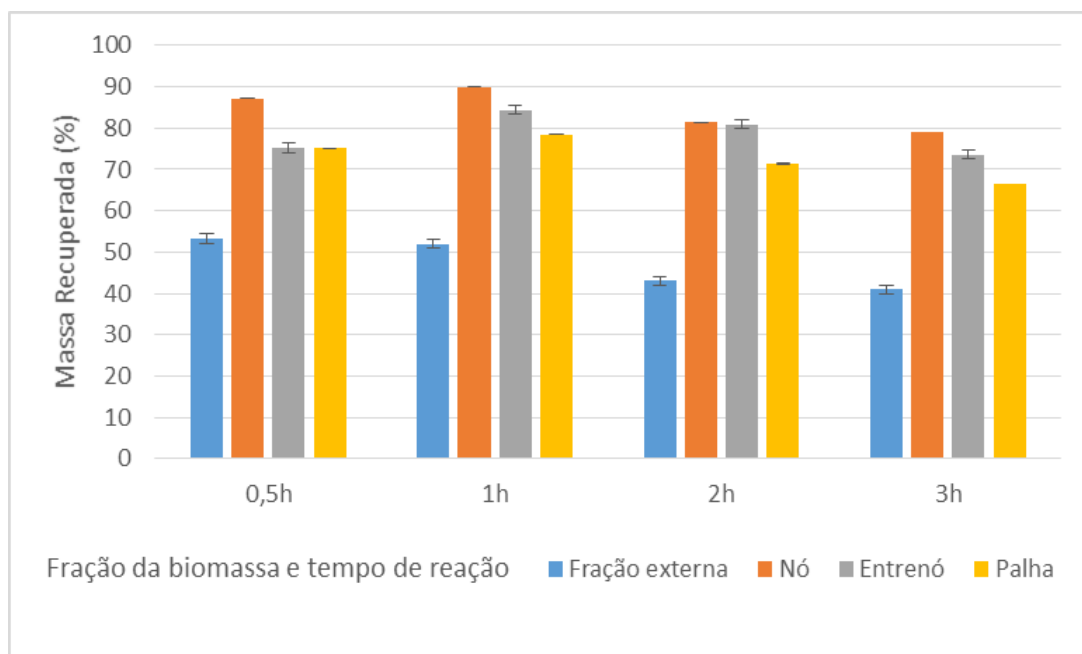
**Figura 18:** Recuperação de massa após pré-tratamento alcalino em diferentes concentrações de álcali (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) com fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar.



No pré-tratamento alcalino, a fração externa pré-tratada em condições de álcali 5 % apresentou recuperação de 47,8 % de sua massa inicial (Figura 19). Concentrações intermediárias de álcali 10 e 20 % resultaram em 34,4 e 20,4 % de massa recuperada. Condições mais severas (maior concentração de NaOH) no pré-tratamento resultaram em 29,6% de recuperação de massa. Seguindo um padrão de recuperação de massa, o nó partiu de 70,8 % de massa recuperada em condições mais brandas (menor concentração) para recuperando 53,6% quando pré-tratado com 10% de álcali. Em condições mais severas, os números caem para 43,6 e 39,6 %, respectivamente. Com uma tendência semelhante na recuperação de massa, o entrenó apresentou 66 % de massa recuperada em condições alcalinas de 5 %, 51,6 % com álcali 10 % e 41 % com 20 %. O pré-tratamento com 30 % de álcali, condição de maior concentração, apresentou apenas 37,2 % de massa recuperada. Por fim, a folha mostra recuperação de 66,8 % e 54,6 % em condições alcalinas de 5 % e 10 %, e

46 % e 42,2 % em condições de 20 % e 30 %. Sendo assim, a folha mostrou o mesmo comportamento das outras frações após o pré-tratamento alcalino.

**Figura 19:** Recuperação de massa após pré-tratamento oxidativo em diferentes graus de severidade (0,5, 1, 2 e 3 horas) com fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar.



O pré-tratamento oxidativo resultou em tendência de diminuição na recuperação de massa com o aumento do tempo de reação (Figura 19). A fração externa resultou em 53,4 % de massa recuperada após 30 min de reação, 52 % após 1h, 43 % e 41 % após duas e 3h. O nó teve 87,2 % de sua massa inicial recuperada após passar pelo pré-tratamento mais brando de 30 minutos, 90 % após 1h de reação, 81,4 % após 2h e 79,2 % em condições severas. O entrenó resultou em 75,2% e 84,4% de massa recuperada após 30 min e 1h de reação, e 80,8% e 73,6 % nas condições mais severas. Seguindo uma tendência, a folha resultou em 75,2 % de recuperação de massa após 30 minutos de reação, 78,4 % 1h, 71,4 % após duas e 66,4 % após 3h.

A fração externa apresentou os menores valores de massa recuperada após os três tipos de pré-tratamentos utilizados (Figuras 17, 18 e 19). Além disso, apresentou pouca variação na massa recuperada, especialmente após o pré-tratamento ácido. A baixa recuperação pode ser explicada pela grande quantidade de extrativos encontrada na fração externa utilizada nesse estudo, enquanto a baixa variação no pré-tratamento ácido pode ter sido causada pela alta recalcitrância dessa fração (CANILHA et al., 2011; BRIENZO et al., 2014). Nó e entrenó mostraram-se menos resistentes ao pré-tratamento e perderam mais

massa com o aumento de severidade do pré-tratamento, seguindo o padrão esperado de acordo com a literatura (BRIENZO et al., 2014). Tal resistência do nó pode ser devido ao fato de que sua estrutura é compacta e rica em feixes vasculares com células de esclerênquima (BRIENZO et al., 2016), ao passo que o entrenó é formado principalmente por células de parênquima (O'BRIEN et al., 1971). A folha mostrou alta recuperação de massa e reagiu bem ao pré-tratamento ácido, não mostrando grande recalcitrância comparada as demais frações. Comportamento similar ao de folhas de outros tipos de biomassa como capim-elefante, onde a perda de massa ocorreu pela retirada de outros componentes, causando aumento no teor de celulose (42,7% em concentrações de ácido 20%) (SANTOS et al., 2018).

Possuindo uma porcentagem maior de lignina em sua massa, a fração externa pode perder mais conteúdo ao passar pelo pré-tratamento alcalino do que nó e entrenó (BRIENZO et al., 2014). Nó e entrenó, menos recalcitrantes, perderam massa seguindo o padrão/tendência esperado, comparando com bagaço de cana-de-açúcar (BENJAMIN et al., 2013). O pré-tratamento com NaOH remove a lignina eficientemente com o aumento de severidade, o que explica a perda de massa mais notável em condições mais agressivas (carga de reagente e tempo de reação) e é similar ao resultado obtido em outros estudos onde o material perde massa pela remoção de lignina (17,52 % para 7,16 %) (MARYANA et al., 2014). Pré-tratamentos alcalinos em folhas têm se mostrado eficientes, removendo lignina e conseqüentemente gerando perdas em massa (GHORBANI et al., 2017). O pré-tratamento oxidativo com clorito de sódio teve resultados similares aos das amostras pré-tratadas com NaOH, também sendo responsável pela remoção de lignina e clareamento do material (ABDEL-HALIM, 2014).

## 5.2. Caracterização Química das amostras

As biomassas (frações) da cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas foram caracterizadas quanto a sua composição química, determinando conteúdo de celulose/glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina (soma da lignina solúvel e insolúvel em meio ácido). Para os fins de discussão, xilana foi considerada como representativa da hemicelulose por ser o componente majoritário desse polissacarídeo (LIU et al., 2017).

A fração externa *in natura* apresentou 40,04 % de celulose 21,56 % de xilana e 34,31% de lignina. O nó apresentou 38,61 % de celulose, 21,85% de xilana e 33,59 % de lignina. O entrenó apresentou 45,55 % de celulose, 22,64 % de xilana e 26,57 % de lignina. Na folha, obteve-se 37,2 5% de celulose, 20,72 % de xilana e 40,8% de lignina (Tabela 1). Outro trabalho envolvendo frações da cana-de-açúcar reportou 50,12% de celulose para a

fração externa, 42,26 % para o nó e 44,67 % para o entrenó (BRIENZO et al., 2014). O estudo de frações da folha de capim-elefante apresentou 32,28 % de celulose em sua composição (SANTOS et al., 2018). O bagaço de cana-de-açúcar apresentou valores entre 36,9 % e 48,6% de celulose (BRIENZO et al., 2017). Deste modo, observa-se que existe uma variação nos teores de celulose, principal componente no estudo de conversão em bioetanol, para diferentes biomassas. Entretanto, o conteúdo das frações está na faixa reportada para o bagaço de cana-de-açúcar (ROCHA et al., 2015)

**Tabela 1:** Composição química (% , massa seca) da fração externa, nó, entrenó e folha *in natura* livre de extrativos da biomassa de cana-de-açúcar.

<b>Fração <i>in natura</i></b>	<b>Glucana (%)</b>	<b>Xilana (%)</b>	<b>Arabinana (%)</b>	<b>Ácido acético (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Total (%)</b>
Fração externa	40,04 ± 4,03	21,56 ± 2,10	3,85 ± 2,10	3,14 ± 0,38	34,31 ± 0,93	102,91
Nó	38,61 ± 0,91	21,85 ± 0,53	4,20 ± 0,53	3,42 ± 0,04	33,59 ± 2,14	101,67
Entrenó	45,55 ± 3,68	22,64 ± 1,68	4,34 ± 0,17	3,53 ± 0,13	26,57 ± 1,39	102,63
Folha	37,25 ± 1,00	20,72 ± 0,32	1,48 ± 0,03	1,20 ± 0,02	40,80 ± 4,18	101,44

O conteúdo de extrativos nas frações variou de 10 a 51 %, e cinzas de 0,32 a 5 % (Tabela 2). A forma de preparar o material pode ter influenciado no conteúdo de extrativos determinado, o qual está acima do apresentado na literatura para bagaço de cana-de-açúcar (ROCHA et al., 2015). As frações da cana-de-açúcar foram separadas/cortas manualmente, e o colmo livre de fração externa moído para retirar o suco (sacarose). As frações foram lavadas com água destilada corrente e secas em estufa a 45°C. Provavelmente, o conteúdo de sacarose não foi completamente removido, sendo quantificado junto com extrativos.

**Tabela 2:** Conteúdo de extrativos (% , massa seca) da fração externa, nó, entrenó e folha *in natura* da biomassa de cana-de-açúcar.

<b>Fração <i>in natura</i></b>	<b>Extrativos (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
Fração externa	51,00 ± 1,30	32,00 ± 0,04
Nó	10,00 ± 1,26	1,00 ± 0,01
Entrenó	27,00 ± 0,83	1,00 ± 0,02
Folha	17,00 ± 0,76	5,00 ± 0,08

O pré-tratamento ácido da fração externa provocou remoção de xilana que resultou em 6,59 % no material pré-tratado com 5 % de ácido, 5,2 % em concentrações de ácido 10% e 4,19 % em concentrações de 20 % (Tabela 3). As porcentagens de celulose aumentam para

42,71 % em concentrações de ácido 5 %, 43% em condições ácidas de 10 % e 45,15 % em concentrações de 20 %. A lignina diminuiu em porcentagem, caindo para 25,3 % em concentrações de ácido 5 % e subindo para 30,12 % e 30,47 % em condições de 10 % e 20 %. Após pré-tratamento alcalino, a fração externa mostrou ganho de conteúdo em lignina, subindo para 40,62 % em concentrações alcalinas de 5 %, porém caindo para 18,65 % em condições de álcali 30 %. Consequência dessa perda de lignina, a porcentagem de celulose subiu de 40,04 % da fração externa *in natura* para 44,78 % em condições de álcali 10%. Concentrações alcalinas de 30 % resultaram em ganhos, com 46,68 % de celulose na amostra. A xilana sofreu pequena perda, caindo para 9,21% em condições alcalinas de 5 % e para 8,37 % na concentração de álcali 30 %. O pré-tratamento oxidativo gerou perda de lignina, partindo de 33,29 % com 30 min de reação para 22,83 % após três h. Nas condições mais severas, celulose e xilana passaram para 41,40 e 10,94 %, respectivamente.

**Tabela 3:** Composição química (% , massa seca) da fração externa pré-tratada em meio ácido (5, 10 e 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m), alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) e oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 horas).

<u>Pré-tratamento</u>	<u>Glucana (%)</u>	<u>Xilana (%)</u>	<u>Arabinana (%)</u>	<u>Acido acético (%)</u>	<u>Lignina (%)</u>	<u>Total (%)</u>
<i>In natura</i>	40,04 ± 4,03	21,56 ± 2,10	3,85 ± 2,10	3,14 ± 0,38	34,31 ± 0,93	102,91
Acido 5%	↓ 42,71 ± 1,37	↑ 6,59 ± 0,03	0,55 ± 0,01	0,45 ± 0,01	↓ 25,30 ± 4,75	55,64
Acido 10%	↓ 43,00 ± 0,20	↑ 5,20 ± 0,04	0,29 ± 0,01	0,24 ± 0,01	↓ 30,12 ± 2,00	58,95
Acido 20%	↓ 45,15 ± 0,55	↑ 4,19 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	↓ 30,47 ± 0,28	60,01
Alcalino 5%	↓ 37,92 ± 0,16	↑ 9,21 ± 0,33	0,86 ± 0,13	0,70 ± 0,10	↑ 40,62 ± 10,40	89,32
Alcalino 10%	↓ 44,78 ± 10,06	↑ 8,76 ± 2,15	0,33 ± 0,33	0,27 ± 0,27	↑ 47,91 ± 3,61	102,05
Alcalino 20%	↓ 44,02 ± 4,18	↑ 9,27 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	↑ 40,30 ± 0,37	93,60
Alcalino 30%	↓ 46,68 ± 1,14	↑ 8,37 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	↑ 18,65 ± 1,82	73,69
<u>Oxidativo 0,5h</u>	↓ 36,82 ± 1,04	↑ 13,85 ± 0,50	2,98 ± 0,36	2,43 ± 0,29	↑ 33,29 ± 0,42	89,36
<u>Oxidativo 1h</u>	↓ 35,98 ± 0,39	↑ 15,65 ± 0,56	3,54 ± 0,10	2,88 ± 0,08	↑ 31,72 ± 7,47	75,18
<u>Oxidativo 2h</u>	↓ 39,41 ± 0,97	↑ 14,04 ± 0,08	3,07 ± 0,32	2,50 ± 0,26	↑ 30,38 ± 4,88	89,39
<u>Oxidativo 3h</u>	↓ 41,40 ± 0,48	↑ 10,94 ± 1,07	2,79 ± 0,19	2,27 ± 0,16	↑ 22,83 ± 2,95	93,91

Lignina = soma da lignina solúvel e lignina insolúvel;

Pré-tratamento oxidativo foi realizado com 1,5 g de clorito de sódio e 0,5 mL de ácido acético, repetindo carga de reagentes a cada hora de reação.

Setas indicam relação do pré-tratamento com o aumento do teor do componente.

O pré-tratamento ácido do nó resultou em perda de xilana, restando 5,89 % empregando 5 % de ácido, e 4,95 e 4,05 % com ácido 10 e 20 %, respectivamente (Tabela 4). A celulose, por outro lado, de forma geral resultou em um aumento, apresentou 38,47 % quando pré-tratada com ácido 5 %, 42,2 % com 10% e 41,96 % com 20%. Entretanto, estes dados estatisticamente semelhantes, uma vez que os valores são próximos e os desvios

padrões também. A lignina sofreu aumento, passou para 42,67 e 41,96 em condições de ácido 5 e 20 %. O pré-tratamento alcalino promoveu grande remoção de lignina, resultando em 27,28 % em condições de álcali 5 % e chegando a 7,63 % em condições alcalinas de 30 %. A xilana teve conteúdo diminuído para 12,26 % em condições alcalinas de 5 %, chegando a 12,19 % em concentrações de álcali 30 %. Concentrações alcalinas de 20% resultaram em aumento do teor de celulose para 53,59 %. Condições de álcali 30% apresentou o conteúdo de celulose para 42,55 %, próximo do material *in natura*. O pré-tratamento oxidativo do nó apresentou 34,21 % de lignina após 30 min de reação e 11,65 % após 3h, indicando remoção. Celulose partiu de 38,20 % após 30 min de reação para 41,08 % após 3h de reação e a xilana permaneceu quase inalterada.

**Tabela 4:** Composição química (% , massa seca) do nó pré-tratado em meio ácido (5, 10 e 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m), alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) e oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 horas).

Pré-tratamento	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Ácido acético (%)	Lignina (%)	Total (%)
<i>In natura</i>	38,61 ± 0,91	21,85 ± 0,53	4,20 ± 0,53	3,42 ± 0,04	33,59 ± 2,14	101,67
Ácido 5%	38,47 ± 2,82	5,89 ± 0,17	2,07 ± 0,17	1,69 ± 0,16	42,67 ± 0,72	90,84
Ácido 10%	42,20 ± 2,69	4,95 ± 0,15	1,44 ± 0,15	1,17 ± 0,02	30,46 ± 2,61	80,22
Ácido 20%	41,96 ± 3,67	4,05 ± 0,17	0,64 ± 0,17	0,52 ± 0,32	41,96 ± 13,39	89,11
Alcalino 5%	39,61 ± 5,29	12,26 ± 0,50	0,60 ± 0,17	0,86 ± 0,13	27,28 ± 1,53	81,08
Alcalino 10%	40,75 ± 2,00	10,51 ± 0,13	0,39 ± 0,34	0,28 ± 0,17	17,33 ± 0,14	69,21
Alcalino 20%	53,59 ± 6,65	13,45 ± 0,43	0,39 ± 0,29	0,24 ± 0,15	12,59 ± 0,21	80,16
Alcalino 30%	42,55 ± 10,55	12,19 ± 1,00	0,56 ± 0,45	0,36 ± 0,02	7,63 ± 0,04	63,18
Oxidativo 0,5h	38,20 ± 1,95	23,91 ± 1,75	2,81 ± 0,11	2,29 ± 0,09	34,21 ± 4,26	101,42
Oxidativo 1h	38,52 ± 0,03	22,35 ± 0,56	3,37 ± 0,14	2,75 ± 0,11	28,90 ± 5,70	95,86
Oxidativo 2h	39,38 ± 0,26	22,26 ± 0,80	3,43 ± 0,23	2,80 ± 0,19	23,40 ± 1,82	91,27
Oxidativo 3h	41,08 ± 3,55	22,38 ± 0,64	3,35 ± 0,52	2,73 ± 0,42	11,65 ± 5,21	81,18

Lignina = lignina solúvel + lignina insolúvel

Pré-tratamento oxidativo foi realizado com 1,5 g de clorito de sódio e 0,5 mL de ácido acético, repetindo carga de reagentes a cada hora de reação

Após pré-tratamento ácido do entrenó em condições 10 %, o teor de celulose aumentou para 48,64 % e em ácido 20 % foi para 50,49 % (Tabela 5). A xilana sofreu perda em seu conteúdo, diminuindo para 4,49% em condições de ácido 5% e para 3,24% em concentrações de ácido 20 %. A lignina aumentou em porcentagem, subindo para 36,61% em condições de ácido 5 % e para 34,33 % em concentrações de 20%. O pré-tratamento alcalino causou perdas de lignina, caindo para 25,78 % em concentrações de álcali 5 % e para 13,51 % em condições alcalinas de 30 %. Perdendo conteúdo, a xilana diminuiu para 12,27 % em

condições de álcali 5 % e para 12,81 % em condições alcalinas de 30 %. A celulose mostrou perda de conteúdo para 36,66 % em condições de álcali 5 %, porém aumentou para 51,35% em concentrações alcalinas de 30 %. O pré-tratamento oxidativo causou perdas de celulose e xilana e aumento da porcentagem de lignina com maiores tempos de reação. A celulose apresentou porcentagem entre 35,1 % (após 0,5 h de reação) e 33,69 % (após 3 h). A xilana sofreu perda de conteúdo, chegando a 13,1% após 3 h de reação e a lignina sofreu aumento em porcentagem, atingindo 36,3 % após 30 min de reação e 34,3 % após 3 h.

**Tabela 5:** Composição química (% , massa seca) do entrenó pré-tratado em meio ácido (5, 10 e 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m), alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) e oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 horas).

Pré-tratamento	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Ácido acético (%)	Lignina (%)	Total (%)
<i>In natura</i>	45,55 ± 3,68	22,64 ± 1,68	4,34 ± 0,17	3,53 ± 0,13	26,57 ± 1,39	102,63
Ácido 5%	40,32 ± 0,46	4,49 ± 0,32	1,76 ± 0,13	1,43 ± 0,10	36,61 ± 0,05	84,65
Ácido 10%	48,64 ± 0,61	4,05 ± 0,23	1,48 ± 0,05	1,20 ± 0,04	33,80 ± 0,18	89,26
Ácido 20%	50,49 ± 0,64	3,24 ± 0,29	0,95 ± 0,06	0,78 ± 0,05	34,33 ± 0,25	89,99
Alcalino 5%	36,66 ± 1,38	12,47 ± 1,53	0,60 ± 0,37	0,49 ± 0,30	25,78 ± 3,65	75,99
Alcalino 10%	49,06 ± 4,23	14,16 ± 0,50	0,39 ± 0,01	0,32 ± 0,01	19,59 ± 4,12	83,52
Alcalino 20%	58,28 ± 4,81	15,09 ± 0,41	0,39 ± 0,01	0,32 ± 0,01	13,86 ± 2,14	87,94
Alcalino 30%	51,35 ± 9,72	12,81 ± 1,90	0,56 ± 0,15	0,46 ± 0,15	13,51 ± 3,18	78,68
Oxidativo 0,5h	35,10 ± 1,27	9,27 ± 0,95	4,07 ± 0,17	3,32 ± 0,04	36,30 ± 8,96	88,06
Oxidativo 1h	37,75 ± 0,31	10,91 ± 0,15	3,45 ± 0,47	2,81 ± 0,07	53,91 ± 13,14	108,84
Oxidativo 2h	37,42 ± 1,85	10,75 ± 0,34	4,07 ± 0,39	3,32 ± 0,41	23,41 ± 5,58	78,96
Oxidativo 3h	33,69 ± 1,80	13,10 ± 0,74	1,28 ± 0,18	1,05 ± 0,03	34,30 ± 4,56	83,43

Lignina = lignina solúvel + lignina insolúvel

Pré-tratamento oxidativo foi realizado com 1,5 g de clorito de sódio e 0,5 mL de ácido acético, repetindo carga de reagentes a cada hora de reação

O teor de lignina aumentou após pré-tratamento ácido em amostras de folha, subindo para 58,09 % em concentrações de ácido 5 %, para 58,22 % com ácido 10% e 63,12 % com ácido 20 % (Tabela 6). A xilana diminuiu seu teor para 6,92 % em concentrações de ácido 5%, para 4,63 % com ácido 10% e 3,49 % com ácido 20%. A celulose sofreu pequeno decréscimo no seu teor, resultando em 36,39 % em condições de ácido 5 %, porém apresentou aumento no seu teor chegando a 37,31 % em condições de 20%. Após ser pré-tratada em condições alcalinas, a folha mostrou aumento no teor de celulose em concentrações de álcali 10 e 20 %, com 49,01 e 53,89 %, respectivamente. A xilana teve seu teor reduzido em condições alcalinas, ficando entre 8,52 % e 13,6 %. A lignina diminuiu para 35,17 % em condições alcalinas de 5 % e para 31,68 % em concentrações de álcali 30 %. O pré-tratamento

oxidativo se mostrou um agente deslignificante eficiente em amostras de folha. Após 0,5 h de reação, o teor de lignina no material foi de 19,97 %, após 3 h esse esse conteúdo foi de 1,45%. A porcentagem de xilana diminuiu para 13,93 % após 30 min e para 22,13 % após 3 h. A porcentagem de celulose ficou entre 37,08 % e 39,12 % até 2h de reação, e após 3h aumentou para 44 %.

**Tabela 6:** Composição química (% , massa seca) da folha pré-tratada em meio ácido (5, 10 e 20 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m), alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m) e oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 horas).

Pré-tratamento	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Ácido acético (%)	Lignina (%)	Total (%)
<i>In natura</i>	37,25 ± 1,00	20,72 ± 0,32	1,48 ± 0,03	1,20 ± 0,02	40,80 ± 4,18	101,44
Ácido 5%	36,39 ± 3,06	6,92 ± 1,63	1,04 ± 0,00	0,85 ± 0,00	58,09 ± 5,72	103,35
Ácido 10%	37,77 ± 1,13	4,63 ± 0,20	1,18 ± 0,45	0,96 ± 0,36	58,22 ± 2,53	102,77
Ácido 20%	37,31 ± 1,54	3,49 ± 0,36	0,20 ± 0,20	0,17 ± 0,17	63,12 ± 7,12	104,28
Alcalino 5%	33,56 ± 0,05	8,52 ± 0,59	0,46 ± 0,03	0,37 ± 0,02	35,17 ± 4,16	78,09
Alcalino 10%	49,01 ± 0,17	10,19 ± 0,62	0,60 ± 0,09	0,49 ± 0,07	37,28 ± 5,60	97,56
Alcalino 20%	53,89 ± 2,52	9,13 ± 0,79	0,85 ± 0,24	0,69 ± 0,20	20,68 ± 8,67	85,24
Alcalino 30%	37,10 ± 0,86	13,60 ± 0,24	2,39 ± 0,03	1,95 ± 0,02	31,68 ± 0,67	86,72
Oxidativo 0,5h	37,08 ± 0,52	13,93 ± 0,37	1,37 ± 0,05	1,12 ± 0,04	19,97 ± 1,35	73,47
Oxidativo 1h	37,45 ± 1,16	14,69 ± 0,34	1,16 ± 0,06	0,94 ± 0,05	13,24 ± 0,35	67,49
Oxidativo 2h	39,12 ± 1,76	14,01 ± 0,62	1,55 ± 0,00	1,26 ± 0,00	8,62 ± 2,91	64,56
Oxidativo 3h	44,00 ± 0,60	22,13 ± 0,76	1,42 ± 0,05	1,16 ± 0,04	1,45 ± 0,00	70,17

Lignina = lignina solúvel + lignina insolúvel

Pré-tratamento oxidativo foi realizado com 1,5 g de clorito de sódio e 0,5 mL de ácido acético, repetindo carga de reagentes a cada hora de reação

O pré-tratamento ácido atuou na hemicelulose provocando sua remoção (AGUILAR et al., 2002), e os pré-tratamentos alcalino e oxidativo atuaram removendo lignina e hemicelulose (MARYANA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2013). Com a remoção de xilana e ou lignina, ocorreu um aumento no teor de celulose. A fração externa mostrou-se mais resistente ao pré-tratamento ácido, tendo maior teor de celulose em concentrações de ácido 20 %. Entretanto, foi eficiente na remoção de hemicelulose em todas as frações, como reportado na literatura (BRIENZO et al., 2014). Dentre os três pré-tratamentos, o alcalino foi o mais eficiente em aumentar o teor de celulose no material, pois amostras com baixo teor de lignina tendem a apresentar alto conteúdo de açúcares (BRIENZO et al., 2017). Amostras de entrenó pré-tratadas em meio alcalino com concentrações de 20 % chegaram a possuir teor de celulose de 58,28 %, maior valor observado levando-se em consideração todas as amostras. Reação



esperada de uma fração menos recalcitrante (BRIENZO et al., 2014). Estudos com folhas de outros materiais conseguiram reduzir as hemiceluloses do material até 9,4 % através de pré-tratamentos ácidos (SANTOS et al., 2018), comportamento igual ao apresentado pela folha de cana-de-açúcar, com 3,49 % em concentrações de ácido 20 % (Tabela 4). O conteúdo de extrativos nos materiais pode ter mascarado o aumento ou diminuição de alguns componentes.

O pré-tratamento alcalino do nó causou queda no conteúdo de lignina muito similar ao observado na literatura (7,79 %), chegando a 7,63 % (Tabela 2). No entanto, apesar de também ter sofrido perdas, o entrenó mostrou 13,51 % de lignina em concentrações de álcali 30% (Tabela 3), enquanto valores de 5,22 % foram alcançados em outro estudo (BRIENZO et al., 2016). Pré-tratamentos utilizando clorito de sódio foram realizados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar, reduzindo os níveis de lignina para 6,7 % e aumentando os níveis de celulose para 59,7 % (SIQUEIRA et al., 2013), resultado próximo apenas da amostra de folha pré-tratada por 3h (1,45 %) (Tabela 4).

### **5.3. Acessibilidade à celulose**

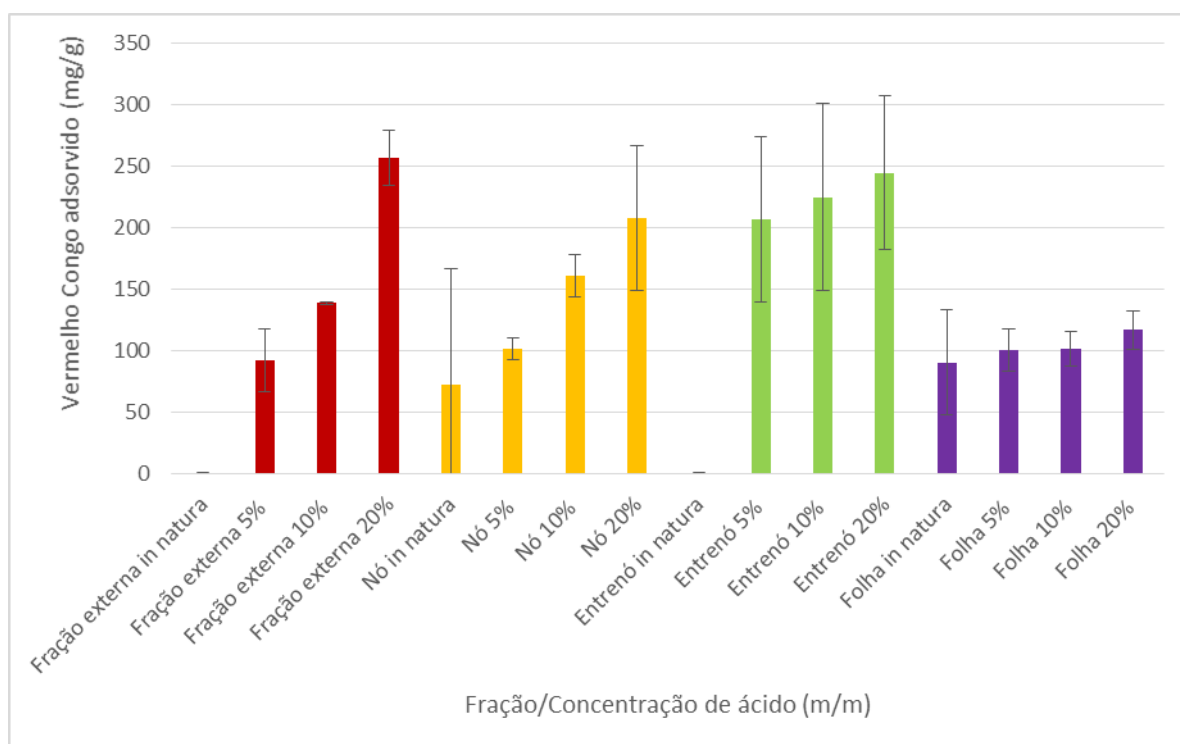
Todas as frações da biomassa de cana-de-açúcar (entrenó, nó, fração externa e folha) foram submetidas a diferentes pré-tratamentos ácido, alcalino e oxidativo em diferentes condições de concentração de reagente (severidade). O pré-tratamento tem como objetivo desorganizar a estrutura da parede celular, removendo hemicelulose, removendo/modificando lignina, e assim expondo a celulose (BRIENZO et al., 2015). A superfície exposta da celulose, acessível a ação de enzimas, foi determinada pela adsorção do corante Vermelho Congo (superfície total) e os corantes Direct Blue (superfície específica interna) e Direct Orange (superfície específica externa).

#### **5.3.1 Determinação da acessibilidade com Vermelho Congo**

A fração externa após pré-tratamento ácido mostrou aumento de adsorção do corante Vermelho Congo com o aumento da concentração de ácido (Figura 20). Após pré-tratamento com condições de ácido 5 %, a amostra adsorveu 92,3 mg/g de corante, enquanto condições mais concentradas com 10 % de ácido, geraram uma amostra que adsorveu 139,21 mg/g. A maior adsorção obtida foi da amostra pré-tratada com ácido 20 %, sendo 257,23 mg/g. Após pré-tratamento ácido em condições 5 %, a amostra de nó adsorveu 72,6 mg/g de corante. Aumentando a severidade para 10 %, a adsorção sobe para 161,2 mg/g e, aumentando mais uma vez a severidade (20 %), o valor sobe para 208,4 mg/g. A adsorção mostrou leve crescimento com o aumento de severidade em amostras de entrenó, porém os resultados são

estatisticamente muito semelhantes. Condições mais brandas de pré-tratamento geraram material que adsorveu 207,1 mg/g de corante. Em condições de ácido 10 % obteve-se 225,1 mg/g e em ácido 20 % o valor sobe para 245 mg/g. Condições de ácido 5 % em amostras de folha obtiveram resultados de 90,8 mg/g, enquanto condições de ácido 10 % mostram 101,9 mg/g de corante adsorvido nas amostras. Condições severas de ácido 20 % mostram valor semelhante com 100 mg/g de corante adsorvido.

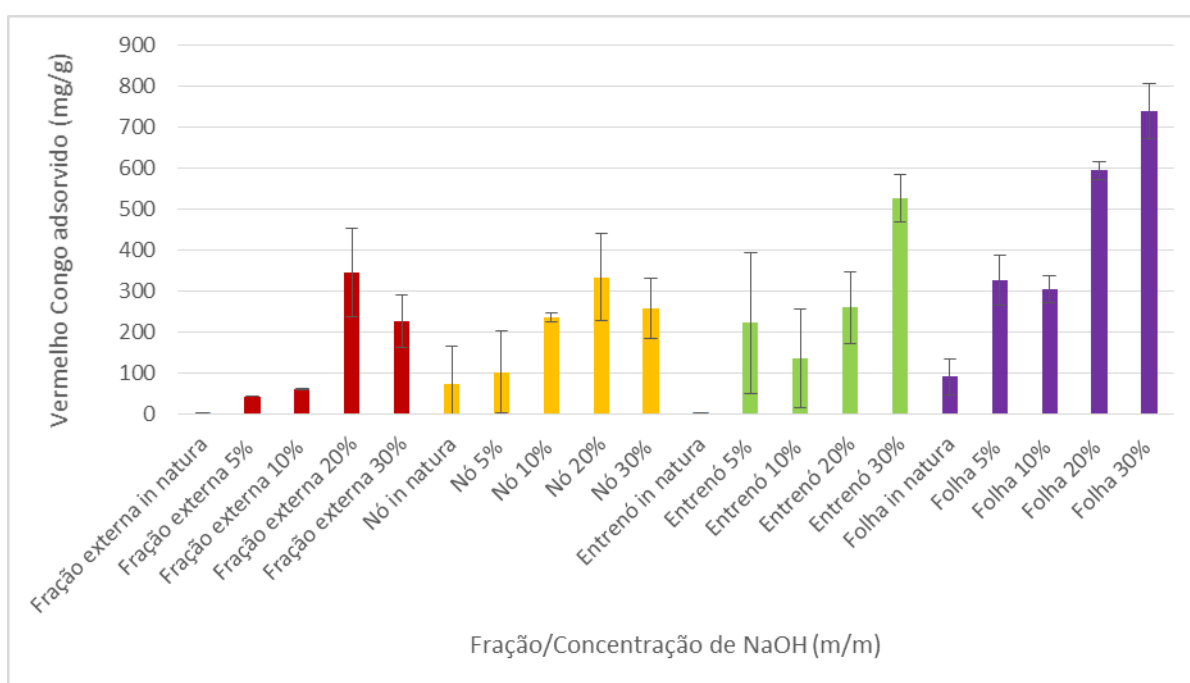
**Figura 20:** Adsorção do corante Vermelho Congo (mg/g) em amostras de fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5, 10 e 20 % m/m, a 121°C/30 min).



Os menores valores de corante adsorvido após pré-tratamento alcalino em amostras de fração externa vêm das condições de álcali 5 % e 10 % com 42,8 mg/g e 61,2 mg/g, respectivamente (Figura 21). A maior adsorção veio da amostra pré-tratada em condições de 20%, obtendo 354,5 mg/g de corante adsorvido. A amostra pré-tratada mais severamente obteve 225,6 mg/g de corante adsorvido. Amostras de nó pré-tratadas com NaOH mostram aumento na adsorção de corante Vermelho Congo até condições de 20 %. Os valores partem de 102 mg/g em condições de álcali 5 % para 235,9 mg/g em condições alcalinas de 10 %. O maior valor vem da amostra em condições de 20 %, com 333,2 mg/g de corante adsorvido. A condição mais severa de pré-tratamento mostrou queda na adsorção para 258,2 mg/g. Entrenó

pré-tratado em condições alcalinas brandas mostrou adsorção de 221,8 mg/g. Condições de álcali 10 % geraram queda na adsorção para 135,3 mg/g de corante adsorvido. Condições mais agressivas de 20 % e 30 % apresentaram aumento na adsorção para 259,4 mg/g e 525,9 mg/g, respectivamente. Mostrando o padrão esperado, as amostras de folha pré-tratadas com NaOH partem de 325,4 mg/g e 304,1 mg/g em condições álcali 5 % e 10 % para 594,4 mg/g e 740,6 mg/g de corante adsorvido em condições mais agressivas de pré-tratamento (20 % e 30%).

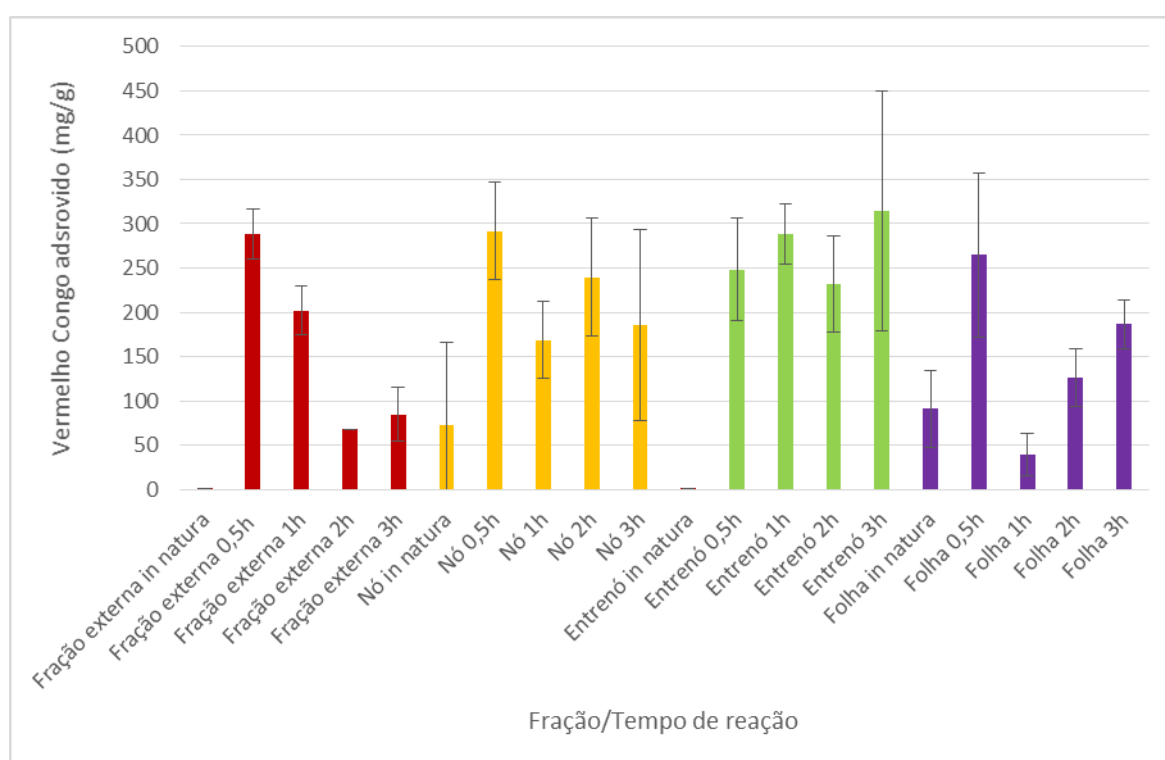
**Figura 21:** Adsorção do corante Vermelho Congo (mg/g) em amostras de fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento alcalino em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 % m/m, a 121°C/30 min).



Amostras de fração externa desdesignadas em condições oxidativas após 30 minutos de reação mostraram adsorção de 288,2 mg/g enquanto a amostras que passaram por condições severas (3 horas de reação) mostraram adsorção de 84,5 mg/g de corante adsorvido (Figura 22). Apesar de demonstrar queda na adsorção de corante, a sua composição química mostrou pouca alteração no teor de celulose e lignina, diminuindo somente xilana (Tabela 3). Similar à fração externa, as amostras de nó obtiveram maior adsorção nas amostras em pré-tratadas em condições brandas. Após 30 minutos de reação, as amostras mostraram adsorção de 291,8 mg/g enquanto as amostras que passaram por 3h de reação apresentaram 185,1 mg/g de Vermelho Congo adsorvido. A amostra de entrenó pré-tratada em condições brandas

manteve alta adsorção com 248,5 mg/g de Vermelho Congo adsorvido. No entanto, condições severas de reação geraram amostras que adsorveram 313,8 mg/g de corante, indicando aumento da superfície exposta da celulose. Similar a fração externa e nó, as amostras de folha apresentaram valor de adsorção mais elevado após 30 minutos de reação com 264,6 mg/g de corante adsorvido. Após 3h, a adsorção cai para 186,4 mg/g de Vermelho Congo adsorvido.

**Figura 22:** Adsorção do corante Vermelho Congo (mg/g) em amostras de fração externa, nó, entrenó e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento oxidativo em diferentes concentrações (0,5, 1, 2 e 3 horas a 70°C).



As amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio mostraram comportamento esperado, pois a remoção de hemicelulose (BRIENZO et al., 2017) e lignina (MENEZES et al., 2017) aumentou a superfície exposta da celulose e permitiu maior adsorção de corantes no material (Figuras 20, 21 e 22). Essas amostras apresentaram aumento na adsorção de Vermelho Congo com o aumento da concentração de reagente (severidade) do pré-tratamento. Porém, folha pré-tratada com ácido 30 % e fração externa e nó pré-tratados com NaOH 30 % mostraram valores de adsorção menores do que as condições imediatamente mais brandas (Figura 20, 21 e 22). Há casos na literatura onde os valores de adsorção de Vermelho Congo em condições mais severas de pré-tratamento são menores do que nas

condições brandas, possivelmente pela degradação da celulose (WIMAN et al., 2012). Provavelmente, condições severas podem levar ao colapso dos poros, provocando uma maior agregação das fibras, diminuindo a acessibilidade à celulose e conseqüentemente menor adsorção de corante.

Os resultados fora do esperado podem ter sido causados por essa tendência a imprecisão do corante em amostras pré-tratadas em condições mais agressivas, pois além do tempo de reação, concentrações maiores de clorito de sódio eram adicionadas a cada etapa do pré-tratamento. Esse pré-tratamento deslignifica o material, porém a caracterização química das amostras mostrou valores de celulose, xilana e lignina não compatíveis com a remoção usual (remoção de lignina, aumento de celulose). A molécula de Vermelho Congo é pequena ( $7.4 \text{ \AA} \times 4.3 \text{ \AA} \times 26.2 \text{ \AA}$ ), não distinguindo superfícies externa e interna da celulose e medindo a superfície total exposta (PELEKANI et al., 2001). O bagaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado na retirada de Vermelho Congo durante tratamento de água provinda de indústrias têxteis, aplicação que exige menos precisão no uso do corante (RAYMUNDO et al., 2010; ZHANG et al., 2011; YU et al., 2017 & PATHRBE et al., 2017). Porém, para determinação da acessibilidade uma maior precisão é necessária. Utilizando quatro réplicas nos experimentos observou-se um elevado desvio, o que dificulta seu uso na determinação da acessibilidade à celulose de material lignocelulósico.

### **5.3.1. Determinação da acessibilidade com Direct Orange e Blue (Simons' Stain)**

As superfícies interna e externa expostas da celulose foram determinadas pela adsorção dos corantes Direct Blue e Direct Orange após os pré-tratamentos ácido, alcalino e oxidativo. Estes corantes determinam as superfícies específicas interna e externa da celulose, respectivamente (CHANDRA et al., 2008). O material *in natura* apresentou baixa adsorção, tendo a fração externa com 11,3 mg/g de corantes adsorvidos e o nó com 24,9 mg/g de corantes adsorvidos como os menores valores. Entrenó e folha *in natura* mostraram adsorção maior com 106,8 mg/g e 145,6 mg/g de corantes adsorvidos, respectivamente. Condições brandas de pré-tratamento ácido geraram as menores adsorções de corante, com nó pré-tratado em condições de ácido 5 % mostrando valores de 35,5 mg/g de corante total adsorvido. O aumento de severidade no pré-tratamento causou aumento na adsorção em todas as frações. A maior adsorção obtida foi com a amostra de folha pré-tratada em ácido 10 %, com 957,2 mg/g de corantes adsorvidos.

**Tabela 7:** Máxima adsorção dos corantes Direct Orange e Direct Blue nas frações da biomassa de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento ácido (5, 10 e 20 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m).

<b>Amostra</b>	<b>Máxima adsorção DO (mg/g)</b>	<b>Máxima adsorção DB (mg/g)</b>	<b>Razão (DB/DO)</b>	<b>Total (mg/g)</b>
F. externa <i>in natura</i>	5,1	6,2	1,2	11,3
F. externa 5%	39,7	31,9	0,8	71,5
F. externa 10%	22,8	14,7	0,6	37,5
F. externa 20%	57,9	28,3	0,5	86,2
Nó <i>in natura</i>	5,4	19,5	3,6	24,9
Nó 5%	17,8	17,8	1,0	35,5
Nó 10%	15,6	48,0	3,1	63,6
Nó 20%	28,0	41,2	1,5	69,3
Entrenó <i>in natura</i>	89,3	17,5	0,2	106,8
Entrenó 5%	67,8	64,8	1,0	132,6
Entrenó 10%	458,7	306,7	0,7	765,5
Entrenó 20%	502,5	125,8	0,3	628,3
Folha <i>in natura</i>	85,6	60,0	0,7	145,6
Folha 5%	97,6	75,0	0,8	172,6
Folha 10%	540,5	416,7	0,8	957,2
Folha 20%	430,1	236,7	0,6	666,8

Total: somatório das adsorções dos corantes DO e DB;

DO: Direct Orange;

DB: Direct Blue.

Seguindo a tendência esperada e apresentado pelas amostras após pré-tratamento ácido, o pré-tratamento alcalino gerou amostras com crescente adsorção acompanhando o aumento na concentração de reagentes (Tabela 8). O entrenó apresentou o menor e o maior valor, com 517,7 mg/g de corantes adsorvidos após ser pré-tratado com álcali 5 % e 2196,6 mg/g de corantes adsorvidos após passar por condições de 20 %.

**Tabela 8:** Máxima adsorção dos corantes Direct Orange e Direct Blue nas frações da biomassa de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento alcalino (5, 10, 20 e 30 % NaOH m/m).

Amostra	Máxima adsorção DO (mg/g)	Máxima adsorção DB (mg/g)	Razão (DB/DO)	Total (mg/g)
F. externa <i>in natura</i>	5,1	6,2	1,2	11,3
F. externa 5%	51,3	66,7	1,3	117,9
F. externa 10%	51,3	61,5	1,2	112,8
F. externa 20%	250,0	116,4	0,5	366,4
F. externa 30%	357,1	181,8	0,5	539,0
Nó <i>in natura</i>	5,4	19,5	3,6	24,9
Nó 5%	166,7	117,6	0,7	284,3
Nó 10%	339,0	219,8	0,6	558,8
Nó 20%	392,2	222,2	0,6	614,4
Nó 30%	452,5	256,4	0,6	708,9
Entrenó <i>in natura</i>	89,3	17,5	0,2	106,8
Entrenó 5%	295,0	222,7	0,8	517,7
Entrenó 10%	947,9	724,1	0,8	1672,0
Entrenó 20%	1418,4	778,2	0,5	2196,6
Entrenó 30%	1333,3	746,3	0,6	2079,6
Folha <i>in natura</i>	85,6	60,0	0,7	145,6
Folha 5%	657,9	558,7	0,8	1216,6
Folha 10%	877,2	563,4	0,6	1440,6
Folha 20%	945,6	571,4	0,6	1517,1
Folha 30%	1069,5	630,9	0,6	1700,4

Total: somatório das adsorções dos corantes DO e DB;

DO: Direct Orange;

DB: Direct Blue.

Apresentando o mesmo comportamento dos outros dois pré-tratamentos, o experimento utilizando clorito de sódio aumentou as superfícies expostas da celulose com crescentes tempos de reação e concentrações de reagentes (Tabela 9). A menor adsorção foi observada na folha pré-tratada por 30 minutos, com 124,1 mg/g de corantes adsorvidos. O maior valor foi observado na amostra de fração externa após 3h de reação, com 2076,3 mg/g de corantes adsorvidos.

**Tabela 9:** Máxima adsorção dos corantes Direct Orange e Direct Blue nas frações da biomassa de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento oxidativo (0,5, 1, 2 e 3 h).

<b>Amostra</b>	<b>Máxima adsorção DO (mg/g)</b>	<b>Máxima adsorção DB (mg/g)</b>	<b>Razão (DB/DO)</b>	<b>Total (mg/g)</b>
F. externa <i>in natura</i>	5,1	6,2	1,2	11,3
F. externa 30 min	181,8	67,5	0,4	249,4
F. externa 1 h	769,2	294,1	0,4	1063,3
F. externa 2 h	704,2	800,0	1,1	1504,2
F. externa 3 h	1183,4	892,9	0,8	2076,3
Nó <i>in natura</i>	5,4	19,5	3,6	24,9
Nó 30 min	232,0	127,9	0,6	359,9
Nó 1 h	260,5	186,6	0,7	447,2
Nó 2 h	302,6	307,2	1,0	609,8
Nó 3 h	391,4	64,2	0,2	455,6
Entrenó <i>in natura</i>	89,3	17,5	0,2	106,8
Entrenó 30 min	124,0	505,1	4,1	629,0
Entrenó 1 h	261,1	716,8	2,7	977,9
Entrenó 2 h	621,1	418,4	0,7	1039,6
Entrenó 3 h	985,1	341,9	0,3	1327,0
Folha <i>in natura</i>	85,6	60,0	0,7	145,6
Folha 30 min	80,5	43,6	0,5	124,1
Folha 1 h	155,0	92,9	0,6	247,9
Folha 2 h	444,4	87,4	0,2	531,8
Folha 3 h	430,1	137,4	0,3	567,5

Total: somatório das adsorções dos corantes DO e DB;

DO: Direct Orange;

DB: Direct Blue.

Todas as frações da biomassa de cana-de-açúcar pré-tratadas tiveram sua estrutura modificada, resultando em uma maior adsorção de corantes, o que indica maior acessibilidade (BRIENZO et al., 2017; CHANDRA et al., 2008). A remoção da hemicelulose e da lignina, além do aumento e alterações na distribuição dos poros permitem que o corante Direct Orange seja adsorvido na superfície exposta da celulose. O corante Direct Blue tem menos afinidade pela celulose e é menor que o Direct Orange, penetrando em regiões da superfície exposta da celulose onde as celulasas, que possuem tamanho similar às moléculas de Direct Orange, podem não chegar (YU et al., 1995). Sendo assim, a acessibilidade à celulose pode ser inferida não só pela quantidade total de corantes adsorvidos, mas também pela maior quantidade de Direct Orange adsorvida em relação a quantidade de Direct Blue adsorvido. Maior quantidade de Direct Orange adsorvido significa maior superfície da celulose acessível



a celulasas (SIQUEIRA et al., 2017). Todas as amostras mostraram maior quantidade de Direct Orange adsorvida com o aumento da severidade dos pré-tratamentos.

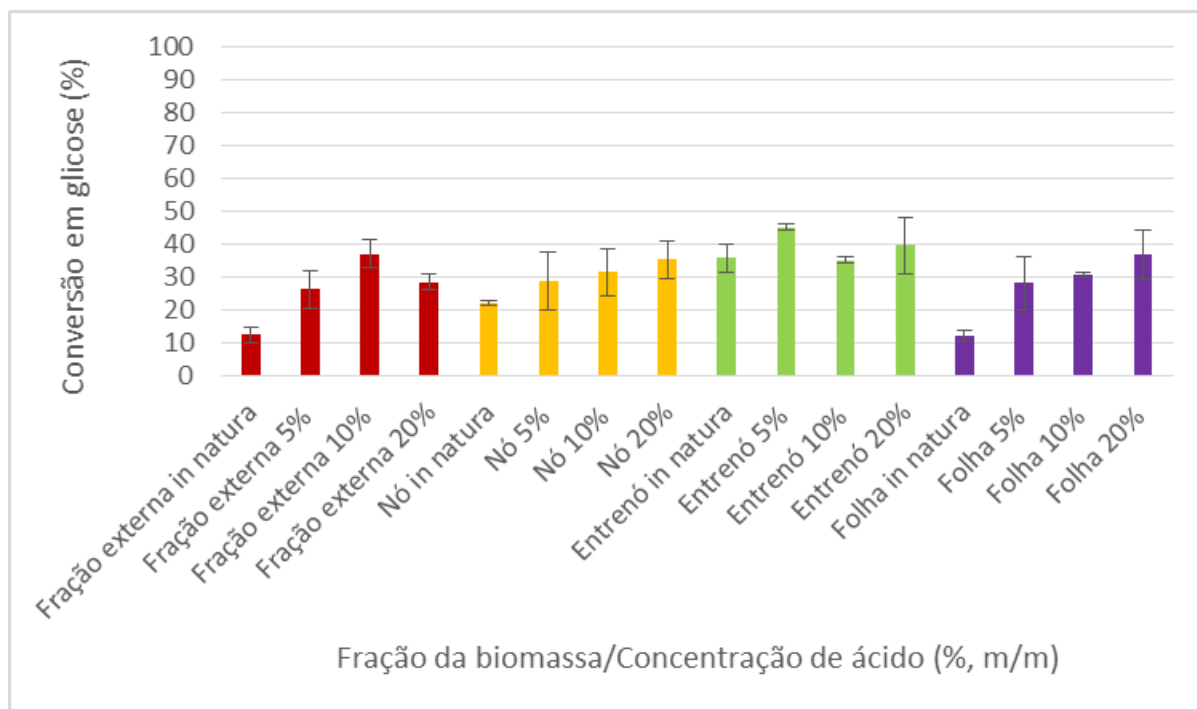
Diferentemente do Vermelho Congo, os corantes Direct Orange e Direct Blue mostraram maior precisão ao apontar aumento de acessibilidade e existem muitos exemplos de sua utilização na literatura recente (WIMAN et al., 2012; BRIENZO et al., 2015, 2017; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018; XUE et al., 2018). A determinação de adsorção com os corantes Direct Orange e Direct Blue utiliza um conjunto de 6 tubos para cada amostra, com diferentes concentrações dos corantes. A determinação da máxima adsorção leva a resultados mais precisos.

#### **5.4. Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática das amostras foi realizada para avaliar o efeito da remoção de hemicelulose e lignina do material na digestibilidade da celulose. As biomassas/frações da cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas em meio ácido, alcalino e oxidativo foram submetidas a hidrólise enzimática. A fração externa *in natura* resultou em 12,46 % de celulose convertida a glicose, o nó 22,11 %, o entrenó 35,72 % e a folha 11,96% (Figuras 25, 26 e 27).

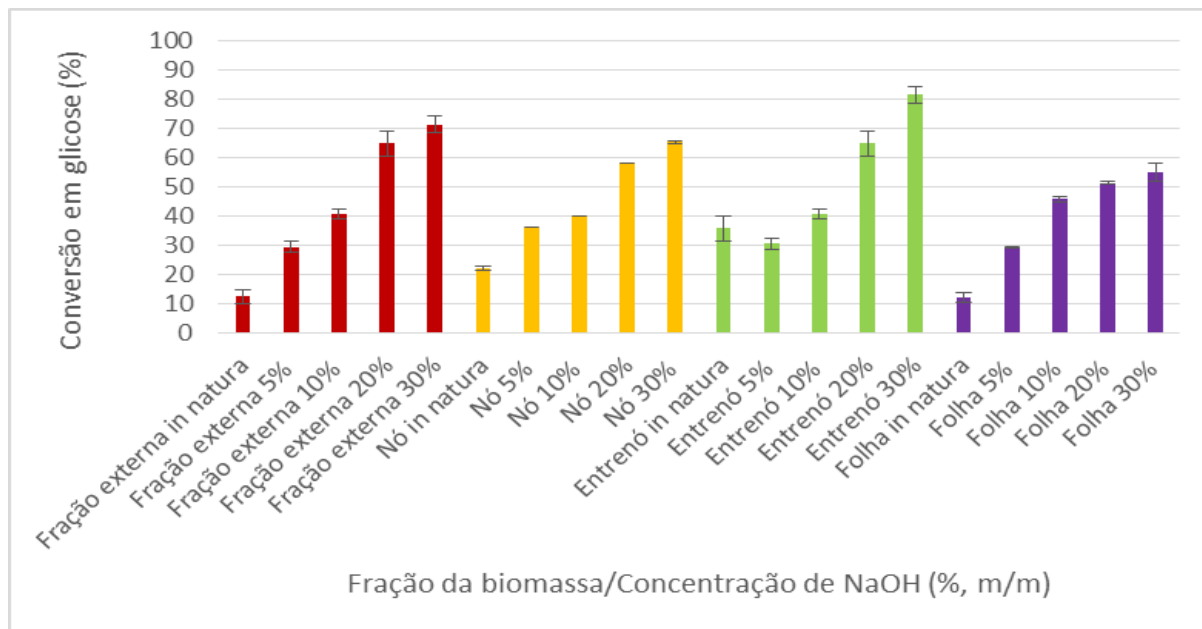
Após pré-tratamento ácido em concentrações de 5 % (m/m), a fração externa obteve aumento para 26,31 % no rendimento em glicose (Figura 23). O rendimento máximo em glicose foi com 10%, resultando em 37,01 %. O nó apresentou melhor rendimento em glicose com ácido 20 %, resultando em 35,39 % de glicose. Entretanto, o pré-tratamento não afetou o nó de modo a diminuir sua recalcitrância e elevar o rendimento em glicose. De fato, a acessibilidade do nó após o pré-tratamento ácido foi pouco alterada (Tabela 7). A amostra de entrenó pré-tratadas em ácido 5 % resultou no maior rendimento em glicose com 45,06 %. Apesar de ser a fração menos recalcitrante *in natura*, mostrou baixo rendimento em glicose na hidrólise enzimática com o pré-tratamento ácido. Este resultado está em desacordo com a acessibilidade, que apresentou grande alteração em função da concentração de ácido (Tabela 7). A folha em condições de ácido 5 % aumentou para 28,25 % sua conversão em glicose. Condições de ácido 10 % resultaram em 30,65 % e concentrações de ácido 20% chegaram a 36,83 %.

**Figura 23:** Rendimento em glicose (%) na hidrólise enzimática da fração externa, nó, entrenó e folha da cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com ácido (5, 10 e 20% m/m, a 121°C/30 min).



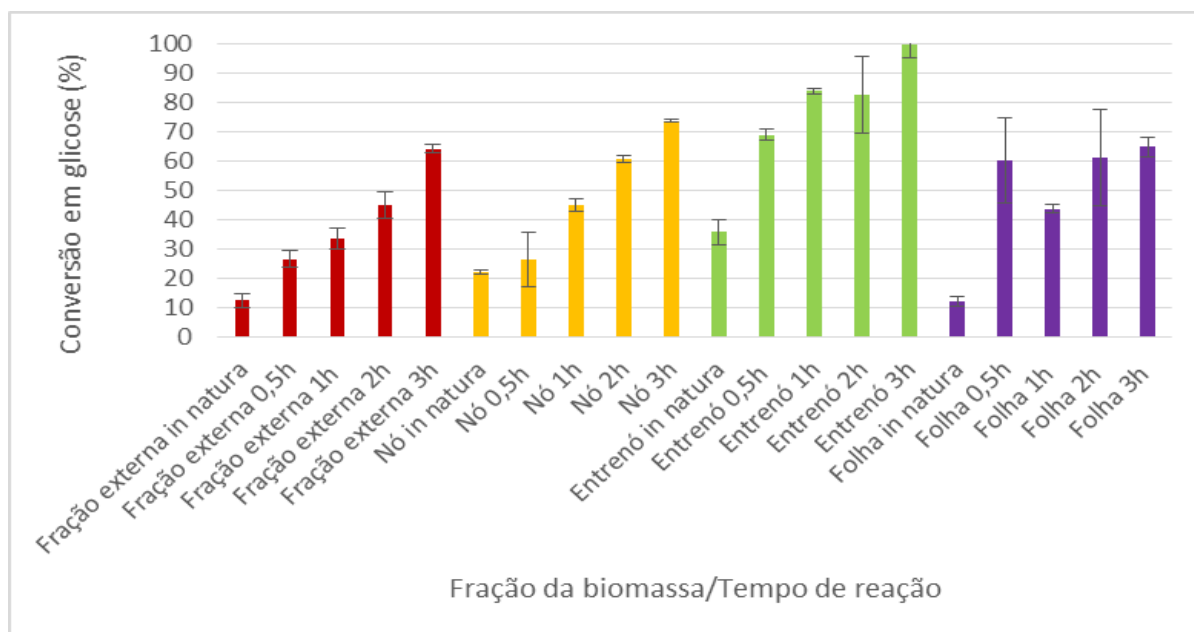
A fração externa pré-tratada com álcali 5 % resultou em aumento para 29,43 % em glicose convertida, enquanto as condições de 10, 20 e 30 % aumentaram os valores para 40,71%, 64,87 % e 71,51 %, respectivamente (Figura 24). Após pré-tratamento alcalino de 5%, amostras de nó apresentaram 36,07 % em glicose. Condições de 10 % e 20 % geraram valores de 39,98 % e 58,21 %, respectivamente. Condições de álcali 30% resultaram em 65,41% em rendimento. O entrenó apresentou melhores rendimentos em glicose a partir de 10 % de álcali, 40,71 e 64,87 % em condições de 10 % e 20 % e resultou em 81,59 % em concentrações alcalinas de 30 %. Amostras de folha pré-tratadas com álcali 5% apresentaram aumento para 29,19 % em glicose e, com o aumento da concentração de álcali do pré-tratamento para 10, 20 e 30 %, alcançou 45,82, 51,39 % e 54,95 % de rendimento em glicose, respectivamente.

**Figura 24:** Rendimento em glicose (%) na hidrólise enzimática da fração externa, nó, entrenó e folha da cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com NaOH (5, 10, 20 e 30% m/m, a 121°C/30 min).



Amostras de fração externa pré-tratadas com clorito de sódio (oxidativo) apresentaram rendimento em glicose beneficiada pelo aumento de tempo de reação e da concentração de reagentes (Figura 25). Após 30 min de reação, a fração externa apresentou aumento para 26,57 % em glicose, subindo para 33,38 % após 1h, 44,96 % após 2h e para 64,26 % após 3h. Similarmente, o nó apresentou aumento a partir de 1h, resultando em 45,09% de rendimento em glicose, 60,73 % após 2h e para 73,89 % após 3h de reação. O melhor resultado foi com o entrenó, que apresentou rendimento em glicose de 69,13 % após 30 minutos de reação e, após 3h, alcançou 100%. De fato, os dados estão de acordo com a acessibilidade à celulose, que aumentou com as condições do pré-tratamento (Tabela 9). Após uma e 2h, o entrenó obteve 84,05 % e 82,81 % de rendimento em glicose. O aumento de conversão apresentado nas amostras de folha começam com 60,14 % em glicose após 30 minutos de pré-tratamento, 43,73 % após 1h, 61,3 % após 2h e atingiu 64,94 % em glicose após 3h de reação.

**Figura 25:** Rendimento em glicose (%) na hidrólise enzimática da fração externa, nó, entrenó e folha da cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com clorito de sódio (0,5, 1, 2 e 3 horas a 70°C).



Os três pré-tratamentos resultaram em hidrólises mais eficientes, mas os pré-tratamentos alcalino e oxidativo, os quais causam deslignificação (Figuras 21 e 22) (MARYANA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2013), mostraram resultados bem definidos em comparação ao pré-tratamento ácido. O aumento na concentração de reagentes e tempo de reação nos pré-tratamentos alcalino e oxidativo resultou em aumento na hidrólise enzimática de forma proporcional. A fração externa foi identificada como mais recalcitrante na hidrólise enzimática, o que está de acordo com a literatura.

O maior valor obtido de rendimento em glicose entre todas as frações e pré-tratamentos foi com o entrenó. A amostra pré-tratada com álcali 30 % apresentou 81,59 % de rendimento em glicose, enquanto a pré-tratada com clorito de sódio alcançou 100 % (Figura 22). Esses valores se destacam, porém, as outras frações e condições de pré-tratamento nesses dois casos também indicam com mais precisão o aumento na acessibilidade à celulose. Outros estudos com bagaço de cana-de-açúcar chegaram a valores parecidos após um pré-tratamento deslignificante, atingindo conversões de 82 a 92 % (SIQUEIRA et al., 2017). O melhor desempenho dos pré-tratamentos alcalino e oxidativo durante a hidrólise pode estar relacionada com o teor de lignina, pois a literatura já demonstrou elevado rendimento em glicose pode ser obtido com amostras com baixo teor de lignina (BRIENZO et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2017). No entanto, como a estrutura do material é heterogênea,

experimentos visando 100 % de conversão ficam próximos, mas dificilmente atingem esse valor de rendimento (SIQUEIRA et al., 2013).

### **5.5. Análise conjunta dos resultados**

O fim desse trabalho é mostrar a influência da remoção de lignina e hemicelulose da biomassa lignocelulósica. Amostras que passaram por pré-tratamentos alcalinos e oxidativos tiveram lignina removida (Tabelas 3, 4, 5 e 6) tiveram melhor rendimento em glicose após hidrólise enzimática (Figuras 24 e 25). O pré-tratamento ácido não obteve rendimento equiparado aos outros pré-tratamentos, porém a remoção de hemicelulose (Tabela 3, 4, 5 e 6) causou aumento no conteúdo de celulose e também melhorou a eficiência da hidrólise (Figura 25). Os corantes apontaram aumento na acessibilidade à celulose, sendo mais adsorvidos em amostras pré-tratadas com hidróxido de sódio e clorito de sódio (Tabelas 8 e 9) (Figuras 23 e 24) e tendo sua máxima adsorção elevada com o aumento das concentrações de reagentes durante os pré-tratamentos (Tabelas 7, 8 e 9) (Figuras 20, 21 e 22). Tais resultados mostram o aumento de acessibilidade à celulose e de digestibilidade enzimática com a aplicação de pré-tratamentos em concentrações mais elevadas e principalmente em pré-tratamentos deslignificantes, destacando a importância da retirada de hemicelulose e lignina da biomassa lignocelulósica.

## 6. CONCLUSÃO

O aumento na concentração de reagentes (severidade) dos pré-tratamentos resultou em menor porcentagem de massa recuperada das amostras, indicando a remoção de componentes da biomassa. A menor recuperação de massa foi para o pré-tratamento ácido com a fração externa (37,3 %). Por outro lado, a maior recuperação de massa foi com o pré-tratamento oxidativo aplicado no nó (90 %). O pré-tratamento alcalino aumentou o teor de celulose mais eficientemente em todas as frações, porém o oxidativo foi capaz de remover quase toda a lignina da folha (1,45 %).

O teor de hemicelulose caiu após todos os pré-tratamentos, como foi evidenciado pela caracterização química. Porém, o pré-tratamento ácido foi mais eficiente que os outros dois, principalmente em amostras de entrenó. A fração externa foi a mais resistente na retirada de hemicelulose por meio de pré-tratamento ácido. A folha pré-tratada com clorito de sódio e ácido acético teve a maior quantidade de lignina removida, porém em todas as outras frações o pré-tratamento alcalino removeu mais lignina. A fração com maior quantidade de lignina removida foi a folha após pré-tratamento alcalino.

Os três corantes utilizados nesse trabalho (Vermelho Congo, Direct Orange e Blue) permitiram a determinação da acessibilidade à celulose, através da sua superfície exposta. O estudo com corantes demonstrou que ocorreu aumento da acessibilidade à celulose como um efeito dos pré-tratamentos e de suas condições empregadas. Uma relação diretamente proporcional foi observada entre a concentração de reagentes utilizados no pré-tratamento com a adsorção de corantes, ou seja, com a acessibilidade à celulose.

A adsorção do corante Vermelho Congo apresentou relação direta com o aumento de concentração dos reagentes de pré-tratamento, indicando aumento na acessibilidade à celulose. Entretanto, a adsorção de corante mostrou-se semelhante para muitos casos, o que teve influência dos desvios padrões. Provavelmente, a afinidade do Vermelho Congo à celulose não foi alta o suficiente, e provocou essa variação nos resultados. Os corantes Direct Blue e Direct Orange, por outro lado, determinaram com maior eficiência o aumento de adsorção resultante da remoção de hemicelulose e lignina provocada pelos pré-tratamentos.

A hidrólise enzimática corroborou a acessibilidade à celulose determinada pelos corantes Vermelho Congo e Direct Blue e Orange. Os rendimentos de hidrólise enzimática foram coerentes com o efeito dos pré-tratamentos, os quais foram capazes de remover lignina (alcalino e oxidativo) e tornaram a celulose mais acessível para ação das enzimas, resultando em melhor conversão em glicose. De fato, o aumento na concentração de reagentes (severidade) dos pré-tratamentos, foi acompanhado por um aumento na conversão em glicose

na hidrólise enzimática. Frações menos recalcitrantes, como o entrenó, somadas aos pré-tratamentos em condições com maior concentração de reagentes chegaram a altos rendimentos de conversão (100 % em entrenó após pré-tratamento oxidativo).

O entrenó mostrou-se como a fração menos recalcitrante, seguido do nó e da folha. A fração externa foi a fração mais recalcitrante, característica observada em todos os experimentos. A remoção de lignina e hemicelulose por meio dos pré-tratamentos ácido, alcalino e oxidativo proporcionou aumento na superfície exposta da celulose (evidenciado pelos corantes) e beneficiou a hidrólise enzimática por meio de celulasas, aumentando o rendimento em glicose das frações. A maior área específica exposta e a melhor conversão em glicose apontam para a influência positiva da retirada dos componentes da biomassa na acessibilidade à celulose em todas as frações do bagaço de cana-de-açúcar.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HALIM, E. S. (2014). Chemical modification of cellulose extracted from sugarcane bagasse: Preparation of hydroxyethyl cellulose. **Arabian Journal of Chemistry**, 7(3), 362-371.

ACHYUTHAN, K. E., ACHYUTHAN, A. M., ADAMS, P. D., DIRK, S. M., HARPER, J. C., SIMMONS, B. A., & SINGH, A. K. (2010). Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, 15(12), 8641-8688.

ADSUL, M. G., GHULE, J. E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K. B., GOKHALE, D. V., & VARMA, A. J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, 57(1), 67-72.

AGARWAL, U. P. (2006). Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). **Planta**, 224(5), 1141.

AGUILAR, R., RAM\_IREZ, J.A., GARROTE, G., & VAZQUEZ, M. (2002) Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, 55 (4), 309–318

ALONSO, D. M., HAKIM, S. H., ZHOU, S., WON, W., HOSSEINAEI, O., TAO, J., & HOUTMAN, C. J. (2017). Increasing the revenue from lignocellulosic biomass: Maximizing feedstock utilization. **Science advances**, 3(5), e1603301.

ARANTES, V., & SADDLER, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, 3(1), 1.

ARANTES, V., & SADDLER, J. N. (2011). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, 4(1), 1

ARGYROPOULOS, D. S., & MENACHEM, S. B. (1998). Lignin. In *Biopolymers from renewable resources* (pp. 292-322). **Springer Berlin Heidelberg**

AZMAN, S., KHADEM, A. F., VAN LIER, J. B., ZEEMAN, G., & PLUGGE, C. M. (2016). Presence and Role of Anaerobic Hydrolytic Microbes in Conversion of Lignocellulosic Biomass for Biogas Production (vol 45, pg 2523, 2015).

BATALHA, L.A., HAN, Q., JAMEEL, H., CHANG, H.M., COLODETTE, J.L., BORGES GOMES, F.J. (2015). Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis 13 after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**. 180, 97-105

BATTISTA, O. A. (1950). Hydrolysis and crystallization of cellulose. **Industrial & Engineering Chemistry**, 42(3), 502-507.



BENJAMIN, Y., CHENG, H., & GÖRGENS, J. F. (2013). Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial crops and products**, 51, 7-18.

BEZERRA, T. L., & RAGAUSKAS, A. J. (2016). A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**.

BRETT, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. **International review of cytology**, 199, 161-199.

BRIENZO, M., ABUD, Y., FERREIRA, S., CORRALES, R. C., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE SOUZA, W., & SANT'ANNA, C. (2016). Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Industrial Crops and Products**, 84, 305-313.

BRIENZO, M., FERREIRA, S., VICENTIM, M. P., DE SOUZA, W., & SANT'ANNA, C. (2014). Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, 7(4), 1454-1465.

BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. (2017). Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, 104, 271-280.

BRIENZO, M., TYHODA, L., BENJAMIN, Y., & GÖRGENS, J. (2015). Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, 32(2), 253-262.

BRIENZO, M., TYHODA, L., BENJAMIN, Y., & GÖRGENS, J. (2015). Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, 32(2), 253-262.

BRODEUR, G., YAU, E., BADAL, K., COLLIER, J., RAMACHANDRAN, K. B., & RAMAKRISHNAN, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme research**, 2011.

BROWN, L. M., HAWKINS, G. M., DORAN-PETERSON, J., LOVE, J., & BRYANT, J. A. (2017). Ethanol Production from Renewable Lignocellulosic Biomass. **Biofuels and Bioenergy**, 89-104.

BROWN, R. M. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 42(3), 487-495.

CALIARI, Í. P., BARBOSA, M. H., FERREIRA, S. O., & TEÓFILO, R. F. (2017). Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods. **Carbohydrate polymers**, 158, 20-28.

CANILHA, L., SANTOS, V. T., ROCHA, G. J., E SILVA, J. B. A., GIULIETTI, M., SILVA, S. S., ... & CARVALHO, W. (2011). A study on the pretreatment of a

sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 38(9), 1467-1475.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, A. F. A., MARCONDES, W. F., DE OLIVA NETO, P., PASTORE, G. M., SADDLER, J. N., & ARANTES, V. (2018). The potential of tailoring the conditions of steam explosion to produce xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, 250, 221-229.

CHANDRA, R. P., ARANTES, V., & SADDLER, J. (2015). Steam pretreatment of agricultural residues facilitates hemicellulose recovery while enhancing enzyme accessibility to cellulose. **Bioresource technology**, 185, 302-307.

CHANDRA, R. P., BURA, R., MABEE, W. E., BERLIN, D. A., PAN, X., & SADDLER, J. N. (2007). Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. In **Biofuels** (pp. 67-93). Springer Berlin Heidelberg.

CHANDRA, R. P., ESTEGHLALIAN, A. R., & SADDLER, J. N. (2008). Assessing substrate accessibility to enzymatic hydrolysis by cellulases. **Characterization of lignocellulosic materials**, 60-80.

CHUNDAWAT, S. P., BECKHAM, G. T., HIMMEL, M. E., & DALE, B. E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, 2, 121-145.

CHYLENSKI, P., FORSBERG, Z., STÅHLBERG, J., VÁRNAI, A., LERSCH, M., BENGTSSON, O. & EIJSINK, V. G. (2017). Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, 246, 16-23.

COSGROVE, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. **Nature reviews molecular cell biology**, 6(11), 850-861.

DA SILVA, A. S. A., INOUE, H., ENDO, T., YANO, S., & BON, E. P. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, 101(19), 7402-7409.

DA SILVA, A. S. A., TEIXEIRA, R. S. S., DE OLIVEIRA MOUTTA, R., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE BARROS, R. D. R. O., FERRARA, M. A., & DA SILVA BON, E. P. (2013). Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, 47-88.

DAVISON, B. H., PARKS, J., DAVIS, M. F., & DONOHOE, B. S. (2013). Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, 23-38.

DE OLIVEIRA SANTOS, V. T., SIQUEIRA, G., MILAGRES, A. M. F., & FERRAZ, A. (2018). Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, 111, 722-730.

DONOHUE, B. S., DECKER, S. R., TUCKER, M. P., HIMMEL, M. E., & VINZANT, T. B. (2008). Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, 101(5), 913-925.

DU, B., SHARMA, L. N., BECKER, C., CHEN, S. F., MOWERY, R. A., VAN WALSUM, G. P., & CHAMBLISS, C. K. (2010). Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, 107(3), 430-440.

EBRINGEROVÁ, A. (2005, December). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In **Macromolecular Symposia** (Vol. 232, No. 1, pp. 1-12). WILEY-VCH Verlag.

EK, R., ALDERBORN, G., & NYSTRÖM, C. (1994). Particle analysis of microcrystalline cellulose: differentiation between individual particles and their agglomerates. **International journal of pharmaceutics**, 111(1), 43-50.

ESTEGHLALIAN, A. R., BILODEAU, M., MANSFIELD, S. D., & SADDLER, J. N. (2001). Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes? **Biotechnology progress**, 17(6), 1049-1054.

EVANS, R., & WALLIS, A. F. (1989). Cellulose molecular weights determined by viscometry. **Journal of applied polymer science**, 37(8), 2331-2340.

EXCOFFIER, G., TOUSSAINT, B., & VIGNON, M. R. (1991). Saccharification of steam-exploded poplar wood. **Biotechnology and Bioengineering**, 38(11), 1308-1317.

FENGEL, D., & WEGENER, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, 613, 1960-82.

FITZPATRICK, S. W. (2002). Final technical report: Commercialization of the Biofine technology for levulinic acid production from paper sludge; *FINAL* (No. DOE/CE--41178). **BioMetics**.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., & BOGEL-LUKASIK, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, 101(13), 4775-4800.

GUERRIERO, G., HAUSMAN, J. F., STRAUSS, J., ERTAN, H., & SIDDIQUI, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, 16(1), 1-16.

HATAKEYAMA, H., & HATAKEYAMA, T. (2009). Lignin structure, properties, and applications. In **Biopolymers** (pp. 1-63). Springer Berlin Heidelberg.

HENDRIKS, A. T. W. M., & ZEEMAN, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, *100*(1), 10-18.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M., VILLA-RAMÍREZ, M. S., VELOZ-RENDÓN, J. S., RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N., GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A., PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A., & TREJO-ESTRADA, S. R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, *100*(3), 1238-1245.

HERRERA, A., TÉLLEZ-LUIS, S. J., RAMIREZ, J. A., & VÁZQUEZ, M. (2003). Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, *37*(3), 267-274.

HIDENO, A., INOUE, H., TSUKAHARA, K., FUJIMOTO, S., MINOWA, T., INOUE, S., ... & SAWAYAMA, S. (2009). Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, *100*(10), 2706-2711.

HILDEBRAND, T., & RÜEGSEGG, P. (1997). A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. **Journal of microscopy**, *185*(1), 67-75.

HIMMEL, M., VINZANT, T., BOWER, S., & JECHURA, J. (2005). BSCL use plan: solving biomass recalcitrance. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, CO.

HINKLE, J. D., CIESIELSKI, P. N., GRUCHALLA, K., MUNCH, K. R., & DONOHOE, B. S. (2015). Biomass accessibility analysis using electron tomography. **Biotechnology for biofuels**, *8*(1), 212.

HONGDAN, Z., SHAOHUA, X., SHUBIN, W. (2013). Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresour. Technol.** *143*, 391-396.

HUANG, R., SU, R., QI, W., & HE, Z. (2010). Understanding the key factors for enzymatic conversion of pretreated lignocellulose by partial least square analysis. **Biotechnology progress**, *26*(2), 384-392.

IOELOVICH, M. (2009). Accessibility and crystallinity of cellulose. **BioResources**, *4*(3), 1168-1177.

JENKINS, A. D., KRATOCHVIL, P., STEPTO, R. F. T., & SUTER, U. W. (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). **Pure and applied chemistry**, *68*(12), 2287-2311.

JEON, T., WILSON, D. B., & WALKER, L. P. (2002). Cooperative and competitive binding in synergistic mixtures of thermobifida fusca Cellulases Cel5A, Cel6B, and Cel9A. **Biotechnology progress**, 18(4), 760-769.

JEON, T., WILSON, D. B., & WALKER, L. P. (2006). Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology progress**, 22(1), 270-277.

KAI, D., ZHANG, K., JIANG, L., WONG, H. Z., LI, Z., ZHANG, Z., & LOH, X. J. (2017). Sustainable and antioxidant lignin-polyester copolymers and nanofibers for potential healthcare applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**.

KOLARIKOVA, M., IVANOVA, T., & HAVRLAND, B. (2013). Energy balance of briquettes made of hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars (Ferimon, Bialobrzeskie) from autumn harvest to produce heat for household use. **Proceedings of the Engineering for Rural Development**, 504-508.

KÖPCKE, Viviana. Improvement on cellulose accessibility and reactivity of different wood pulps. 2008.

KRATKY, L., & JIROUT, T. (2011). Biomass size reduction machines for enhancing biogas production. **Chemical Engineering & Technology**, 34(3), 391-399.

KUKRETY, A., SINGH, R. K., SINGH, P., & RAY, S. S. (2017). Comprehension on the Synthesis of Carboxymethylcellulose (CMC) Utilizing Various Cellulose Rich Waste Biomass Resources. **Waste and Biomass Valorization**, 1-9.

KUMAR, R., MAGO, G., BALAN, V., & WYMAN, C. E. (2009). Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, 100(17), 3948-3962.

LAUREANO-PEREZ, L., TEYMOURI, F., ALIZADEH, H., & DALE, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 124(1-3), 1081-1099.

LEE, S. B., SHIN, H. S., RYU, D. D., & MANDELS, M. (1982). Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, 24(10), 2137-2153

LEI, H., CYBULSKA, I., JULSON, J. (2013). Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass and kinetics. **J. Sust. Bioenerg. Syst.** 3(04), 250

LEU, S. Y., & ZHU, J. Y. (2013). Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. **Bioenergy Research**, 6(2), 405-415.

LIN, Z., HUANG, H., ZHANG, H., ZHANG, L., YAN, L., & CHEN, J. (2010). Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162(7), 1872-1880.

LIU, C., & WYMAN, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 42(21), 5409-5416.

LIU, C., & WYMAN, C. E. (2004). The effect of flow rate of very dilute sulfuric acid on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial & engineering chemistry research**, 43(11), 2781-2788.

LIU, Z., WANG, L., ZHANG, Y., LI, Y., LI, Z., & CAI, H. (2017). Cellulose-lignin and Xylan-lignin Interactions and the Formation of Lignin-derived Phenols in Pyrolysis Oil. **BioResources**, 12(3), 4958-4971.

LU, Y., YANG, B., GREGG, D., SADDLER, J. N., & MANSFIELD, S. D. (2002). Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied biochemistry and biotechnology**, 98(1-9), 641-654.

LUO, X., & ZHU, J. Y. (2011). Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Enzyme and microbial technology**, 48(1), 92-99.

LYND, L. R., WYMAN, C. E., & GERNGROSS, T. U. (1999). Biocommodity engineering. **Biotechnology progress**, 15(5), 777-793.

MARTÍN, C., GALBE, M., NILVEBRANT, N. O., & JÖNSSON, L. J. (2002). Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied biochemistry and biotechnology**, 98(1-9), 699-716.

MARTIN, C., KLINKE, H. B., & THOMSEN, A. B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(3), 426-432.

MCMILLAN, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass.

MENEZES, F. F. D., RENCORET, J., NAKANISHI, S. C., NASCIMENTO, V. M., SILVA, V. F., GUTIERREZ, A. & MORAES ROCHA, G. J. (2017). Alkaline pretreatment severity leads to different lignin applications in sugarcane biorefineries. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**.

MENG, X., & RAGAUSKAS, A. J. (2014). Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current opinion in biotechnology**, 27, 150-158.

MENG, X., WELLS, T., SUN, Q., HUANG, F., & RAGAUSKAS, A. (2015). Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus. **Green Chemistry**, 17(8), 4239-4246.

MIEDES, E., VANHOLME, R., BOERJAN, W., & MOLINA, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in plant science**, 5, 358.

MICKEL, W., MÜNSTER, S., JAWERTH, L. M., VADER, D. A., WEITZ, D. A., SHEPPARD, A. P., & SCHRÖDER-TURK, G. E. (2008). Robust pore size analysis of filamentous networks from three-dimensional confocal microscopy. **Biophysical journal**, 95(12), 6072-6080.

MILLER, J. D., & GILBERT, R. A. *Sugarcane Botany: A Brief View*, University of Florida.

MILLER, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, 31(3), 426-428.

MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., TOUHY, M. G., & SADDLER, J. N. (1998). The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, 64(2), 113-119.

MOORE, D., ROBSON, G. D., & TRINCI, A. P. (2011). *21st century guidebook to fungi with CD*. Cambridge University Press.

MORENO, A. D., ALVIRA, P., IBARRA, D., & TOMÁS-PEJÓ, E. (2017). Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. **Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources**, 375.

MORIYA, R. Y., GONÇALVES, A. R., & DUARTE, M. C. (2007). Ethanol/water pulps from sugar cane straw and their biobleaching with xylanase from *Bacillus pumilus*. In **Applied Biochemistry and Biotechnology** (pp. 501-513). Humana Press.

NADERI, A. (2017). Nanofibrillated cellulose: properties reinvestigated. **Cellulose**, 24(5), 1933-1945.

O'BRIEN, T. P., & ZEE, S. Y. (1971). Vascular transfer cells in the vegetative nodes of wheat. **Australian Journal of Biological Sciences**, 24(2), 207-218.

ÖHGREN, K., GALBE, M., & ZACCHI, G. (2005). Optimization of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated corn stover for fuel ethanol production. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 1055-1067). Humana Press.

OOSHIMA, H., BURNS, D. S., & CONVERSE, A. O. (1990). Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignocellulosic residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. **Biotechnology and Bioengineering**, 36(5), 446-452.

ORSOLINI, P., MICHEN, B., HUCH, A., TINGAUT, P., CASERI, W. R., & ZIMMERMANN, T. (2015). Characterization of pores in dense nanopapers and nanofibrillated cellulose membranes: a critical assessment of established methods. **ACS applied materials & interfaces**, 7(46), 25884-25897.

O'SULLIVAN, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.

PAGE, D. H. A note on the cell-wall structure of softwood tracheids. **Wood & Fiber**, v. 7, p. 246-8, 1976.

PAL, S., JOY, S., KUMBHAR, P., TRIMUKHE, K. D., GUPTA, R., KUHAD, R. C & PADMANABHAN, S. (2017). Pilot-scale pretreatments of sugarcane bagasse with steam explosion and mineral acid, organic acid, and mixed acids: synergies, enzymatic hydrolysis efficiencies, and structure-morphology correlations. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(2), 179-189.

PALONEN, Hetti. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **VTT Technical Research Centre of Finland**, 2004.

PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D. J., & SADDLER, J. N. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. In **Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals** (pp. 1069-1079). Humana Press.

PATHRBE, M. D., DUBEY, R. S., & LATAYE, D. H. (2017). Removal Of Direct Red 28 Dye From Aqueous Solutions By Using Sugarcane Bagasse As An Adsorbent.

PERRONE, O. M., COLOMBARI, F. M., ROSSI, J. S., MORETTI, M. M. S., BORDIGNON, S. E., NUNES, C. D. C. C., & DA-SILVA, R. (2016). Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. *Bioresource technology*, 218, 69-76.

PITARELO, A. P. (2007). Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Paraná).

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

RAYMUNDO, A. S., ZANAROTTO, R., BELISÁRIO, M., PEREIRA, M. D. G., RIBEIRO, J. N., & RIBEIRO, A. V. F. N. (2010). Evaluation of sugar-cane bagasse as bioadsorbent in the textile wastewater treatment contaminated with carcinogenic congo red dye. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 931-938.

ROCHA, G. J., NASCIMENTO, V. M., GONCALVES, A. R., SILVA, V. F. N., AND MARTÍN, C. (2015). Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 64, 52-58.

SAAKE, B., & LEHNEN, R. (2007). Lignin. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.



SAAVEDRA, F., KARACSONYI, S., MONZON, J., CORDERO, D., & GONZALES, J. (1989). The hemicelluloses of sugarcane. In **Proceedings of XX Congress** (pp. 269-275).

SANTOS, C. C., DE SOUZA, W., SANT'ANNA, C., & BRIENZO, M. (2018). Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, 111, 193-200.

SELIG, M. J., VIAMAJALA, S., DECKER, S. R., TUCKER, M. P., HIMMEL, M. E., & VINZANT, T. B. (2007). Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology progress**, 23(6), 1333-1339.

SIMONS FL (1950). A stain for use in the microscopy of beaten fibers. **Tappi J.**; 33:312–314.

SINDHU, R., BINOD, P., & PANDEY, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, 199, 76-82.

SIQUEIRA, G., ARANTES, V., SADDLER, J. N., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. (2017). Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for biofuels**, 10(1), 176.

SIQUEIRA, G., ARANTES, V., SADDLER, J. N., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. (2017). Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for biofuels**, 10(1), 176.

SIQUEIRA, G., MILAGRES, A. M., CARVALHO, W., KOCH, G., & FERRAZ, A. (2011). Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for biofuels**, 4(1), 1.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 22, p. 53-78, 2006.

SOTO, M. L., DOMINGUEZ, H., NUNEZ, M. J., & LEMA, J. M. (1994). Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, 49(1), 53-59.

STICKLEN, M. B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, 9(6), 433-443

STONE, E. J., HOMAN, E. S., MORRIS, H. F., & FRYE, J. B. (1965, January). Chemical pretreatment of roughages. In **journal of animal science** (vol. 24, no. 3, p. 910). 1111 north dunlap ave, savoy, il 61874: amer soc animal science.

SUN, Y., & CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, 83(1), 1-11.

TAHERZADEH, M. J., & KARIMI, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**, 9(9), 1621-1651.

TANAKA, M., IKESAKA, M., MATSUNO, R., & CONVERSE, A. O. (1988). Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. **Biotechnology and bioengineering**, 32(5), 698-706.

TORGET, R., & TEH-AN, H. (1994). Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. **Applied biochemistry and biotechnology**, 45(1), 5-22.

TRAJANO, H. L., & WYMAN, C. E. (2013). Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**, 103-128.

TRAVAINI, R., BARRADO, E., BOLADO-RODRÍGUEZ, S. (2016). Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 214, 150–158.

"UNICA. Moagem prevista para a região Centro-Sul na safra 2017/2018 é de 585 milhões de toneladas". Disponível em: <[www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=80](http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=80)>. Acesso em: 23 mar. 2018

VIAMAJALA, S., DONOHOE, B. S., DECKER, S. R., VINZANT, T. B., SELIG, M. J., HIMMEL, M. E., & TUCKER, M. P. (2010). Heat and mass transport in processing of lignocellulosic biomass for fuels and chemicals. In **Sustainable biotechnology** (pp. 1-18). Springer Netherlands.

VINZANT, T., BOWER, S., & JECHURA, J. (2005). BSCL use plan: solving biomass recalcitrance. **National Renewable Energy Laboratory**.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource technology**, v. 36, n. 1, p. 3-14, 1991.

WANG, Q. Q., HE, Z., ZHU, Z., ZHANG, Y. H., NI, Y., LUO, X. L., & ZHU, J. Y. (2012). Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques. **Biotechnology and bioengineering**, 109(2), 381-389.

WANG, Z. J., LAN, T. Q., & ZHU, J. Y. (2013). Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Biotechnology for biofuels**, 6(1), 9.

WIMAN, M., DIENES, D., HANSEN, M. A., VAN DER MEULEN, T., ZACCHI, G., & LIDÉN, G. (2012). Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce. **Bioresource technology**, 126, 208-215.

WONG, K. K., DEVERELL, K. F., MACKIE, K. L., CLARK, T. A., & DONALDSON, L. A. (1988). The relationship between fiber-porosity and cellulose

digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. **Biotechnology and bioengineering**, 31(5), 447-456.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., & LADISCH, M. (2011). Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, 48(1), 54-60.

XU, F. (2010). Structure, ultrastructure, and chemical composition. Sun RC, Cereal straw as a resource of sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose, 9-47.

XUE, W., LEI, F., LI, P., & JIANG, J. (2018). Cellulose Accessibility and Zeta potentials of Sugarcane Bagasse Pretreated by Green Liquor and Ethanol for High Hydrolysis Efficiency. **BioResources**, 13(1), 1510-1524.

YANG, B., & WYMAN, C. E. (2004). Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, 86(1), 88-98

YANG, Q., & PAN, X. (2015). Correlation between lignin physicochemical properties and inhibition to enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**.

YU, J. X., XIONG, W. L., ZHU, J., CHEN, J. D., & CHI, R. A. (2017). Removal of Congo red from aqueous solution by adsorption onto different amine compounds modified sugarcane bagasse. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 19(2), 517-525.

YU, X., MINOR, J. L., & ATALLA, R. H. (1995). Mechanism of action of Simons' stain. *Tappi Journal*, 78(6), 175-180.

YU, X., MINOR, J. L., & ATALLA, R. H. (1995). Mechanism of action of Simons' stain. **Tappi Journal**, 78(6), 175-180.

ZHANG, L., TSUZUKI, T., & WANG, X. (2015). Preparation of cellulose nanofiber from softwood pulp by ball milling. **Cellulose**, 22(3), 1729-1741.

ZHENG, Y., PAN, Z., & ZHANG, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, 2(3), 51-68.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., & LI, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, 42, 35-53.

ZHU, J. Y., PAN, X., & ZALESNY, R. S. (2010). Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87(3), 847-857.

ZHU, J., WAN, C., & LI, Y. (2010). Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource technology**, 101(19), 7523-7528.

ZHU, L., O'DWYER, J. P., CHANG, V. S., GRANDA, C. B., & HOLTZAPPLE, M. T. (2008). Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, 99(9), 3817-3828.