
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade,
superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de
cana-de-açúcar**

ERIKA SQUISATO FERNANDES

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade,
superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de
cana-de-açúcar**

ERIKA SQUISATO FERNANDES

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus 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

581.6 Fernandes, Erika Squisato
F363e Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido,
 acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação do
 bagaço de cana-de-açúcar / Erika Squisato Fernandes. - Rio
 Claro, 2018
 66 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

 1. Botânica econômica. 2. Granulmetrias diferentes. 3.
 Pré-tratamento. 4. Acessibilidade. 5. Corantes direct orange e
 blue. 6. Hidrólise enzimática. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI
Biblioteca da UNESP Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

AUTORA: ERIKA SQUISATO FERNANDES

ORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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

Prof. Dr. SIDNEI EMILIO BORDIGNON JUNIOR
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos / Universidade Federal de Santa Catarina
(Videoconferência)


Profa. Dra. LUCIANA FONTES COELHO
x / x

Rio Claro, 24 de julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por mais esta oportunidade e conquista.

Ao Centro Paula Souza por esta oportunidade e a Etec Prefeito Alberto Feres pelo auxílio no uso dos laboratórios no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu dedicado orientador Michel Brienzo, pela sabedoria, paciência e orientação neste árduo caminho.

Ao meu esposo Daniel, pelo apoio e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Ademir e Vera, a minha irmã Eloiza e os meus sobrinhos Ana Ligia e João Felipe pelo apoio durante a minha vida.

Aos meus amigos de escola, principalmente ao professor Mestre Abelardo, aos meus alunos e amigos de laboratório, pelo auxílio e paciência na execução das práticas deste trabalho.

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.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria sucroalcooleira, majoritariamente usado para a cogeração de energia térmica e elétrica, através de sua combustão em caldeiras. Em função da sua composição em carboidratos vem sendo estudado na conversão em biocombustíveis. Porém, a recalcitrância da matriz lignocelulósica dificulta desestruturação do material, com baixa acessibilidade à celulose, influenciando na sacarificação enzimática. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min) em diferentes granulometrias, 16, 24, 35, 60 mesh e fundo de bagaço e fração externa (contendo epiderme) do colmo de cana-de-açúcar. Cada biomassa de cana-de-açúcar, em diferentes granulometrias, passou pelo pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121° C/30 min). As amostras foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina. A área superficial de lignina foi determinada com a adsorção do corante catiônico Azure B em solução de 0,1 g.L⁻¹. A determinação de acessibilidade à celulose foi realizada com corantes Direct Orange (superfície específica externa) e Direct Blue (superfície específica interna). A hidrólise enzimática (15 FPU.g⁻¹ durante 24 h – Cellic Cetec 2 – Novozymes) foi aplicada nos materiais para avaliar o rendimento em glicose. Para o material retido na peneira de abertura 16 mesh, maior tamanho de partículas, a massa recuperada de bagaço foi de 59,81 % e no fundo, menor tamanho de partícula, foi de 53,92 %. A fração externa apresentou as recuperações de massas de 37,12 % e 31,42 %, nas mesmas peneiras. O bagaço e a fração externa apresentaram valores próximos na liberação de xilose. Nos materiais retidos na peneira de abertura de 24 mesh, foi solubilizado 0,27 g.L⁻¹ de xilose no bagaço e na fração externa 0,26 g.L⁻¹. O emprego do corante catiônico Azure B não demonstrou uma maior área superficial de lignina com a diminuição do tamanho de partícula, apresentando a maior área superficial de lignina para o bagaço de 10,98 m².g⁻¹, e fração externa de 10,21 m².g⁻¹, no material retido na peneira com abertura de 16 mesh. A determinação de acessibilidade à celulose com os corantes Direct Blue e Direct Orange indicaram com diminuição do tamanho de partículas provocou aumento de acessibilidade à celulose. As frações de menor tamanho de partículas, 60 mesh, apresentaram uma adsorção do Direct Orange 667 mg.g⁻¹ e o Direct Blue 556 mg.g⁻¹ para o bagaço, a fração externa apresentou 833 mg.g⁻¹ na adsorção dos dois corantes. A hidrólise enzimática apresentou uma conversão em glicose no bagaço de 75,41 % e na fração externa 33,69 %, no material retido no fundo, os menores tamanhos de partícula. O uso do pré-tratamento ácido diluído melhora o aumento na acessibilidade à celulose, resultando em melhor ação das enzimas na hidrólise enzimática nos menores tamanhos de partículas 35, 60 mesh e fundo.

Palavras chave: granulometrias diferentes, pré-tratamento, acessibilidade, corantes Direct Orange e Blue, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is a by-product of the sugar and alcohol industry, mostly used for cogeneration of thermal and electric energy, through its combustion in boilers. Due to its composition in carbohydrates has been studied in the conversion to biofuels. However, the recalcitrance of the lignocellulosic matrix makes it difficult to disintegrate the material, with low accessibility to the cellulose, influencing the enzymatic saccharification. In this context, the objective of this work was to evaluate the effect of diluted acid pretreatment (10 %, m/m, 121 °C / 30 min) in different granulometries, 16, 24, 35, 60 mesh and background bagasse and fraction (containing epidermis) from the sugar cane stalk. Each biomass of sugarcane, in different granulometries, underwent the pre-treatments diluted acid (10 %, m/m, 121 °C / 30 min). The samples were characterized for their content of cellulose, hemicellulose and lignin. The surface area of lignin was determined with the adsorption of the cationic dye Azure B in solution of 0.1 g.L⁻¹. The determination of accessibility to the cellulose was performed with Direct Orange (specific external surface) and Direct Blue (specific internal surface) dyes. Enzymatic hydrolysis (15 FPU.g⁻¹ for 24 h - Cellic Cetec 2 - Novozymes) was applied to the materials to evaluate glucose yield. For the material retained in the 16 mesh aperture sieve, larger particle size, the recovered mass of bagasse was 59.81 % and in the bottom, smaller particle size was 53.92 %. The external fraction presented the recoveries of masses of 37.12 % and 31.42 %, in the same sieves. The bagasse and the outer fraction presented close values in the release of xylose. In the materials retained in the 24 mesh sieve, 0.27 g.L⁻¹ of xylose was solubilized in the bagasse and in the outer fraction 0.26 g.L⁻¹. The use of the cationic dye Azure B did not demonstrate a larger surface area of lignin with the decrease of the particle size, presenting the highest ASL for the bagasse of 10.98 m².g⁻¹, and external fraction of 10.21 m².g⁻¹, in the material retained in the 16 mesh screen. The determination of accessibility to the cellulose with the Direct Blue and Direct Orange dyes indicated with decrease of the particle size caused increase of accessibility to the cellulose. The smaller fraction of particles, 60 mesh, had an adsorption of Direct Orange 667 mg.g⁻¹ and Direct Blue 556 mg.g⁻¹ for the bagasse, the external fraction presented 833 mg.g⁻¹ in the adsorption of two dyes. The enzymatic hydrolysis showed a glucose conversion in the bagasse of 75.41 % and in the outer fraction 33.69 %, in the material retained in the bottom, the smaller particle sizes. The use of dilute acid pretreatment improves the increase in cellulose accessibility, resulting in better enzyme action on enzymatic hydrolysis in the smaller particle sizes of 35, 60 mesh and background.

Key words: different particle sizes, pretreatment, accessibility, Direct Orange and Blue dyes, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustração da estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar (adaptado de BNDES e CGEE, 2008).....	10
Figura 2: Fluxograma da fabricação do açúcar.....	11
Figura 3: Fluxograma da fabricação do etanol de primeira geração.....	12
Figura 4: Ilustração representando a extração do bagaço de cana-de-açúcar. Onde A mostra o bagaço antes de ser processado na moenda, e B após ser processado na moenda. (MELATI et al., 2017).....	13
Figura 5: 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 folha e C são as frações do bagaço de cana-de-açúcar (SANT'ANNA et al., 2014.).....	14
Figura 6: Ilustração de tipos de biomassas vegetais.....	15
Figura 7: Ilustração dos fatores que contribuem com a recalcitrância da biomassa lignocelulósica.....	16
Figura 8: Ilustração da estrutura recalcitrante da biomassa vegetal/lignocelulósica (KONDO e POLYM, 1997).....	17
Figura 9: Representação estrutural da celulose com as ligações β -1,4 da cadeia e as ligações de hidrogênio. (Adaptado de CANILHA et al., 2012).....	18
Figura 10: Açúcares e ácidos urônicos presentes nas hemiceluloses. (FENGEL e WEGENER, 1989).....	19
Figura 11: Monolignóis, os precursores da molécula de lignina. Da esquerda para a direita as estruturas dos álcoois: Coniferílico, Sinapílico e p-Coumarílico (Adaptado de: WHETTEN et al., 1998).....	20
Figura 12: Estrutura da lignina de madeira mole (abeto, <i>Picea abies</i>). (FENGEL e WEGENER, 1989).....	21
Figura 13: Representação do efeito do pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica. (MOSIER et al., 2005).....	22
Figura 14: Representação da reação química entre grupos hidroxilas (OH^-) no anel aromático dos álcoois fenilpropanóides da lignina com o corante Azure B (Adaptado de: WHETTEN et al., 1998).....	25

Figura 15: Esquema da ação catalítica do complexo enzimático celulolítico sobre a cadeia de celulose com geração de glicose. (OGEDA e PETRI, 2010).....	29
Figura 16: Tipos de moinhos empregados na diminuição de materiais lignocelulósicos.....	30
Figura 17: Tamanho das partículas da fração externa (contendo epiderme) da cana-de-açúcar após o seu fracionamento.....	32
Figura 18: Tamanho das partículas do bagaço de cana-de-açúcar após o seu fracionamento.....	33
Figura 19: Porcentagem da massa retida de bagaço de cana-de-açúcar com o peneiramento.....	38
Figura 20: Concentração de glicose determinada no hidrolisado do pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min) no bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.....	42
Figura 21: Concentração de xilose determinada no hidrolisado do pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min) de bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.....	44
Figura 22: Concentração de arabinose determinada no hidrolisado do pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min) de bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.....	44
Figura 23: Área superficial total da lignina (ASL) para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....	48
Figura 24: Área superficial específica da lignina (ASEL) para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratada com ácido diluído (10%, m/m, 121 °C/30 min).....	49
Figura 25: Área superficial total da lignina (ASL) para a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....	50
Figura 26: Área superficial específica da lignina (ASEL) para a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....	51

Figura 27: Acessibilidade à celulose após pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....53

Figura 28: Acessibilidade à celulose após pré-tratamento ácido diluído da fração externa (contendo epiderme) da cana-de-açúcar (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....54

Figura 29: Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU.g⁻¹ de substrato) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído (10 %, m/m, a 121 °C/30 min)56

Figura 30: Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU.g⁻¹ de substrato) da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído (10 %, m/m, a 121 °C/30 min)57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos na aplicação de um pré-tratamento ácido diluído.....	23
Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise.....	27
Tabela 3: Porcentagem de massa recuperada do bagaço e fração externa (epiderme) da cana-de-açúcar, em diferentes granulometrias, após pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).....	40
Tabela 4: Composição química (% , massa seca) do bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratadas e <i>in natura</i> livre de extrativos em diferentes granulometrias.....	46
Tabela 5: Composição química (% , massa seca) da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar, pré-tratadas e <i>in natura</i> livre de extrativos em diferentes granulometrias.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Cana-de-açúcar	10
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....	12
2.3 Epiderme (fração externa).....	13
2.4 Materiais Lignocelulósicos	14
2.5 Celulose	17
2.6 Hemicelulose.....	18
2.7 Lignina	19
2.8 Pré-tratamento.....	21
2.9 Área Superficial da Lignina (ASL).....	23
2.10 Acessibilidade à celulose e sua determinação	25
2.11 Hidrólise Enzimática	26
2.12 Granulometria-tamanho de partícula	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Obtenção do material e separação de frações.....	32
4.2 Pré-tratamento com ácido diluído	33
4.3 Caracterização química da biomassa <i>in natura</i> e pré-tratada.....	34
4.4 Determinação da área superficial da lignina (ASL).....	34
4.5 Acessibilidade à celulose.....	35
4.6 Hidrólise enzimática das amostras	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Determinação da fração mássica do bagaço de cana-de-açúcar	37
5.2 Efeito do pré-tratamento ácido diluído na recuperação de massa... ..	38
5.3 Composição química do hidrolisado (fração líquida).....	40
5.4 Composição química das amostras <i>in natura</i> e pré-tratadas	45
5.5 Determinação da área superficial da lignina (ASL) e específica (ASEL) nas biomassas de cana-de-açúcar	47
5.6 Determinação da acessibilidade à celulose com Direct Orange e Blue (Simons' Stain).....	51
5.7. Hidrólise enzimática das biomassas de cana-de-açúcar	55
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Com a Revolução Industrial que começou no final do século XVIII, na Inglaterra, a substituição do trabalho artesanal pelo uso de máquinas foi o começo da industrialização mundial, que foi seguido por outros países: Alemanha, França, Rússia e Itália. O desenvolvimento tecnológico no uso do aço, da energia elétrica e dos combustíveis derivados do petróleo foram inovações que são usadas até hoje. Através dessas inovações, a humanidade pesquisa e desenvolve tecnologias que melhoraram o seu modo de vida na saúde, lazer e trabalho; mas o uso desenfreado, principalmente dos combustíveis fósseis como o gás natural, carvão e petróleo, e seus derivados na geração de energia por combustão em motores e na indústria causam danos irreversíveis a natureza. A queima destes combustíveis gera poluentes gasosos, como o gás carbônico ou dióxido de carbono (CO_2), que pelo seu excesso na atmosfera causa o Aquecimento Global e a Chuva Ácida, que acaba contaminando a atmosfera, solo e água. Para minimizar os problemas ambientais, vem aumentando nas últimas décadas pesquisas por novas fontes de combustíveis com queima limpa e renovável. No Brasil o uso de energias limpas e renováveis como a eólica, solar e o biogás é crescente, mas o uso das biomassas como: bagaço de cana-de-açúcar, lenha e carvão vegetal, e dos biocombustíveis: o etanol e o etanol de segunda geração (2G), tem um maior destaque, no uso dessas fontes para geração de energia a combustão.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e tem como estimativa para a safra de 2017/18 uma produção de 72.734 kg/ha, isto é, 635,6 milhões de toneladas, sendo 39,46 milhões de toneladas de açúcar, 10,19 bilhões de litros são de etanol anidro e 14,53 bilhões de litros são de etanol hidratado, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017). Durante a moagem da cana-de-açúcar, é produzido o bagaço, um subproduto, que é queimado nas caldeiras e usado na geração de energia térmica e elétrica, tornando as usinas autossustentáveis energeticamente. (FERNANDES et al., 2017).

Além do uso na cogeração, o bagaço pode ser empregado para produzir etanol lignocelulósico, etanol celulósico ou etanol de segunda geração (2G). Este processo é possível através da quebra dos polissacarídeos em açúcares

fermentáveis e então via fermentação para produção do etanol. O bagaço da cana-de-açúcar é constituído por 32 a 50% de celulose, 19 a 25% de hemicelulose, 23 a 32% de lignina, e cerca de 2% de cinzas (CONAB, 2017). Assim, o bagaço é uma fonte renovável de carboidratos. Porém, esta biomassa lignocelulósica está organizada em uma matriz de lignina formando uma estrutura complexa (BRIENZO et al.; 2014). Esta organização estrutural e a presença de lignina conferem a biomassa o fenômeno da recalcitrância. Essa recalcitrância dificulta a acessibilidade à celulose (ZHAO et al.; 2012). Deste modo, é necessário um pré-tratamento para modificar a estrutura do material e melhorar a acessibilidade à celulose.

O bagaço é composto por várias frações do colmo da cana-de-açúcar, caracterizando-o como um material heterogêneo. Esses materiais: fração externa, nó e entrenó, têm recalcitrâncias diferentes que dificultam modificações na sua estrutura e no pré-tratamento (BRIENZO et al., 2014). O fracionamento da fração externa, nó e entrenó, em tamanhos de partículas diferentes, diminuem a recalcitrância, devido a origem destes materiais, sendo a fração externa mais recalcitrante, o nó e entrenó menos recalcitrantes. Um material lignocelulósico com menores tamanhos de partículas, aumentam a sua superfície de contato, que aumenta a velocidade de reação química e biológica (CAI et al., 2017).

Neste contexto, o objetivo desse estudo é avaliar o efeito da granulometria, no pré-tratamento ácido diluído do bagaço e na fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar. Foram estudados parâmetros de recuperação de massa, rendimento em xilose do pré-tratamento ácido diluído, composição química do material pré-tratado, acessibilidade à celulose, exposição da lignina e hidrólise enzimática.

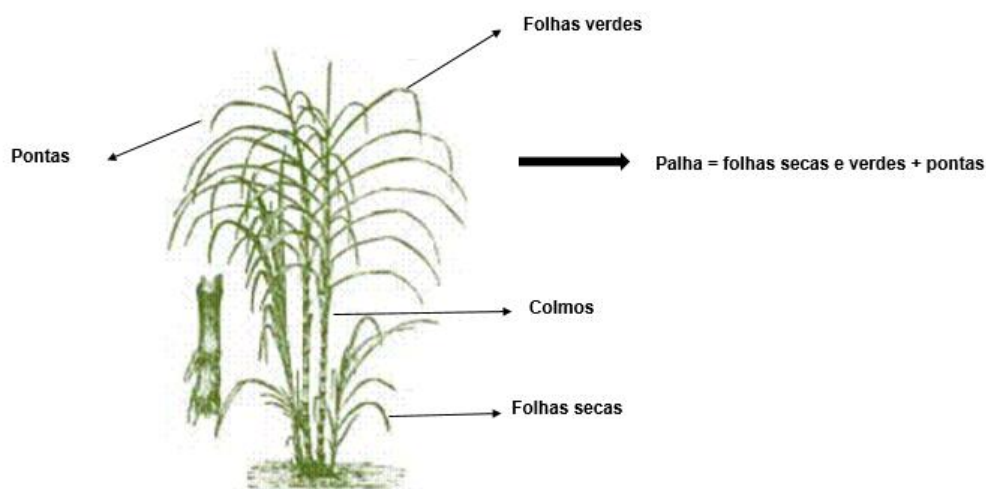
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi trazida ao Brasil pelo colonizador português Martim Afonso de Souza, em São Vicente, na época colonial do sudeste asiático. Adaptou-se ao clima tropical e é cultivada até hoje, em 9 milhões de hectares de solo, principalmente nos estados do nordeste e sudeste do país. Pertence à família das gramíneas, uma monocotiledônea, e desde sua implantação no Brasil passou por várias modificações diferenciando as espécies quanto as fibras e aos teores de açúcares (JOAQUIM, 1997).

A cana-de-açúcar pode ser dividida em colmo (caule), folhas e sistema radicular (Figura 1). O colmo é heterogêneo, coberto com cera e impregnado por cutina, dividido em diversas frações de acordo com a sua morfologia: fração externa (contendo epiderme), nó e entrenó (BRIENZO et. al, 2014; 2016).

Figura 1: Ilustração da estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar.

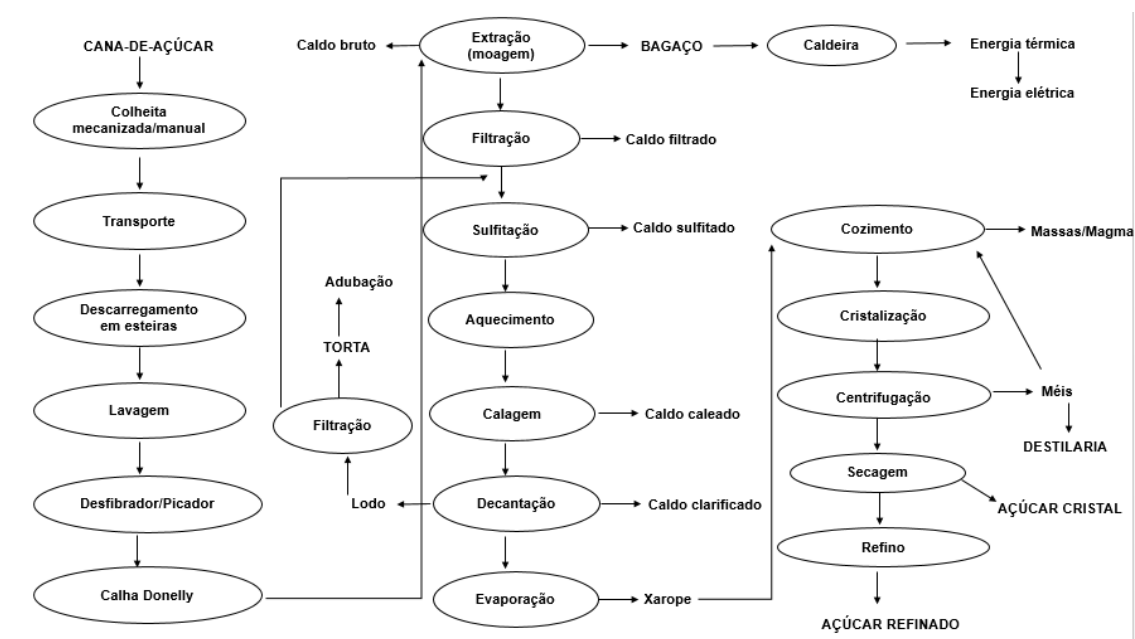


Fonte: Adaptado de BNDES e CGEE, 2008.

A cana-de-açúcar é usada para produzir vários tipos de açúcares (refinado, cristal, demerara, orgânico, VHP, VVHP, etc.) e o etanol (hidratado e anidro) (FERNANDES et al., 2017). Para a produção de açúcar (sacarose) (Figura 2), a cana-de-açúcar passa por vários processos: colheita, preparo,

moagem, tratamento físico-químico, filtração, sulfitação, calagem, evaporação, cozimento, centrifugação e secagem (FERNANDES et al., 2017). Durante a moagem, a cana-de-açúcar produz vários subprodutos, como: lodo, torta, bagacilho e bagaço. E entre esses subprodutos temos o bagaço, uma biomassa vegetal, que possui carboidratos na sua parede vegetal.

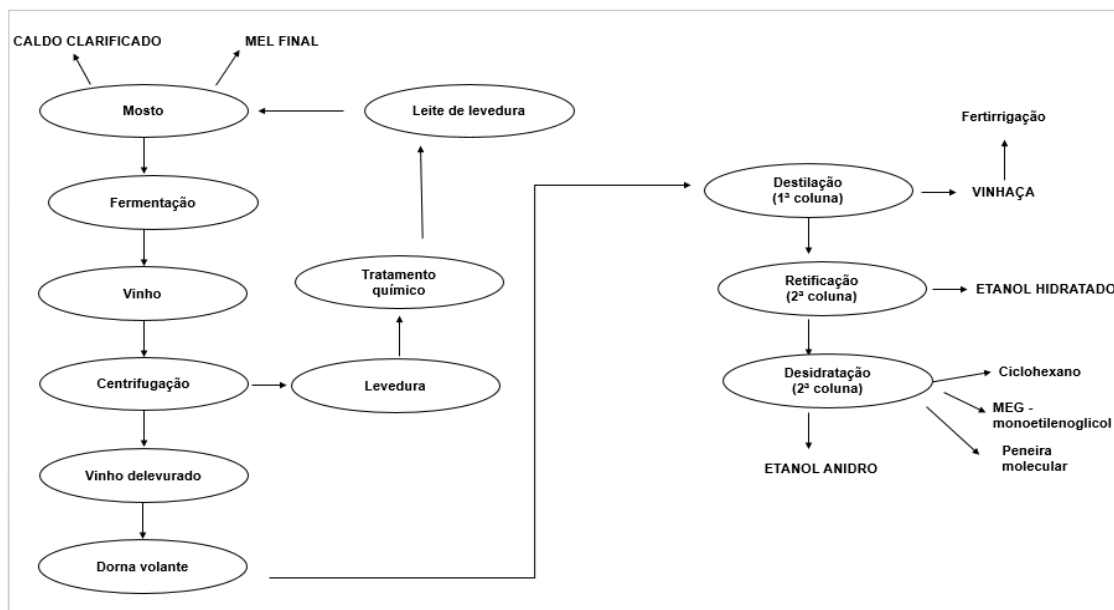
Figura 2: Fluxograma da fabricação do açúcar.



Fonte: Autor

Para a produção de etanol (Figura 3) fermenta-se o mel final, vindo das centrífugas, o caldo clarificado com as leveduras. Tanto o mel final e o caldo são ricos em sacarose, um dissacarídeo, formado por monossacarídeos fermentáveis, a glicose e a frutose, as quais são assimiladas pela levedura para produzir o etanol de primeira geração (1G) (FERNANDES et al., 2017).

Figura 3: Fluxograma da fabricação do etanol de primeira geração.



Fonte: Autor

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço (Figura 4) é um subproduto sólido fibroso, gerado nos ternos da moenda e captado no último terno, durante a extração do caldo bruto para a produção de açúcar. Tem como principal uso, atualmente, a geração de energia térmica e elétrica através de sua combustão nas caldeiras de alta pressão das usinas (FERNANDES et al., 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar é uma biomassa rica em açúcares complexos como a hemicelulose e a celulose, carboidratos não-fermentáveis, entretanto, esses carboidratos são formados por monossacarídeos fermentáveis, xilose e glicose, despertando o interesse no estudo dessa biomassa para a fabricação de etanol de segunda geração (2G).

O bioetanol derivado das biomassas vegetais, como o bagaço de cana-de-açúcar, é considerado como uma das alternativas mais promissoras aos combustíveis fósseis, petróleo e carvão vegetal, ao ser usado como um combustível renovável devido sua queima menos poluente, auxiliando na redução de emissão de dióxido de carbono, reciclando gás carbônico (CO₂) da atmosfera. O bioetanol possui maior número de octanas, maior inflamabilidade,

velocidade e vaporização do que a gasolina (ELGHARBAWY et al., 2016 e SUN, et al., 2016).

A importância da discussão do uso do bagaço de cana-de-açúcar para a indústria sucro-energética-alcooleira está na possibilidade de redução de custos, de perdas no armazenamento nos pátios ao ar livre e dos impactos ambientais (COSTA e DUARTE, 2010).

Figura 4: Ilustração representando a extração do bagaço de cana-de-açúcar. Onde A mostra o bagaço antes de ser processado na moenda, e B após ser processado na moenda.



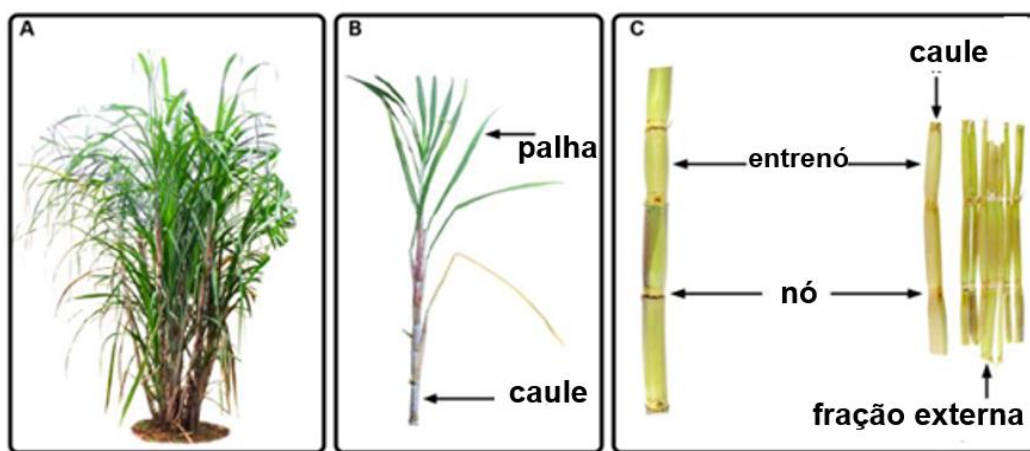
Fonte: MELATI et al., 2017

2.3. Epiderme (fração externa)

A fração externa (contendo epiderme) do colmo de cana-de-açúcar (Figura 5) é impermeável a água protegendo a parte interna do colmo (córtex, feixe vascular e medula), coberta com cera e impregnada com cutina. Sua epiderme é formada por uma única camada, se alternando em células curtas e longas, formando uma camada densa e resistente, dependendo o tipo de planta, além de grande quantidade de feixes vasculares (BRIENZO et al, 2014; 2016). Tem características morfológicas, composicionais e estruturais heterogêneas que a caracteriza com alto grau de lignificação e recalcitrância (SANT'ANNA et al., 2014; BRIENZO et al., 2014; 2016). Por essas características a fração externa mostrou-se mais resistente ao pré-tratamento ácido diluído do que as demais frações como entrenó, nó e o bagaço de cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2014).

O nó e o entrenó (Figura 5) são menos recalcitrantes comparados a fração externa. São formados por células de parênquima, cuja função é de armazenamento, sendo menos resistentes ao pré-tratamento. Destaca-se a distribuição de feixes vasculares, os quais aumentam na periferia do colmo, na região da fração externa (BRIENZO et al, 2016).

Figura 5: 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 folha e C são as frações do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de SANT'ANNA et al., 2014.

2.4. Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos de forma geral são heterogêneos, duros e fibrosos, com uma parede celular de estrutura complexa, resistente e recalcitrante. São constituídos por carboidratos como: a celulose (32 a 50%) e a hemicelulose (19 a 25%, como xilana, manana, arabinana e xiloglucana), pectinas, e pequenas quantidades de extrativos. Os materiais lignocelulósicos são impregnados com uma matriz de lignina (23 a 32%), que dá sustentação, e que também, é uma barreira mecânica para proteção da planta (SUN et al., 2016 e BRIENZO et al, 2014).

Os materiais lignocelulósicos representam uma estrutura típica da biomassa vegetal (Figura 6): resíduos florestais, produtos agrícolas, gramíneas,

e resíduos agroindustriais: bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e de arroz, etc.

Figura 6: Ilustração de tipos de biomassas vegetais.

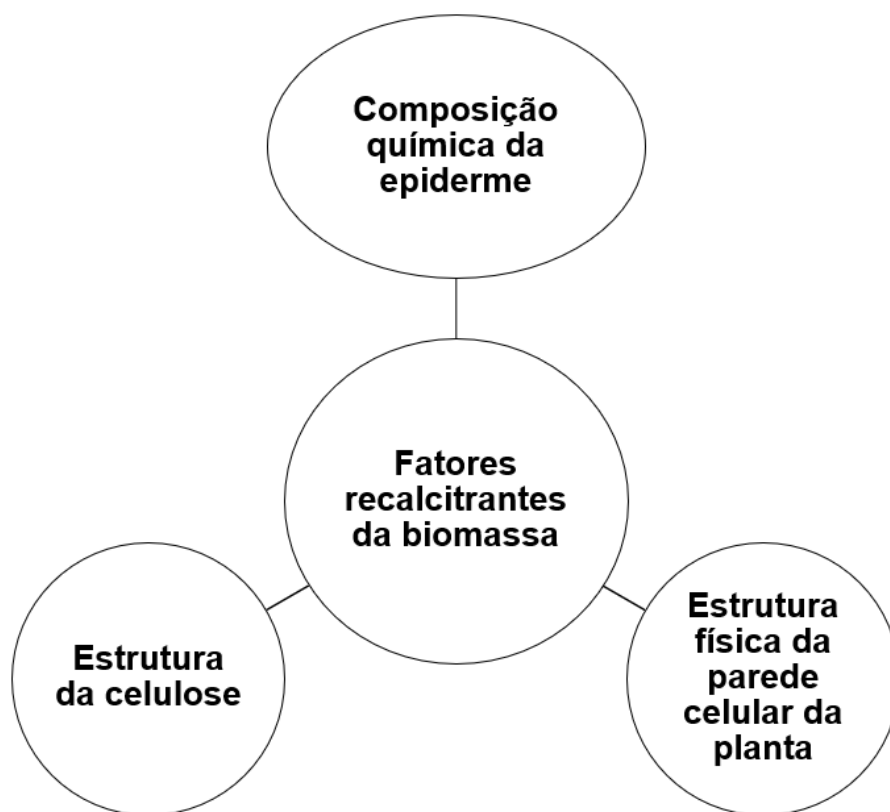


Fonte: Autor

As biomassas vegetais são fontes de carboidratos renováveis e de baixo custo, favorável ao meio ambiente, são matérias-primas na produção de biocombustíveis e produtos químicos, amplamente disponíveis na indústria e agricultura (BEHERA et al., 2014). A biomassa lignocelulósica tem potencial para produzir até 442 bilhões de litros de etanol anualmente. Uma produção de 5 a 8% ao ano seria capaz de suprir o consumo anual de óleo de origem fóssil (ELGHARBAWY et al., 2016).

A parede vegetal das biomassas é formada por fibras de celulose, que estão envolvidas por uma rede de hemicelulose e embebidas por uma matriz de lignina que estão fortemente interligadas e ligadas através de ligações covalentes ou não covalentes. Essa estrutura complexa dificulta o acesso à celulose na parede celular, conferindo o fenômeno da recalcitrância (Figura 7) (SUN, et al., 2016).

Figura 7: Ilustração dos fatores que contribuem com a recalcitrância da biomassa lignocelulósica.

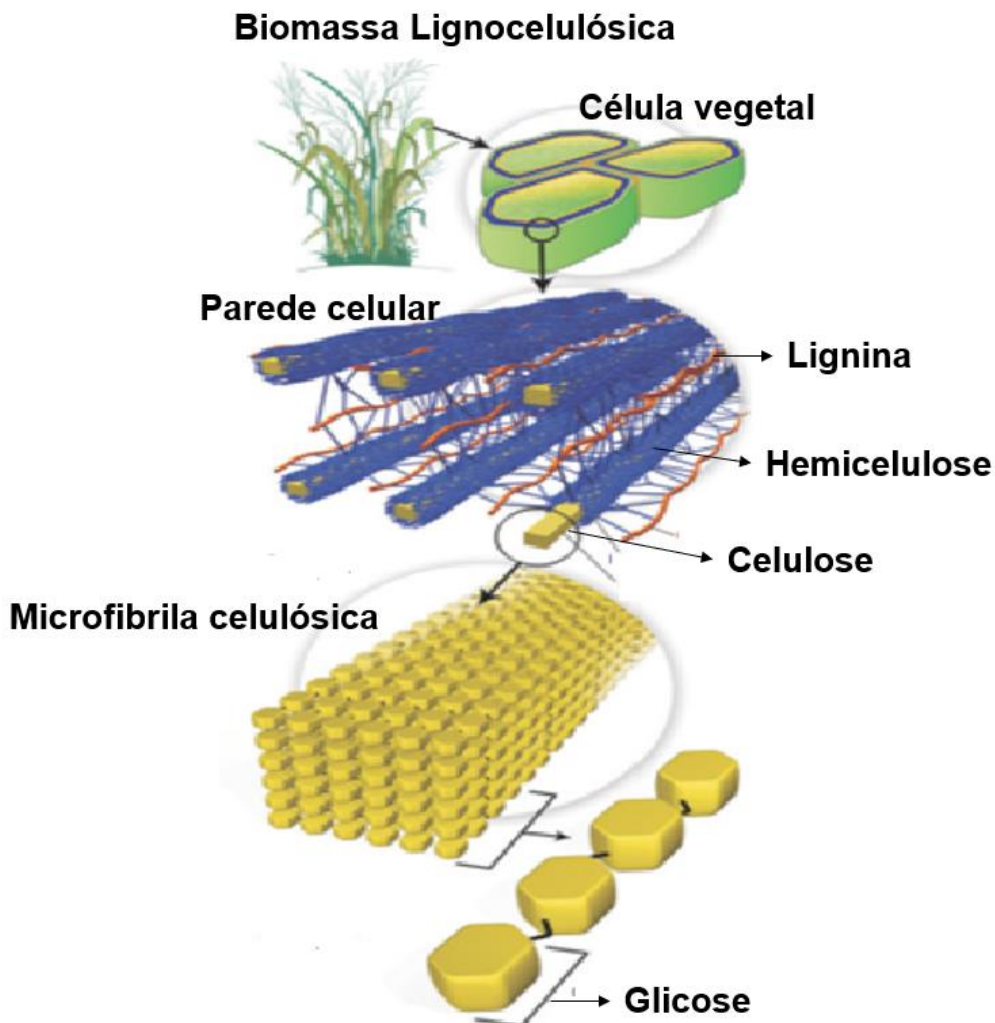


Fonte: Autor

Esse fenômeno dificulta a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis, e subsequente conversão em etanol (ZHAO et al., 2012 e BRIENZO et al, 2014).

As biomassas vegetais tem características estruturais de forte recalcitrância (Figura 8), que dificultam a ação de enzimas, por isso, precisam de um pré-tratamento para modificar sua estrutura, composição química, o grau de polimerização, cristalinidade, superfície de contato e a capacidade de adsorção da enzima no material para superar essa recalcitrância e aumentar a digestão enzimática dos polissacarídeos (MAURYA et al., 2015, SUN et al, 2016).

Figura 8: Ilustração da estrutura recalcitrante da biomassa vegetal/lignocelulósica.



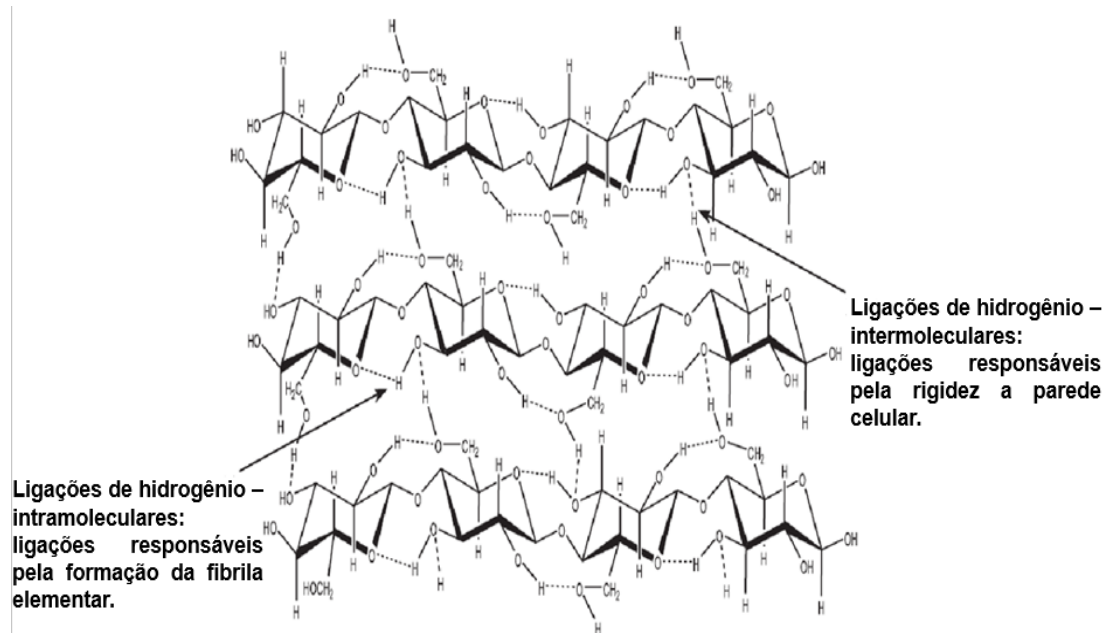
Fonte: Adaptado de KONDO e POLYM, 1997

2.5. Celulose

A celulose é o principal constituinte da parede celular das biomassas vegetais (lignocelulósicas). É um homopolissacarídeo natural com fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, com uma cadeia linear e longa, com um grau de polimerização de várias centenas para mais de dez mil (SUN, et al., 2016). Formada por unidades de monômeros de glicose através de reação de desidratação da hidroxila do carbono 1 da β -D-glicose e a hidroxila do carbono 4 da β -D-glicose (Figura 9). O

carbono 6 da glicose encontra-se alternando para cima ou para baixo na cadeia de celulose, formando um carboidrato homogêneo (ESTEVEES, 2011).

Figura 9: Representação estrutural da celulose com as ligações β -1,4 da cadeia e as ligações de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de CANILHA et al., 2012

As cadeias de celulose têm ligações dos tipos intermoleculares que dão rigidez a parede celular, e as intramoleculares que formam a fibrila elementar (Figura 10) (SAHIN e ARSLAN, 2008). Essas ligações são do tipo hidrogênio e dipolo – induzido, Van der Waals, que torna esse polissacarídeo cristalino, insolúvel em água e resistente à hidrólise química ou enzimática (MOSIER et al, 2005 e MAURYA et al., 2015). Há também a formação de regiões menos ordenadas, de arranjos irregulares e flexíveis, resultando nas regiões amorfas (ESTEVEES, 2011 e SUN et al., 2016).

2.6. Hemicelulose

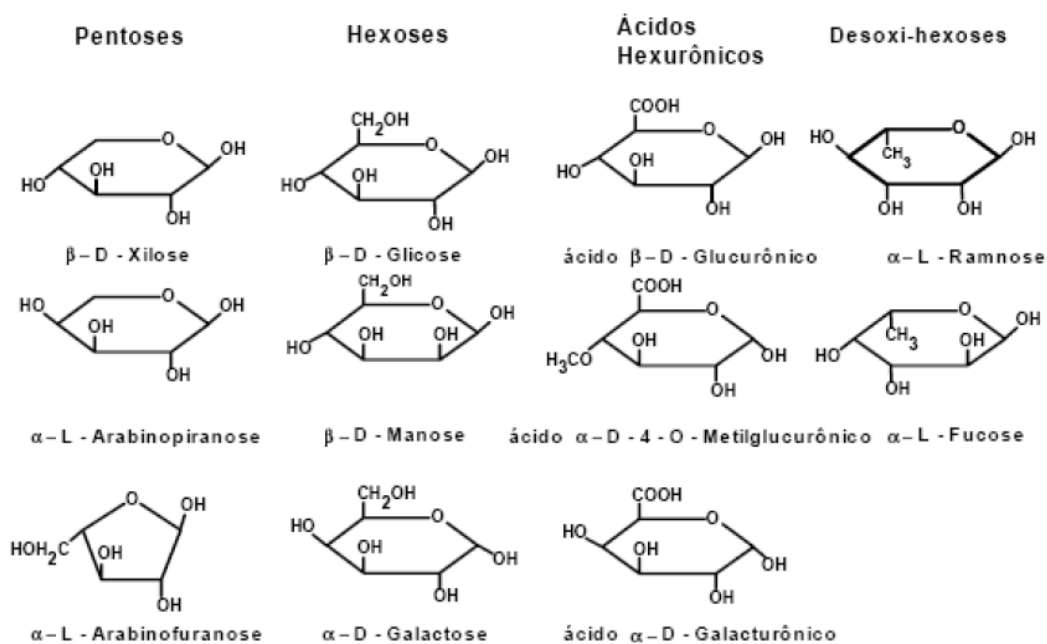
A hemicelulose é um polissacarídeo amorfo, de baixa massa molar, com menor resistência, de fácil hidrólise e com um grau de polimerização em torno de 200 (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000 e MAURYA et al., 2015). A hemicelulose é formada por diversos açúcares como pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose),

hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose) e ácidos urônicos (ácido α -D-glucurônico, ácido α -D-4-O-metilgalacturônico e ácido α -D-galacturônico) (RABELO, 2010).

Na cana-de açúcar a hemicelulose predominante é do tipo 4-O-metilglucuronoarabinosilana formada por resíduos de anidroxilose de ligações β -(1-4), com grupos pendentes de arabinosil, acetil e 4-O-metil-glucurônico ligados covalentemente na cadeia principal (TELEMAN, 2009).

Pela diversidade de açúcares (Figura 10), a hemicelulose é um carboidrato heterogêneo, um heteropolíssacarídeo. A hemicelulose está associada à celulose e à lignina na parede celular vegetal, e uma das suas funções é de proteger as fibras de celulose de ataques enzimáticos ou químicos.

Figura 10: Açúcares e ácidos urônicos presentes nas hemiceluloses.



Fonte: FENGEL E WEGENER, 1989.

2.7. Lignina

A lignina é a segunda substância orgânica mais abundante nas plantas, depois da celulose. A lignina é uma macromolécula heterogênea, formada por unidades fenil-propano, em uma estrutura complexa e tridimensional (SUN et al,

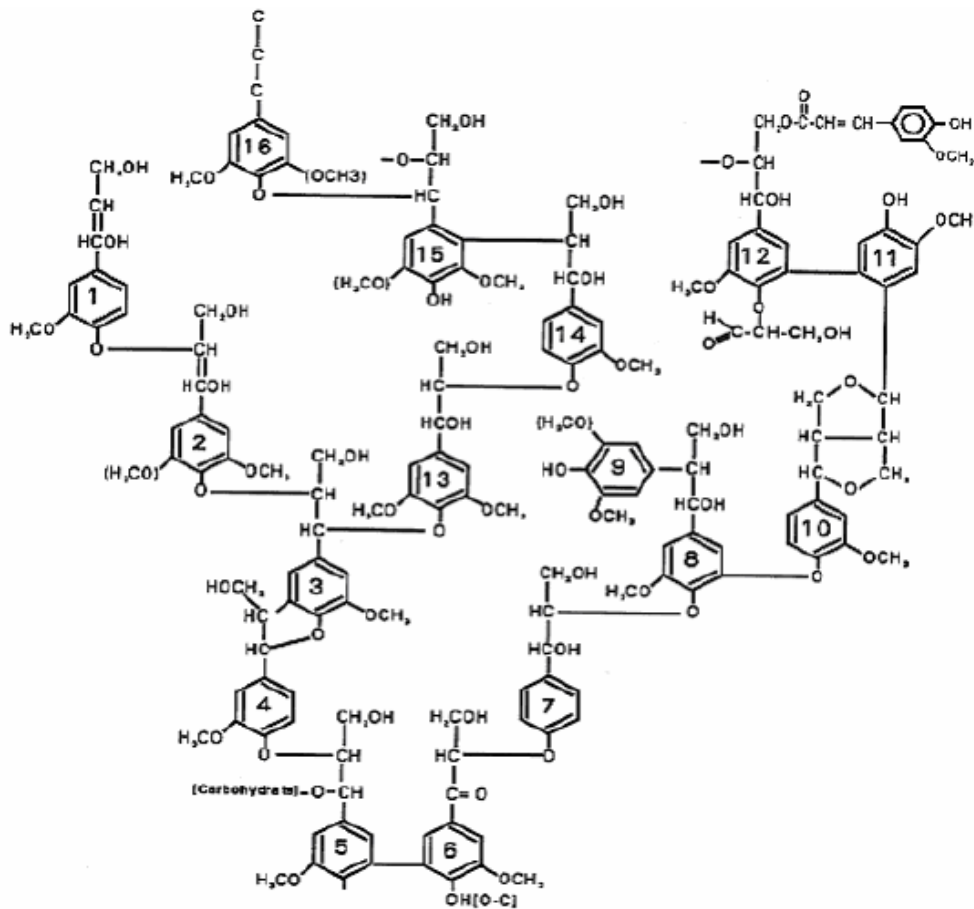
2016). A lignina provém resistência, rigidez e proteção à parede celular das plantas contra ataques microbianos (MAURYA et al., 2015). Por outro lado, a lignina dificulta a acessibilidade à celulose e a hemicelulose. A lignina é formada pela síntese de três diferentes álcoois fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapil (Figura 11), e que contêm 0, 1 e 2 dois grupos metoxil (-OCH₃) no seu anel aromático, respectivamente (SIPPONEN et al, 2014). Estes precursores estão conectados na molécula de lignina por ligações do tipo carbono-carbono (C-C) e éter (C-O), formam uma estrutura resistente a biodegradação. Devido à variedade e a aleatoriedade de ligações a estrutura real da macromolécula de lignina é bastante complexa (Figura 12) (TAIZ e ZEIGER, 2004, MAURYA et al., 2015 e SUN et al, 2016).

Figura 11: Monolignóis, os precursores da molécula de lignina. Da esquerda para a direita as estruturas dos álcoois: Coniferílico, Sinapílico e p-Coumarílico.



Fonte: Adaptado de: WHETTEN et al., 1998.

Figura 12: Estrutura da lignina de madeira mole (abeto, *Picea abies*).



Fonte: FENGEL e WEGENER, 1989.

2.8. Pré-tratamento

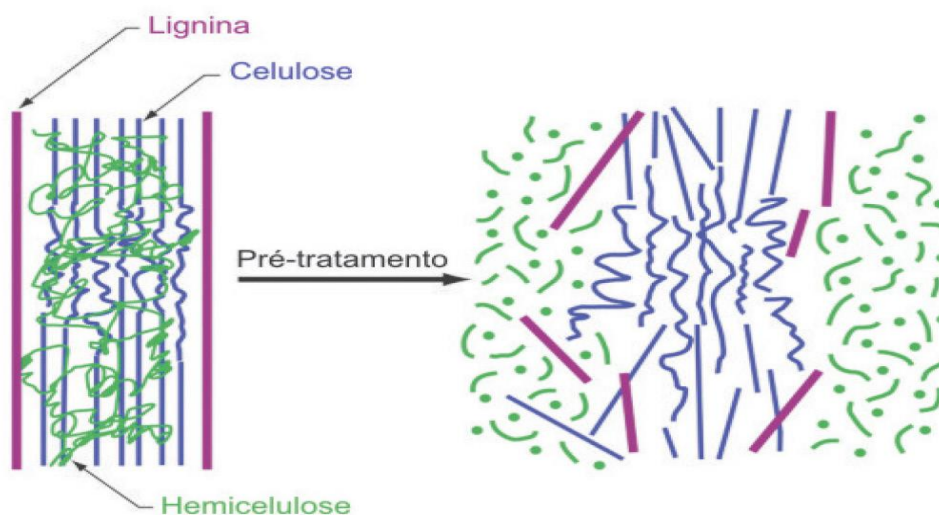
Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos (moagem e trituração), químicos (alcalino, ácido, agentes oxidativos e solventes orgânicos), físico-químicos (explosão à vapor e oxidação química), biológicos e combinações afins (BEHERA et al., 2014). Cada pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens, visando sempre a melhora da digestibilidade dos materiais lignocelulósicos, aumento da acessibilidade das enzimas à celulose e a recuperação da hemicelulose e lignina para a produção de produtos de alto valor (SUN et al., 2016).

Os objetivos de um pré-tratamento são: aumentar a porosidade e a superfície da biomassa, reduzir cristalinidade e a diminuição do grau de

polimerização da celulose e alterar a estrutura da lignina, visando uma melhora na hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2015 e MAURYA et al., 2015).

Um pré-tratamento altera ou remove a hemicelulose, modifica a estrutura da lignina removendo-a ou precipitando-a através de reações de condensação (Figura 13) (PANAGIOTOPOULOS et al., 2011). Estes efeitos sobre a biomassa levam a um aumento a acessibilidade das enzimas, celulasas, à celulose. Assim, através da hidrólise enzimática da celulose ocorre a liberação de glicose, enquanto a xilose pode ser solubilizada diretamente do pré-tratamento (CHANDRA et al., 2008).

Figura 13: Representação do efeito do pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: MOSIER et al., 2005.

Um pré-tratamento ácido ou uma hidrólise ácida pode ser feito com ácido concentrado ou diluído. A diferença está nos parâmetros utilizados como: concentração de ácido, razão sólido / líquido e temperatura (BEHERA et al., 2014).

O uso de um ácido concentrado em baixa temperatura, permite obter um rendimento maior nos açúcares advindos da celulose, como a glicose, mas a taxa de hidrólise é mais lenta (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016). Uma grande desvantagem no uso do ácido concentrado é a formação de compostos inibitórios da fermentação, como o furfural e o 5-hidroximetil furfural, advindos da decomposição de pentoses e hexoses, respectivamente

(RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016). Além da formação desses compostos inibitórios, há a corrosão dos equipamentos, toxicidade do ácido ao meio ambiente, um consumo elevado do ácido e uma baixa recuperação do mesmo, devido a uma alta demanda energética (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

Em um pré-tratamento com ácido diluído há um menor consumo de ácido, mas é necessário condições de maior temperatura, de 160° a 220° C, para obter um rendimento elevado de glicose (Tabela 1) (BRIENZO et al., 2015 e RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

Os ácidos são usados como catalisadores (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016), e os mais utilizados são os ácidos inorgânicos como: o ácido sulfúrico (H₂SO₄), o ácido clorídrico (HCl), o ácido nítrico (HNO₃), e o ácido fosfórico (H₃PO₄). O ácido sulfúrico é o mais utilizado pelo baixo custo. Alguns ácidos orgânicos estão sendo estudados para também serem usados, como o ácido paracético (C₂H₄O₃) e ácido maleico (C₄H₄O₄) (BEHERA et al., 2014).

Tabela 1: Efeitos na aplicação de um pré-tratamento ácido diluído

Pré-tratamento ácido diluído	
Celulose	Pouca remoção e baixa despolimerização
Hemicelulose	Remoção quase que completa dependendo das condições empregadas
Lignina	Pouca remoção, mas ocorre mudança na estrutura, condensando-a na superfície da fibra (realocação e pseudo-lignina)
Vantagens	Condições intermediárias de severidade: produção de xilose (hemicelulose)
Desvantagens	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e caro.

Fonte: Autor

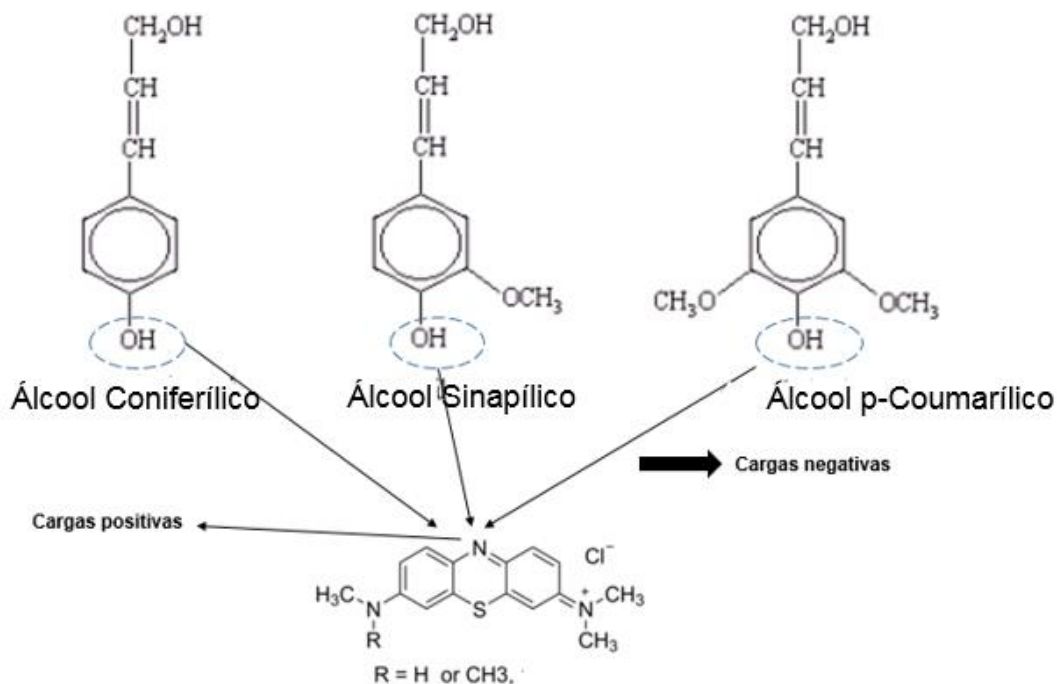
2.9. Área Superficial da Lignina (ASL)

A hidrólise ácida ou pré-tratamento ácido ao ser aplicado na biomassa vegetal, remove pouca celulose, mas pode solubilizar completamente a

hemicelulose, e principalmente modifica a estrutura da lignina, condensando-a na superfície da fibra, formando a pseudo-lignina (SIPPONEN et al., 2014). Assim, com a concentração da lignina em algumas regiões da fibra, durante o pré-tratamento, ocorre um aumento na sua área superficial, levando a uma maior acessibilidade das enzimas à celulose. O efeito direto no aumento da acessibilidade à celulose é o aumento na sacarificação enzimática (BRIENZO et al., 2015; 2017) e conseqüentemente na fermentação microbiana (KIM et al., 2014). Estudos recentes mostraram que a modificação da lignina através do pré-tratamento ácido é um fator mais determinante na acessibilidade à celulose do que mudanças no grau de polimerização e cristalinidade (BRIENZO et al., 2015).

Para determinar a área superficial da lignina é usado o método colorimétrico que determina os grupos hidroxilas (OH^-) da lignina ácida acessíveis na superfície e em frações sólidas lignocelulósicas (Figura 14). O método é baseado na adsorção seletiva do corante básico Azure B com carga catiônica, induzindo a ligação a grupos ácidos aniônicos (SIPPONEN et al., 2014).

Figura 14: Representação da reação química entre grupos hidroxilas (OH⁻) no anel aromático dos álcoois fenilpropanóides da lignina com o corante Azure B.



Fonte: Adaptado de WHETTEN et al., 1998

2.10. Acessibilidade à celulose e sua determinação

As biomassas lignocelulósicas são matérias-primas ricas em celulose, e por isso, podem ser usadas como fonte de energia para bioconversão em bioetanol. Entretanto, essas biomassas têm estruturas complexas e recalcitrantes e que dificultam o acesso à celulose. A acessibilidade à celulose tem sido indicada como um fator importante para digestibilidade das biomassas lignocelulósicas (BRIENZO et al., 2015; 2017).

Para aumentar essa acessibilidade é necessário a remoção da hemicelulose e da lignina, quebrar as ligações de hidrogênios intra e intermolecular e a diminuição da cristalinidade da celulose (HUANG et al., 2009 e KARIMI e TAHERZADEH, 2016).

A hidrólise ácida remove a hemicelulose, altera a estrutura da lignina, modifica a estrutura físico-química da biomassa na sua superfície de contato, no tamanho dos poros, na cristalinidade, reduz o grau de polimerização (degree of

polymerization-DP) da celulose que influencia na acessibilidade enzimática (BRIENZO e al., 2015 e SUN et al.,2016). As microfibrilas de celulose são porosas, com uma área superficial que pode ser dividida em: interna com poros, fissuras e micro rachaduras e a externa caracterizada pela superfície exposta da celulose (ARANTES e SADDLER, 2011). A área da superfície externa é relacionada ao tamanho e forma das partículas, enquanto, a área de superfície interna depende da estrutura capilar das fibras celulósicas (BEHERA et al., 2014).

A acessibilidade à celulose, área superficial, é uma combinação entre parte interna e externa. Para medir essa acessibilidade existem várias metodologias como intrusão de mercúrio, termoporometria, tomograma de elétrons, adsorção de gás e de corantes. A metodologia mais utilizada é com corante, de Simon's stain.

Essa metodologia foi desenvolvida com o objetivo de medir o dano microscópico causado nas fibras de material lignocelulósico após moagem (SIMONS, 1950). A Simon's stain combina dois corantes: o Laranja (Direct Orange-DO) que tem moléculas maiores (5 a 36 nm), com grande afinidade a celulose e adsorve na superfície externa do material. O corante Azul (Direct Blue-DB) possui moléculas de pequeno tamanho molecular (1 nm), com baixa afinidade a celulose e ocupam os poros menores da fibra (CHANDRA et al., 2008).

A combinação na aplicação desses corantes resulta em uma coloração diferencial de duas cores medindo o interior e o exterior da área superficial das lignoceluloses de biomassas não tratadas e pré-tratadas (CHANDRA et al., 2008). Quando aplicado o corante azul, suas moléculas adsorvem aos poros da fibra penetrando, depois as moléculas do corante laranja penetram nos poros deslocando as moléculas do corante azul pela sua maior afinidade a celulose (CHANDRA et al., 2008).

2.11. Hidrólise Enzimática

A conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol celulósico pode ser feito de duas maneiras: pela conversão bioquímica ou termoquímica.

Na conversão bioquímica as enzimas são utilizadas e, passa por quatro etapas principais: um pré-tratamento físico-químico, uma hidrólise enzimática, uma fermentação dos monossacarídeos derivados dos carboidratos e uma destilação (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). Na conversão termoquímica, as biomassas são gaseificadas sob alta temperatura para produzirem monóxido de carbono, hidrogênio e dióxido de carbono, e depois convertidos em etanol através de catálise química, usando dissulfeto de molibdênio, ou biologicamente usando micro-organismos como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium ljungdahlii* ou *Zymomonas mobilis* (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A hidrólise enzimática, juntamente com as hidrólises com ácido concentrado e diluído, são as técnicas mais utilizadas para a obtenção de carboidratos fermentáveis advindos de materiais lignocelulósicos. O uso da hidrólise enzimática é um método alternativo, seguro e ambientalmente amigável comparado à hidrólise química. As enzimas também são consideradas uma fonte rentável se forem produzidas por micro-organismos nas usinas (ELGHARBAWY et al., 2016). Na tabela 2, são comparados as condições e o desempenho dos três processos de hidrólise.

Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise.

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose (%)
Ácido diluído	< 1% de H ₂ SO ₄	215	3 min	50 a 70
Ácido concentrado	30 a 70 % de H ₂ SO ₄	40	2 a 6 h	90
Enzimática	Celulase	50	1,5 dias	75 a 95

Fonte: HAMELINCK et al., 2005

Para realizar a sacarificação enzimática em larga escala, alguns obstáculos precisam ser superados como a recalcitrância da celulose e hemicelulose na biomassa, altos custos enzimáticos e baixa atividade enzimática (GUO et al., 2018). Após o material lignocelulósico ter passado por um pré-tratamento, no qual a estrutura recalcitrante e complexa das biomassas foi alterada (CHUNDAWAT et al., 2007), e as suas características físico-química

como: redução da cristalinidade da celulose, do grau de polimerização e o aumento da porosidade, melhoram a receptividade do substrato da biomassa às enzimas, e isto, influencia na hidrólise enzimática e na sua cinética (BRIENZO et al.,2015).

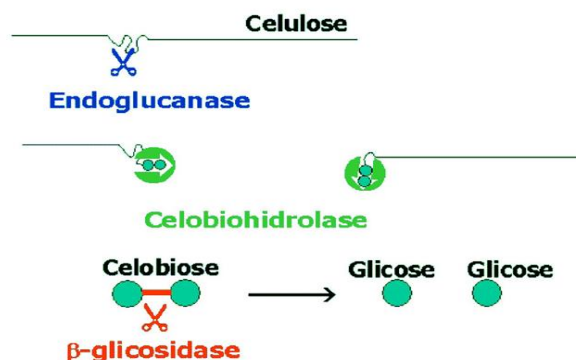
Na sacarificação da celulose são usadas três enzimas primárias: endoglucanase, exoglucanase e a β -glicosidase. Essas enzimas, as celulases, são um sistema enzimático de vários componentes que despolimeriza a celulose em glicose através da quebra das ligações glicosídicas. Quando usadas em conjunto, apresentam ação sinérgica, onde o efeito das enzimas combinadas é maior do que o efeito de cada uma delas agindo separadamente (CASCIATORI e FRASSATTO, 2018).

A endoglucanase (EGs) é responsável por clivar aleatoriamente regiões amorfas da celulose internamente ao longo da cadeia, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos. São responsáveis pela diminuição do grau de polimerização da celulose, assim, as novas extremidades da cadeia de celulose são mais suscetíveis à ação das celobiohidrolase (CASCIATORI e FRASSATTO, 2018).

A exoglucanase ou celobiohidrolase (CBs) age nas extremidades da cadeia de celulose, nas terminações livres da cadeia (extremidades reductoras e não-reductoras) geradas pelas endoglucanases hidrolisando a celulose e produzindo unidades de celbiose (dímero de glicose), as quais são solúveis em água (WALLACE et al., 2016).

A β -glicosidase finaliza o processo por meio da hidrólise de celbiose em monômeros de glicose (WALLACE et al., 2016).

Figura 15: Esquema da ação catalítica do complexo enzimático celulolítico sobre a cadeia de celulose com geração de glicose.



Fonte: OGEDA e PETRI, 2010

2.12. Granulometria – tamanho de partícula

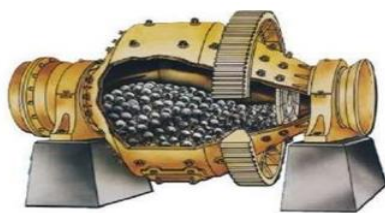
As biomassas lignocelulósicas são heterogêneas e recalcitrantes, e para melhorar o pré-tratamento, a acessibilidade à celulose para a sacarificação enzimática, a primeira etapa a ser feita é o seu fracionamento (ZHENG et al., 2007 e KHULLAR et al., 2013).

O pré-tratamento e a sacarificação enzimática são influenciados pela composição das biomassas e pelo tamanho das partículas (CHUNDAWAT, 2007).

O fracionamento das biomassas em tamanho de partículas diferentes, separa as frações mais recalcitrantes, como espigas e caules, de frações menos recalcitrantes, como folhas e cascas, baseando-se nas diferenças composicionais e anatômicas dessas biomassas (CHUNDAWAT, 2007).

Um pré-tratamento físico muito usado para diminuir o tamanho das partículas é a moagem. Existe vários tipos de moagem como: o moinho de bolas, o moinho de facas, o moinho de martelo e a moagem coloidal (Figura 16). A moagem provoca alterações na estrutura física da biomassa, através do aumento da superfície de contato e na diminuição da cristalinidade da biomassa (TAHERZADEH e KARIMI, 2007), assim, a biomassa se torna menos recalcitrante (ZHU et al., 2010).

Figura 16: Tipos de moinhos empregados na diminuição de materiais lignocelulósicos



Moinho de bolas



Moinho de facas



Moagem coloidal



Moinho de martelos

Fonte: Autor

A redução do tamanho de partículas, através da moagem e do peneiramento, aumenta a área superficial das partículas em relação ao volume, que melhora a acessibilidade das enzimas ao substrato, aumentando a adsorção de enzimas no substrato, que aumenta a taxa de hidrólise da celulose (CHUNDAWAT, 2007 e CHANDRA et al., 2008).

O fracionamento das espigas de milho, folhas e cascas melhoraram o rendimento da hidrólise enzimáticas desses materiais (CHUNDAWAT, 2007). A separação das biomassas em partículas de tamanhos diferentes melhora a solubilização da hemicelulose e a celulose fica intacta (BEHERA et al., 2014).

A redução do tamanho da partícula da celulose pode aumentar a afinidade entre a celulose e enzima e assim aumentar a taxa de hidrólise (YEH et al., 2010).

Dasari e Berson (2007) investigaram o efeito de quatro frações de serragem com tamanhos de partículas diferentes: $33 \mu\text{m} < x \leq 75 \mu\text{m}$, $150 \mu\text{m} < x \leq 180 \mu\text{m}$, $295 \mu\text{m} < x \leq 425 \mu\text{m}$ e $590 \mu\text{m} < x \leq 850 \mu\text{m}$.

As frações com menor tamanho de partícula ($33\text{-}75 \mu\text{m}$) produziram de 50-55% a mais de glicose do que a fração de maior tamanho ($590\text{-}850 \mu\text{m}$). As partículas menores têm maior área de superfície por unidade de volume, portanto, mais celulose pode ser acessível para a enzima atingir e uma taxa mais rápida de hidrólise.

3. OBJETIVOS

Determinar a influência do tamanho de partícula da biomassa no processo de pré-tratamento com ácido diluído e superfície exposta da lignina. Paralelamente avaliar o efeito destas propriedades na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática.

3.1. Objetivos Específicos

- Determinar a fração mássica do bagaço de cana-de-açúcar proveniente de usina;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído na recuperação de massa do bagaço e da fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído na superfície exposta da lignina, utilizando corante Azure B, no bagaço e na fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar;
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento na remoção de lignina e hemicelulose na acessibilidade à celulose utilizando os corantes Direct Orange e Blue, no bagaço e na fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído na hidrólise enzimática do bagaço e da fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material e separação de frações

A cana-de-açúcar e o bagaço foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de Piracicaba/SP e pela Usina São João de Araras/SP. A biomassa de estudo foi o bagaço e a fração externa (contendo epiderme) do colmo de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar foi fracionada manualmente removendo a fração externa (2 a 3 mm da extremidade, contendo epiderme) (BRIENZO et al., 2014).

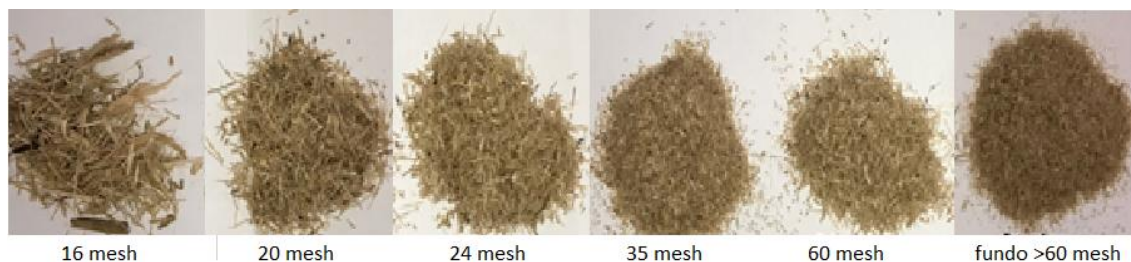
As amostras foram peneiradas em agitador de peneiras (Bertel) em frações de 16 (1,000 mm), 24 (0,710 mm), 35 (0,425 mm), 60 (0,250 mm) e fundo (< 60) mesh (<0,250 mm) (Figuras 17 e 18). Foram utilizadas cerca de 100 g de bagaço e fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar, submetidas a agitação mecânica com intensidade oito, por cerca de 1 h e distribuídas as frações granulométricas de acordo com a abertura de malha crescente da base para o topo. Este padrão de montagem das peneiras foi mantido em todos os peneiramentos.

Figura 17: Tamanho das partículas da fração externa (contendo epiderme) da cana-de-açúcar após o seu fracionamento.



Fonte: Autor

Figura 18: Tamanho das partículas do bagaço de cana-de-açúcar após o seu fracionamento.



Fonte: Autor

4.2. Pré-tratamento com ácido diluído

As amostras da fração externa (contendo epiderme) e do bagaço de cana-de-açúcar foram separadas em diferentes tamanhos de partícula/granulometrias e submetidas ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4) (ZHENG et al., 2014). A quantidade de material usado foi de 5 g, pesadas em balança analítica (Chyo JK-200), e a reação realizada em frascos tipo Scotch de 250 mL, com volume reacional de 50 mL e concentração de ácido sulfúrico de 10 % (m/m, massa de ácido por massa de material). Os frascos foram autoclavados a $121^\circ C$ por 30 min (BRIENZO et al., 2014). Após a reação os frascos foram resfriados, e o material filtrado em papel de filtro empregando vácuo (Marconi – MA 057/1). 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 a 5). O material foi seco em estufa a $45^\circ C$ (Solabe SL-100) e armazenado em frascos plásticos. Os experimentos de pré-tratamento foram realizados em duplicata.

A fração líquida das amostras pré-tratadas foi filtrada em filtros de seringa de $0,22 \mu m$ e utilizada para determinação de açúcares: glicose, xilose e arabinose por cromatografia líquida utilizando coluna Aminex HPX-87H a $60^\circ C$, diluída com ácido sulfúrico 50 mM em um fluxo de $0,6 mL \cdot min^{-1}$. Os açúcares foram quantificados utilizando detector de índice de refração (SLUITER et al., 2010).

4.3. Caracterização química da biomassa *in natura* e pré-tratada

As amostras de fração externa (contendo epiderme) e o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes granulometrias, *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído, foram caracterizadas quanto ao conteúdo de glucana/celulose, hemicelulose/xilana e lignina. As amostras com tamanho de partícula superior a 24 mesh (0,710mm) foram moídas e o material selecionado em peneira de 20 mesh. A composição química foi determinada em reação com ácido sulfúrico concentrado com as amostras livres de extrativos (SLUITER et al., 2010), em duplicata. 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-maria (Panem, Dubnoff 145) a 30°C por 1 h, após a reação a suspensão foi diluída com adição de 84 mL de água destilada e em seguida autoclavados 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 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 205 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⁻¹ em um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Os açúcares foram quantificados utilizando detector de índice de refração, em duplicata.

4.4. Determinação da área superficial da lignina (ASL) e da área superficial específica da lignina (ASEL)

Uma solução do corante Azure B foi preparada em concentração de 1 g.L⁻¹, volume de 100 mL de tampão fosfato em pH 7, adicionada 0,01% de azida sódica, e armazenada em geladeira. A área superficial da lignina (ASL) foi determinada com corantes catiônicos como o Azure B, um corante básico que carrega uma carga catiônica, induzindo a ligação a grupos de ácidos aniônicos. Esse corante determina a área superficial da lignina, fornecendo como base a diferença entre a quantidade de corante adsorvido (inicial e após o ensaio), uma estimativa da área superficial da fibra ocupada por lignina (SIPPONEN et al.,

2014). O método consistiu em colocar cerca de 100 mg das amostras em tubos Falcon de 50 mL, fração externa (contendo epiderme) e o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes granulometrias, 16 (1,000mm), 24 (0,710mm), 35 (0,425mm), 60 (0,250mm) e fundo (< 60) mesh (<0,250mm), 5 mL de solução 0,1 g.L⁻¹ de Azure B em pH 7 a 25°C, por 24 h. A solução foi centrifugada e a absorbância determinada em 280 nm. Neste estudo, os resultados foram expressos na forma de área superficial da lignina (ASL) ocupada, com base no total de material, em m².g⁻¹; e com base na massa total de lignina no material, em m².g⁻¹, sendo a área superficial específica da lignina (ASEL).

4.5. Acessibilidade à celulose

A adsorção de corantes nas fibras foi medida pelo método Simon's stain. Foram adicionadas diferentes concentrações de corantes Laranja (Direct Orange-DO) e Azul (Direct Blue-DB), criando um gradiente de concentração em 6 tubos para cada amostra (CHANDRA et al., 2008).

O corante adsorvido na fibra foi indiretamente determinado pela diferença da concentração inicial e final de corante no sobrenadante. A adsorção de corantes nas fibras foi medida pela adição de 50 mg (massa seca) das amostras pré-tratadas, fração externa (contendo epiderme) e o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes granulometrias, 16 (1,000 mm), 24 (0,710 mm), 35 (0,425 mm), 60 (0,250 mm) e fundo (< 60) mesh (<0,250 mm), em seis tubos de centrífuga de 15 mL e 0,5 ml de solução tampão fosfato salina (pH 6, a 0,3 mol/L PO₄³⁻, 1,4 mM NaCl) foi adicionado a cada tubo. A solução do corante laranja (10 mg.mL⁻¹) foi adicionada em diferentes volumes (0,06, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75, 1,0 mL) nos tubos contendo amostras. A solução do corante azul (10 mg.mL⁻¹) também foi adicionada a cada tubo da mesma forma para obter no final um conjunto de tubos com uma mistura 1:1 de corantes laranja e azul em diferentes concentrações. Os tubos foram preenchidos com água destilada até um volume final de 5 mL. Os tubos foram mantidos a 70°C por 6h a 120 rpm, em shaker (SL-222, SOLAB) e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min, e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para leitura de absorbância 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:

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

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

Onde: A é a adsorção da mistura em 450 ou 624 nm, ε 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.

4.6. Hidrólise enzimática das amostras

As amostras, fração externa (contendo epiderme) e o bagaço de cana-de-açúcar em diferentes granulometrias, 16 (1,000 mm), 24 (0,710 mm), 35 (0,425 mm), 60 (0,250 mm) e fundo (< 60 mesh) (<0,250 mm), pré-tratadas e *in natura* com ácido diluído 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 coquetel comercial (Cellic Cetec 2), em 10 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmolo. L⁻¹, pH 4,8 (BRIENZO et al., 2015). A atividade enzimática foi de 15 FPU.g⁻¹ de substrato em reação a 50°C e agitação de 150 rpm em incubadora shaker (SL-222, SOLAB), por 24 h (BRIENZO et al., 2015). O rendimento em glicose foi calculado (anidroglicose liberada em relação ao conteúdo de glucana/celulose) a partir do teor de celulose presente na biomassa. A concentração de açúcar redutor liberado por ação enzimática foi determinada por DNS e quantificada como glicose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

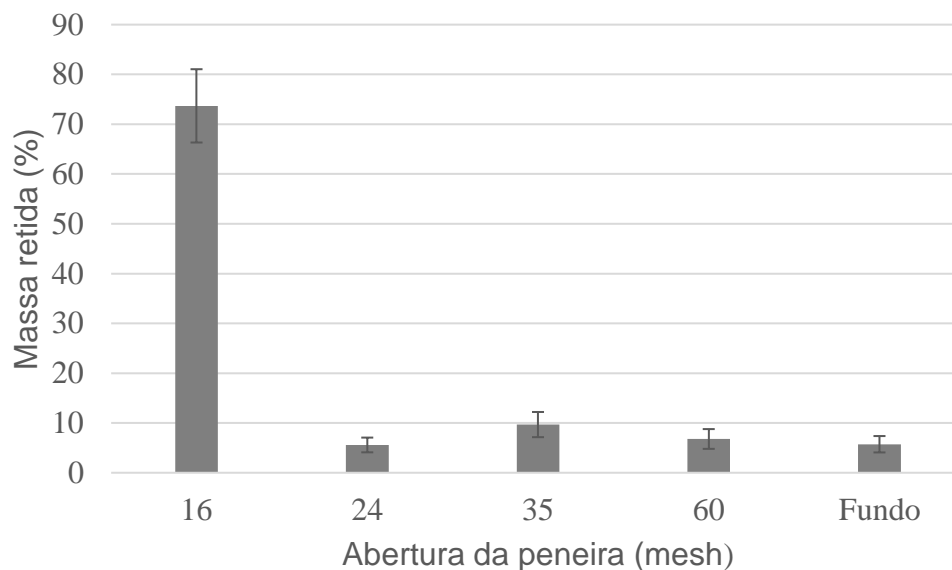
5.1. Determinação da fração mássica do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente de usina foi submetido a peneiramento para determinar o perfil de distribuição de partículas. A figura 19 mostra a porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar nas diferentes peneiras, conforme descrito no item 4.1. A fração externa não foi submetida ao peneiramento para determinação do perfil de distribuição de partículas.

A maior parte do bagaço, 73,69 %, foi retido na peneira com maior abertura, 16 mesh, mostrando o tamanho das partículas de bagaço que predominam após a extração na moenda da cana-de-açúcar (Figura 19). A massa de bagaço que ficou retido na peneira de 35 mesh, foi a segunda maior porcentagem, 9,68 % (Figura 19). O bagaço retido nas outras peneiras de 24, 60 mesh e o fundo, apresentou porcentagens de 5,58 %, 6,79 % e 5,73%, respectivamente (Figura 19).

A diferença entre a maior porcentagem de massa de bagaço retida, na peneira de 16 mesh, para a segunda maior porcentagem de massa retida, na peneira de 35 mesh, foi de 64,01 %. E essa diferença aumentou, quando comparado com as partículas de menores tamanhos, peneira de 60 mesh, para 66,90 %.

Figura 19: Porcentagem da massa retida de bagaço de cana-de-açúcar com o peneiramento.



5.2. Efeito do pré-tratamento ácido diluído na recuperação de massa

O bagaço e a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar foram submetidos ao pré-tratamento ácido diluído (10 %, massa de ácido por massa de material). O material pré-tratado teve suas propriedades e composições modificadas em função do pré-tratamento e suas condições (BRIENZO et al., 2017). A Tabela 3 apresenta os valores das massas recuperadas do bagaço e fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar.

A recuperação de massa depois de um pré-tratamento pode indicar a recalcitrância da biomassa, sendo a solubilização de carboidratos um dos principais fatores que colaboram com essa perda (BENJAMIN et al., 2013).

Na hidrólise ácida, ocorre a remoção de hemicelulose, que tem menor massa molecular e está presente em menor quantidade nas biomassas lignocelulósicas do que a celulose. Após o pré-tratamento, com a solubilização da hemicelulose, ocorre aumento no conteúdo de celulose e lignina no material (SANTOS et al., 2018).

A recuperação das biomassas de cana-de-açúcar, de maneira geral, apresentou resultados próximos para os diferentes tamanhos de partículas das amostras. O bagaço apresentou 59,81 %, 57,23 %, 55,16 %, 54,91 % e 53,92 %, de massas recuperadas nas peneiras com abertura de 16, 24, 35 e 60 mesh e fundo, respectivamente (Tabela 3).

As massas recuperadas para a fração externa foram 37,12 %, 33,76 %, 34,15 %, 33,95 % e 31,42 %, nas peneiras com abertura de 16, 24, 35 e 60 mesh e fundo, respectivamente (Tabela 3).

Para o bagaço de cana-de-açúcar, a massa recuperada na peneira de maior abertura, 16 mesh, foi de 59,81 %, e na peneira de menor abertura, fundo, foi de 53,92 %, uma diferença de 5,89 % de massa recuperada, entre os materiais retidos nas duas peneiras. Para a fração externa a recuperação da massa foi menor, 37,12 % e 31,42 %, respectivamente, nas mesmas peneiras, uma diferença de 5,70 % de massa recuperada, entre as duas peneiras (Tabela 3).

A recuperação de massas entre o bagaço e a fração externa, na peneira de 16 mesh, o maior tamanho de partícula, a recuperação de massa foi maior para o bagaço em relação a fração externa, 22,69 %. Na peneira de menor tamanho de partícula, o fundo, a diferença de massas recuperadas é de 22,5 % maior para o bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 3).

Em um pré-tratamento com bagaço e ácido sulfúrico 10 % (v/v) durante 30 min de reação, apresentou massa recuperada de 74,91 % (CANDIDO, et al., 2012). Comparando com a massa retida na peneira de abertura 16 mesh, o maior tamanho de partícula, 59,81 % (Tabela 3) apresentando uma diferença de 15,01 %.

A fração externa pré-tratada nas mesmas condições deste trabalho teve sua recuperação de massa reportada como 37,55 % (AZEVEDO, 2018). A massa retida na peneira de abertura 16 mesh, o maior tamanho de partícula, da fração externa foi 37,12 % (Tabela 3). A recuperação de massa foi semelhante, com uma diferença de 0,43 %.

Comparando as biomassas da cana-de-açúcar, o bagaço recuperou mais massa do que a fração externa (Tabela 3). As duas biomassas apresentaram aumento na porcentagem de glicose, como apresentado no próximo tópico (Figura 20) no material pré-tratado, mas a fração externa apresentou um

aumento maior em relação ao bagaço. O teor de lignina seguiu o mesmo comportamento/padrão que a glucana, aumentando mais para a fração externa após o pré-tratamento (Tabela 4 e 5). Estes resultados indicariam que o bagaço tem uma estrutura mais ordenada e provavelmente menos suscetível ao pré-tratamento ácido do que a fração externa da cana-de-açúcar. Entretanto, a massa perdida não levou em consideração a quantidade de extrativos presentes em cada material. A fração externa pode apresentar cerca de 40% de extrativos (AZEVEDO, 2018). Desta forma, parte da massa solubilizada foi proveniente dos extrativos da fração externa. Um estudo da recalcitrância das frações da biomassa de cana-de-açúcar apontou a fração externa com maior recuperação de massa, neste estudo os extrativos foram removidos antes do pré-tratamento (BRIENZO et al., 2014).

Tabela 3: Porcentagem de massa recuperada do bagaço e fração externa (epiderme) da cana-de-açúcar, em diferentes granulometrias, após pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).

Abertura da peneira (mesh/mm)	Massa recuperada (% , m/m)	
	Bagaço	Fração externa
16 (1,000)	59,81 ± 0,23	37,12 ± 0,42
24 (0,710)	57,23 ± 2,48	33,76 ± 0,37
35 (0,425)	55,16 ± 0,01	34,15 ± 4,39
60 (0,250)	54,91 ± 0,60	33,95 ± 0,09
Fundo (<0,250)	53,92 ± 1,23	31,42 ± 0,61

5.3. Composição química do hidrolisado (fração líquida)

A fração líquida obtida no pré-tratamento das amostras de bagaço e fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar foi utilizada para determinação dos açúcares solubilizados: glicose, xilose e arabinose por cromatografia líquida, conforme descrito no item 4.2, e os resultados estão esboçados nos nas figuras 20, 21 e 22.

O bagaço apresentou 0,03 g.L⁻¹, 0,06 g.L⁻¹, 0,03 g.L⁻¹, 0,06 g.L⁻¹, e 0,07 g.L⁻¹, de liberação de glicose para os materiais pré-tratados/retidos nas peneiras de abertura 16, 24, 35 e 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 20).

As maiores liberações de glicose do bagaço ocorreram com os materiais retidos nas peneiras de abertura 60 mesh, $0,06 \text{ g.L}^{-1}$, e fundo, $0,07 \text{ g.L}^{-1}$, os menores tamanhos de partículas. No material retido na peneira de abertura 16 mesh, o maior tamanho de partícula, apresentou a menor liberação de glicose, $0,03 \text{ g.L}^{-1}$. Uma vez que o pré-tratamento foi aplicado em condições de baixa severidade, baixa concentração de ácido, a celulose foi pouco afetada (solubilizada).

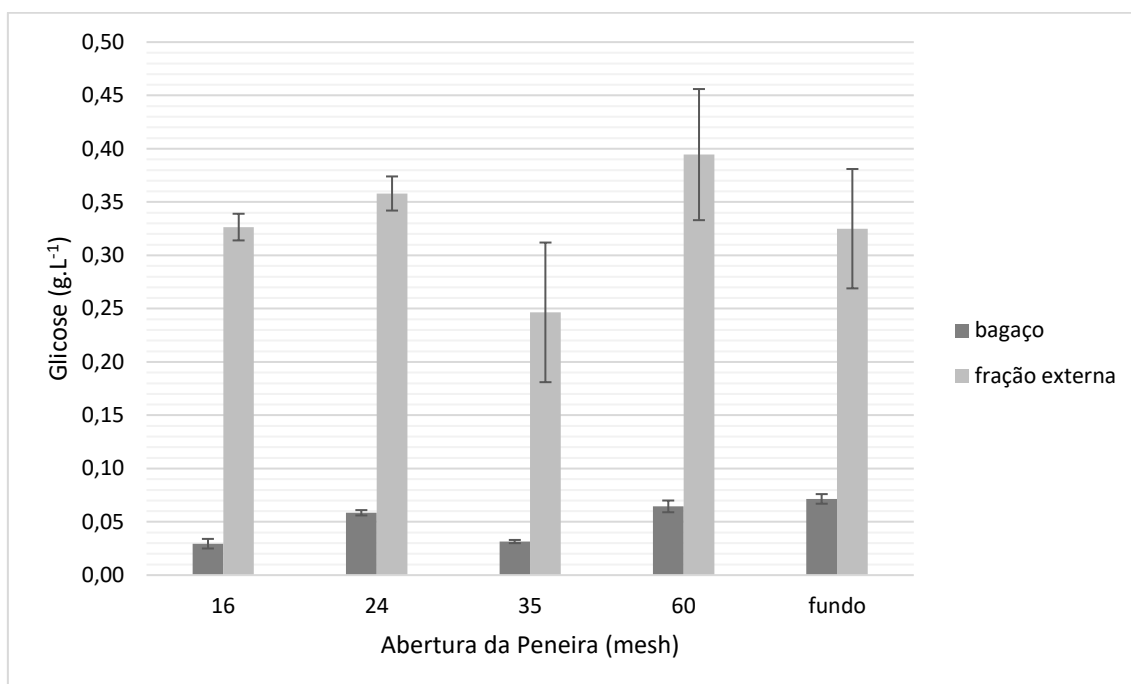
A fração externa (contendo epiderme) apresentou $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, $0,36 \text{ g.L}^{-1}$, $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, $0,39 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, de solubilização de glicose para os materiais pré-tratados/retidos nas peneiras de abertura 16, 24, 35, 60 e o fundo, respectivamente (Figura 20). A maior liberação de glicose com a fração externa ocorreu com material retido na peneira de abertura 60 mesh, o menor tamanho de partícula, $0,39 \text{ g.L}^{-1}$; e a menor liberação de glicose foi na peneira de abertura 35 mesh, $0,25 \text{ g.L}^{-1}$.

Os materiais retidos nas peneiras de abertura 16 mesh e 35 mesh, apresentaram as menores liberações de glicose. O bagaço apresentou uma liberação de $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, para os materiais das duas peneiras. A fração externa apresentou $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, na peneira de abertura 35 mesh.

As maiores liberações de glicose ocorreram nas massas retidas na peneira de abertura 60 mesh e o fundo, os menores tamanhos de partículas. O bagaço apresentou $0,07 \text{ g.L}^{-1}$, no fundo, e a fração externa $0,39 \text{ g.L}^{-1}$, na peneira de abertura 60 mesh.

Trabalhos da literatura apresentaram maior solubilização de açúcares com maior severidade no pré-tratamento. A concentração de glicose obtida com esse pré-tratamento com 4 % (v/v) de ácido sulfúrico foi de 3,4 % e de xilose 17,8 % (SRITRAKUL et al., 2017) A amostra de bagaço em estudo resultou em $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e $0,16 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose, para o material retido na peneira de maior tamanho de partículas, 16 mesh. Os baixos rendimentos de glicose mostrariam que a fração glucana foi pouco alterada durante o pré-tratamento, sendo que a glicose obtida provavelmente veio da fração amorfa da celulose, mantendo assim os sólidos pré-tratados com alto teor de celulose (SRITRAKUL et al., 2017).

Figura 20: Concentração de glicose determinada no hidrolisado do pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min) no bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.



A solubilização da hemicelulose em xilose é um indicador primário na eficiência do pré-tratamento ácido diluído. O bagaço apresentou 0,16 g.L⁻¹, 0,27 g.L⁻¹, 0,13 g.L⁻¹, 0,26 g.L⁻¹ e 0,25 g.L⁻¹, de solubilização de xilose para os materiais pré-tratados/retidos nas peneiras de abertura 16, 24, 35 e 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 21). As menores solubilizações de xilose ocorreram nas massas retidas nas peneiras de abertura 35 mesh e 16 mesh, 0,13 g.L⁻¹ e 0,16 g.L⁻¹, respectivamente. Nas massas retidas no fundo e nas peneiras de abertura 60 mesh e 24 mesh, apresentaram valores próximos na solubilização de xilose 0,25 g.L⁻¹, 0,26 g.L⁻¹ e 0,27 g.L⁻¹, respectivamente.

A fração externa apresentou 0,23 g.L⁻¹, 0,26 g.L⁻¹, 0,20 g.L⁻¹, 0,25 g.L⁻¹ e 0,19 g.L⁻¹, de solubilização de xilose, nos materiais pré-tratados/retidos nas peneiras de abertura 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 21). As menores solubilizações de xilose na fração externa ocorreram nas massas retidas no fundo 0,19 g.L⁻¹, e na peneira de abertura 35 mesh 0,20 g.L⁻¹. Nos materiais retidos nas peneiras de abertura 60 mesh e 24 mesh, apresentaram as maiores solubilizações de xilose 0,25 g.L⁻¹ e 0,26 g.L⁻¹, respectivamente. As maiores solubilizações de xilose foram nas biomassas retidas na peneira de

abertura 24 mesh, o segundo maior tamanho de partícula. Para a fração externa, 0,27 g.L⁻¹, e para o bagaço 0,26 g.L⁻¹ (Figura 21).

As menores solubilizações de xilose ocorreram em biomassas com partículas de tamanhos diferentes. O bagaço apresentou 0,13 g.L⁻¹ de solubilização de xilose, no material retido na peneira de abertura 35 mesh, e a fração externa de 0,19 g.L⁻¹ na peneira de menor tamanho de partícula, fundo, com uma diferença de 1,46 % a mais de xilose solubilizada no bagaço (Figura 21).

A solubilização de xilose tanto no bagaço como para a fração externa, nos materiais retidos nas peneiras com maior (24 mesh) e menor (60 mesh) tamanhos de partículas não foi diferente (Figura 21), indicando que a redução do tamanho de partícula não alterou a hidrólise da hemicelulose em xilose (Figura 21).

O bagaço apresentou 0,05 g.L⁻¹, 0,04 g.L⁻¹, 0,06 g.L⁻¹ e 0,06 g.L⁻¹, de solubilização de arabinose para os materiais pré-tratados/retidos nas peneiras de abertura 24 , 35 , 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 22). As maiores solubilizações de arabinose, 0,06 g.L⁻¹, ocorreram nas massas retidas nas peneiras de menor tamanho de partícula, 60 mesh e fundo.

A fração externa apresentou 0,02 g.L⁻¹, 0,04 g.L⁻¹, 0,04 g.L⁻¹, 0,03 g.L⁻¹ e 0,02 g.L⁻¹, de solubilização de arabinose nas massas pré-tratadas/retidas nas peneiras de abertura 16 mesh, 24 , 35 , 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 22).

As maiores solubilizações de arabinose, 0,04 g.L⁻¹, ocorreram nas massas retidas nas peneiras de abertura 24 mesh e 35 mesh, enquanto as menores solubilizações 0,02 g.L⁻¹, ocorreram nas massas retidas nas peneiras de abertura 16 mesh, maior tamanho de partícula e no fundo, menor tamanho de partícula.

A liberação de arabinose foi a menor entre os três carboidratos em estudo, pois é um componente que aparece em baixa porcentagem no material.

Figura 21: Concentração de xilose determinada no hidrolisado com pré-tratamento ácido diluído (10%, m/m, 121°C/30 min) no bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.

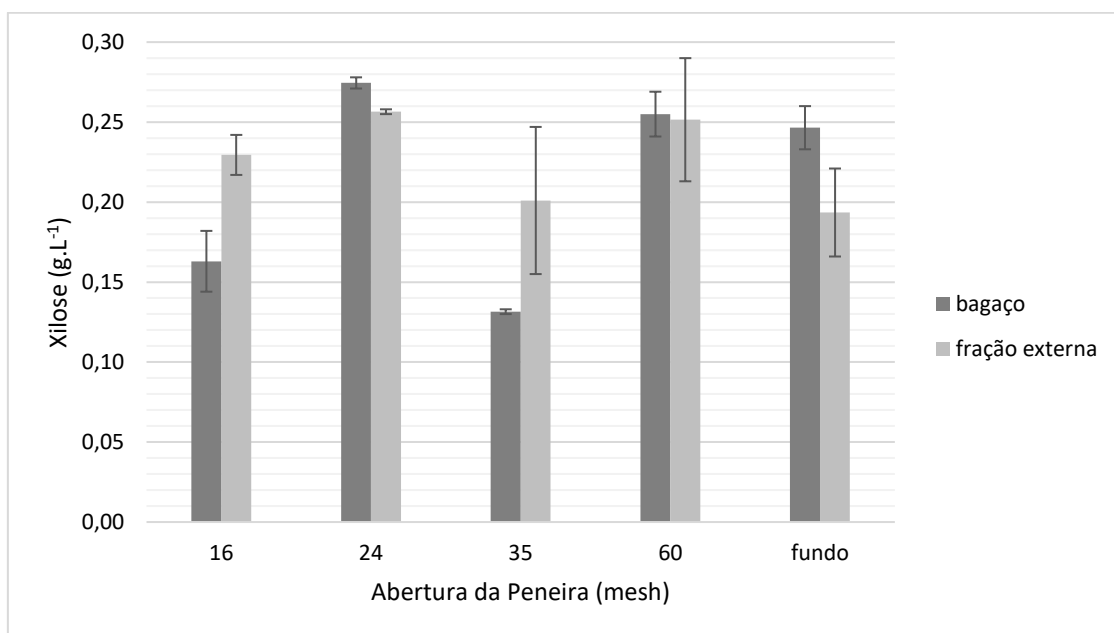
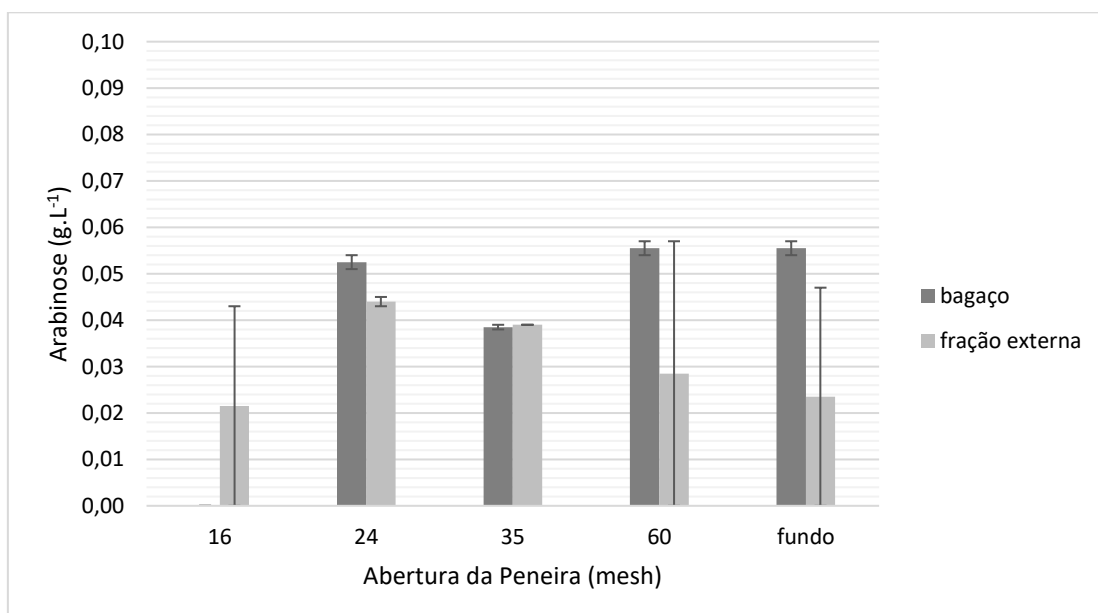


Figura 22: Concentração de arabinose determinada no hidrolisado com pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, 121°C/30 min) no bagaço e fração externa de cana-de-açúcar.



O pré-tratamento ácido diluído no bagaço solubilizou mais xilose, 0,27 g.L⁻¹, no material retido na peneira de abertura 24 mesh, depois 0,07 g.L⁻¹, de glicose, na peneira de menor tamanho de partículas, fundo, e arabinose 0,06

g.L⁻¹ no material com menores tamanhos de partículas, 60 mesh e fundo (Figuras 21,20 e 22, respectivamente). Entretanto, a fração externa liberou mais de glicose, 0,39 g.L⁻¹, no material retido na peneira com menor tamanho de partícula, 60 mesh, 0,26 g.L⁻¹ de xilose na peneira de abertura 24 mesh, e 0,04 g.L⁻¹ de arabinose nas peneiras de abertura 24 e 35 mesh (Figuras 21,20 e 22, respectivamente). A solubilização da hemicelulose é um indicador primário na eficiência do pré-tratamento ácido diluído. Estes resultados indicam que a hidrólise ácida solubilizou mais hemicelulose do que celulose, e que a parede celular do bagaço é mais resistente ao pré-tratamento com ácido diluído nas condições aplicadas.

5.4. Composição química das amostras *in natura* e pré-tratadas

O bagaço de cana-de-açúcar e a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar, tanto *in natura* quanto pré-tratadas com ácido diluído, foram caracterizadas quanto a sua composição química. A composição química foi baseada no conteúdo de celulose/glucana, xilose/xilana, xilose/arabinana, ácido acético e lignina (solúvel e insolúvel), os quais são os principais componentes da biomassa lignocelulósica (SIQUEIRA et al., 2017). A caracterização química dos componentes do bagaço pré-tratados e *in natura*, está demonstrado na Tabela 4, e da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar na Tabela 5.

A amostra *in natura* do bagaço apresentou valores de 43,36 % de celulose, 23,27 % de xilana e 21,38 % de lignina (Tabela 4), comparando com outros trabalhos o teor de celulose/glucana de bagaço é de 36,9 % a 48,6% (BRIENZO et al., 2017). O teor de lignina, segundo a literatura, no bagaço *in natura* é de 23 a 32% (CONAB, 2017) e na amostra foi de 21,38%, estando 1,07% abaixo do menor teor de lignina, comparando com a literatura. Diferenças na composição química podem ocorrer em função da variedade, condições de cultivo, clima, e características geográficas.

Nas amostras pré-tratadas de bagaço, os maiores teores de celulose/glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina foi determinado em frações de tamanho de partícula diferentes, 16, 24, 35, 60 mesh e fundo. O maior teor de celulose/glucana, 24,18 %, foi determinado na biomassa retida na

peneira com abertura de 60 mesh. A maior porcentagem de xilana é de 21,71 % e a arabinana 5,58 %, foram determinadas nas biomassas retidas nas peneiras com abertura de 35 mesh. Os maiores teores de ácido acético 3,70 % e de lignina 40,56 %, foram determinados na biomassa de menor tamanho de partícula, o fundo (Tabela 4).

Tabela 4: Composição química (% , massa seca) do bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratadas e *in natura* livre de extrativos em diferentes granulometrias

Abertura da peneira (mesh/mm)	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Ácido Acético (%)	Lignina Total (%)	Total (%)
<i>in natura</i>	43,36 ± 4,02	23,27 ± 4,00	2,03 ± 1,23	3,20 ± 0,02	21,38 ± 1,19	93,24 ± 5,92
16 (1,000)*	20,12 ± 3,42	20,65 ± 1,93	3,36 ± 1,48	2,51 ± 0,47	37,97 ± 1,78	84,59 ± 4,58
24 (0,710)*	20,60 ± 2,65	17,91 ± 1,17	4,22 ± 0,31	3,60 ± 2,05	31,44 ± 1,30	77,76 ± 3,79
35 (0,425)	16,47 ± 2,67	21,71 ± 2,81	5,58 ± 2,40	1,84 ± 0,88	39,72 ± 1,83	85,32 ± 4,99
60 (0,250)	24,18 ± 6,23	16,86 ± 3,41	4,21 ± 1,68	2,57 ± 1,13	38,79 ± 0,11	86,60 ± 7,38
Fundo (<0,250)	19,24 ± 2,73	15,34 ± 1,80	4,28 ± 1,05	3,70 ± 0,92	40,56 ± 0,29	83,12 ± 3,57

* Materiais retidos nas peneiras de 16 e 24 mesh foram moídos e selecionado o passante em peneira de 20 mesh.

A amostra *in natura* da fração externa apresentou 42,30 % de celulose/glucana, 25,93 % de xilana e 28,56 % de lignina (Tabela 5), tendo sido reportado na literatura como tendo teor de celulose para a fração externa de 50,12 % e 29,43 % de lignina (BRIENZO et al., 2014). Diferenças na composição química podem estar relacionadas as características do bagaço/cana-de-açúcar, e, ao modo de preparo do material.

A fração externa da cana-de-açúcar apresentou diferente composição química em função dos tamanhos de partículas. Ao contrário do bagaço, os maiores teores de celulose/glucana 49,92 %, xilana 3,36 % e ácido acético 2,33 % (Tabela 5), foram determinados na biomassa retida na peneira de abertura 24 mesh, o segundo maior tamanho de partícula. Na biomassa retida na peneira com abertura 60 mesh, o menor tamanho de partícula, apresentou o maior teor de lignina 48,58 %.

A fração externa apresentou uma diminuição na porcentagem de xilana 2,33 %, 3,36 %, 2,90 %, 3,05 % e 2,48 % de xilana (Tabela 5), nos materiais retidos nas peneiras com abertura 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, comparando com a amostra *in natura* 25,93 %, e com o bagaço, que apresentou uma menor perda de xilana 20,65 %, 17,91 %, 21,71 %, 16, 86 % e 15,34 % (Tabela 5), nos mesmos materiais.

O pré-tratamento ácido diluído da fração externa resultou em uma diminuição em porcentagem de hemicelulose comparado com a amostra *in natura* (Tabela 5) e com o bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 4), uma maior perda de massa (Tabela 3) e liberação de glicose (Figura 20), mostrando que a fração externa é mais suscetível ao pré-tratamento ácido diluído.

Tabela 5: Composição química (% , massa seca) da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar, pré-tratadas e *in natura* livre de extrativos em diferentes granulometrias

Abertura da peneira (mesh/mm)	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Ácido Acético (%)	Lignina Total (%)	Total (%)
<i>in natura</i>	42,30 ± 3,47	25,93 ± 4,10	0,00 ± 0,00	2,35 ± 0,86	28,56 ± 0,40	99,13 ± 5,45
16 (1,000)*	37,52 ± 3,86	2,33 ± 0,31	0,00 ± 0,00	1,55 ± 0,55	38,89 ± 1,91	80,30 ± 4,35
24 (0,710)*	49,92 ± 2,76	3,36 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,33 ± 0,21	36,57 ± 0,05	92,09 ± 2,77
35 (0,425)	46,57 ± 3,22	2,90 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,29 ± 0,33	34,56 ± 1,09	86,32 ± 3,41
60 (0,250)	41,54 ± 6,54	3,05 ± 1,19	0,00 ± 0,00	1,03 ± 0,43	48,58 ± 2,23	94,20 ± 7,02
Fundo (<0,250)	46,63 ± 5,87	2,48 ± 0,55	0,00 ± 0,00	1,86 ± 0,33	32,68 ± 5,02	83,65 ± 7,75

* Materiais retidos nas peneiras de 16 e 24 mesh foram moídos e selecionado o passante em peneira de 20 mesh.

5.5. Determinação da Área superficial da lignina (ASL) e específica (ASEL) nas biomassas de cana-de-açúcar pré-tratadas

O pré-tratamento ácido diluído tem pouca influência na extração de lignina, permitindo apenas reações de condensação que alteram a sua estrutura na formação de pseudo-ligninas, que se redistribuem na parede celular, (ASSUMPÇÃO, 2015) provavelmente, a redistribuição da lignina sob a parede/fibra torna mais acessível a hemicelulose e a celulose.

Após o pré-tratamento ácido diluído houve um aumento no teor de lignina, em porcentagem (tabelas 4 e 5). Esse aumento ocorre devido a condensação dos fragmentos de lignina na superfície da parede/fibra, realocando a lignina e formando a pseudo-lignina (SIPPONEN et al., 2014). Neste processo ocorre a remoção de outros componentes da biomassa, como a hemicelulose (BRIENZO et al., 2017 e SANTOS, et al., 2018).

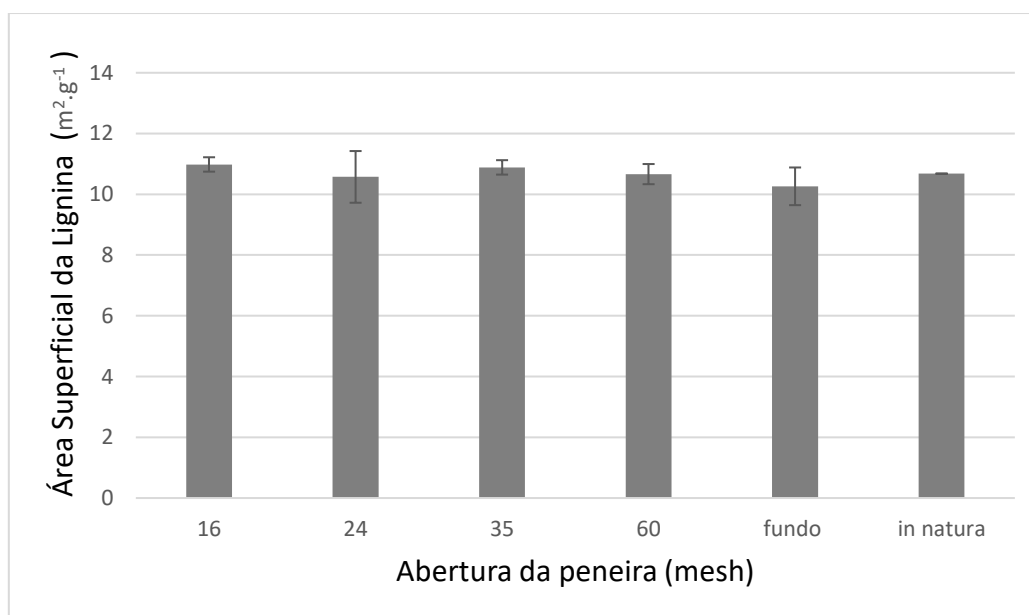
A condensação das ligninas pode indicar uma maior exposição da sua área superficial. Essa exposição foi medida neste estudo pela adsorção do corante Azure B. Um corante catiônico que tem a capacidade de adsorver os

grupos hidroxilas ácidas presentes na lignina, medindo assim a quantidade de lignina presente na biomassa (SIPPONEN et al., 2014).

No bagaço de cana-de-açúcar houve um aumento da lignina, 37,97 %, 31,44 %, 39,72 %, 38,79% e 40,56 %, nos materiais retidos nas peneiras com abertura de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, respectivamente, comparando com a amostra *in natura* 21,38 % (Tabela 4). Com a redução do tamanho das partículas do bagaço, houve condensação de lignina na fibra de celulose, mas esta condensação não provocou aumento na área superficial da lignina (ASL), comparando com a amostra *in natura* (Figura 25).

A amostra de bagaço *in natura* apresentou uma área de $10,68 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e as biomassas retidas nas peneiras de abertura 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, apresentaram uma área superficial total de lignina de $10,98 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$; $10,57 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$; $10,88 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$; $10,66 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e $10,26 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente (Figura 23). Com a diminuição do tamanho de partícula do bagaço das amostras pré-tratadas, não foi constatado alteração da área superficial da lignina (ASL).

Figura 23: Área superficial da lignina (ASL) para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).

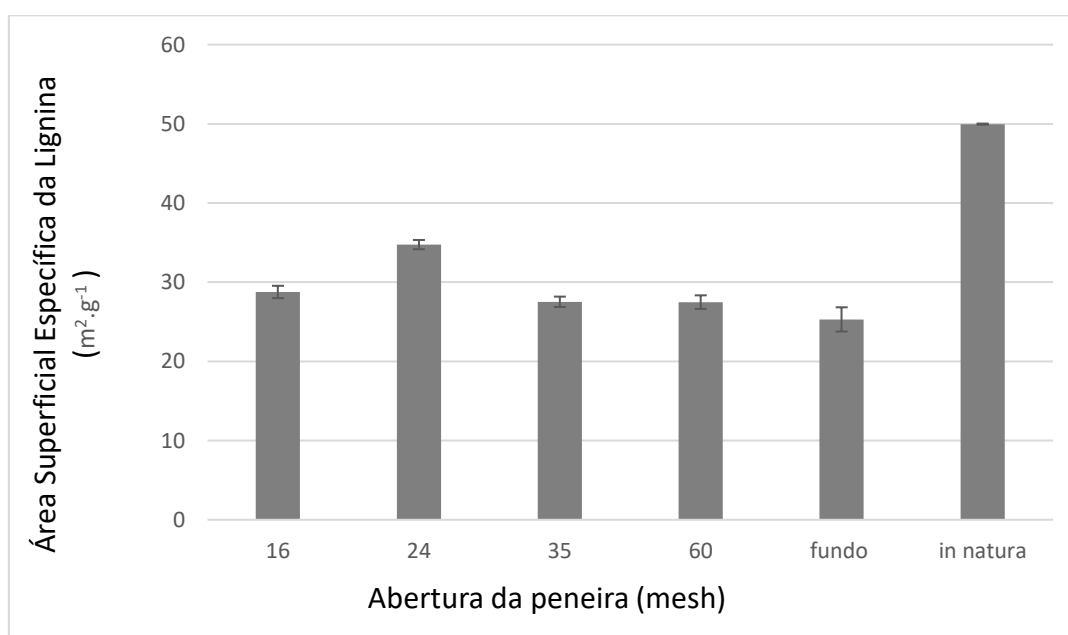


As biomassas retidas de bagaço nas peneiras de abertura 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, apresentaram uma área de $28,77 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $34,75 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $27,53 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $27,49 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e $25,30 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente, e a amostra *in natura* uma área

de $49,96 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (Figura 24). A área superficial específica da lignina (ASEL) no bagaço *in natura* é maior comparada com as pré-tratadas (Figura 24). Com a diminuição do tamanho de partícula do bagaço, a área superficial específica da lignina (ASEL) do bagaço diminuiu.

O material com o menor tamanho de partícula, o fundo, apresentou a menor área superficial específica da lignina (ASEL) $25,30 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, comparando com a amostra *in natura* $49,96 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (Figura 24).

Figura 24: Área superficial específica da lignina (ASEL) para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, $121 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ min}$).



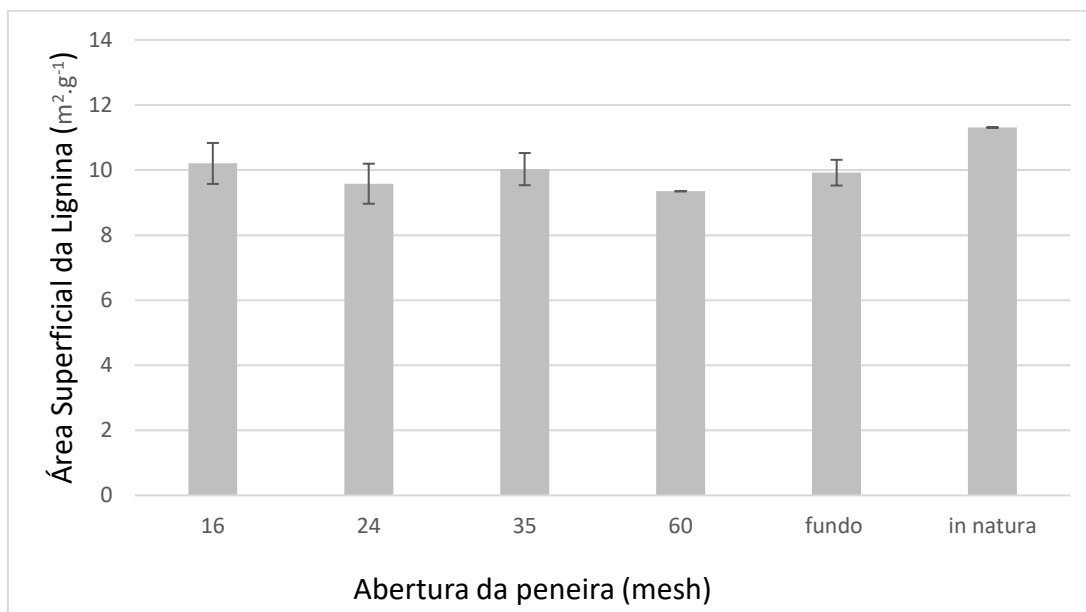
A amostra *in natura* da fração externa (contendo epiderme) apresentou uma área de $11,31 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. As biomassas retidas nas peneiras de 16, 24, 36, 60 mesh e o fundo, apresentaram áreas de $10,21 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $9,58 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $10,03 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $9,35 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e $9,92 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente (Figura 25).

Após o pré-tratamento ácido diluído na fração externa, o material retido na peneira de abertura 60 mesh, o menor tamanho de partícula, apresentou a maior concentração de lignina na fibra de celulose, 48,58 % (Tabela 5). Porém, essa realocação da lignina com o pré-tratamento não alterou a área superficial (ASL) $9,35 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, comparando com a amostra *in natura* $11,31 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (Figura 25).

Em Azevedo, 2018, a área superficial da lignina (ASL) da fração externa, com as mesmas condições de pré-tratamento, apresentou $11,78 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, com

tamanho de partículas em torno 20 mesh. Comparando com o presente estudo, a amostra de fração externa apresentou ASL de $10,21 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, sendo uma diferença de $1,57 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$.

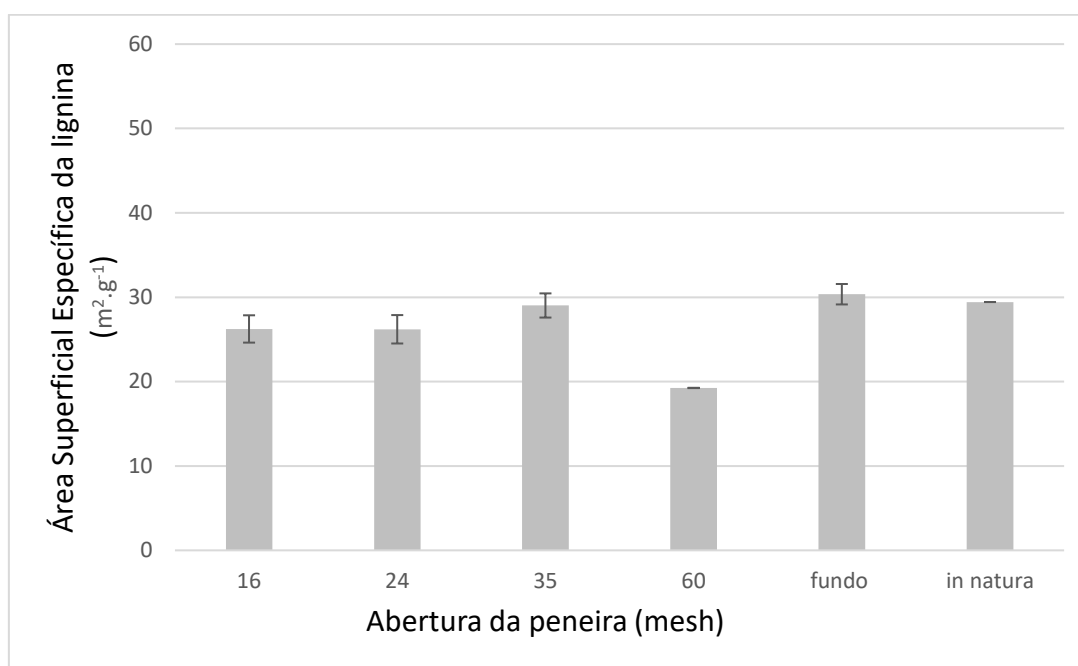
Figura 25: Área superficial da lignina (ASL) para a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).



A fração externa *in natura* apresentou uma área superficial específica da lignina (ASEL) de $29,43 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, e as biomassas retidas nas peneiras de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, apresentaram áreas de $26,24 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $26,20 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $29,02 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $19,25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e $30,36 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente (Figura 26).

A biomassa com o menor tamanho de partícula, 60 mesh, apresentou uma área $19,25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, e comparando essa área com a amostra *in natura*, $29,43 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, houve uma diminuição de $1,5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ da área superficial específica da lignina (ASEL) (Figura 26).

Figura 26: Área superficial específica da lignina (ASEL) para a fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (10 %, m/m, 121 °C/30 min).



Com a diminuição do tamanho de partículas das biomassas da cana-de-açúcar, não houve um aumento na área superficial da lignina (ASL) (Figuras 23 e 25) e superficial específica da lignina (ASEL) (Figuras 24 e 26). Deste modo, não houve uma maior exposição da lignina detectada por adsorção do corante Azure-B. Assim, a diminuição do tamanho de partículas não influenciou na realocação/condensação/exposição da lignina sobre a parede celular/fibra de celulose no bagaço (Tabela 4) e na fração externa (contendo epiderme) (Tabela 5) de cana-de-açúcar.

5.6. Determinação da acessibilidade à celulose com corantes Direct Orange e Blue (Simons' Stain)

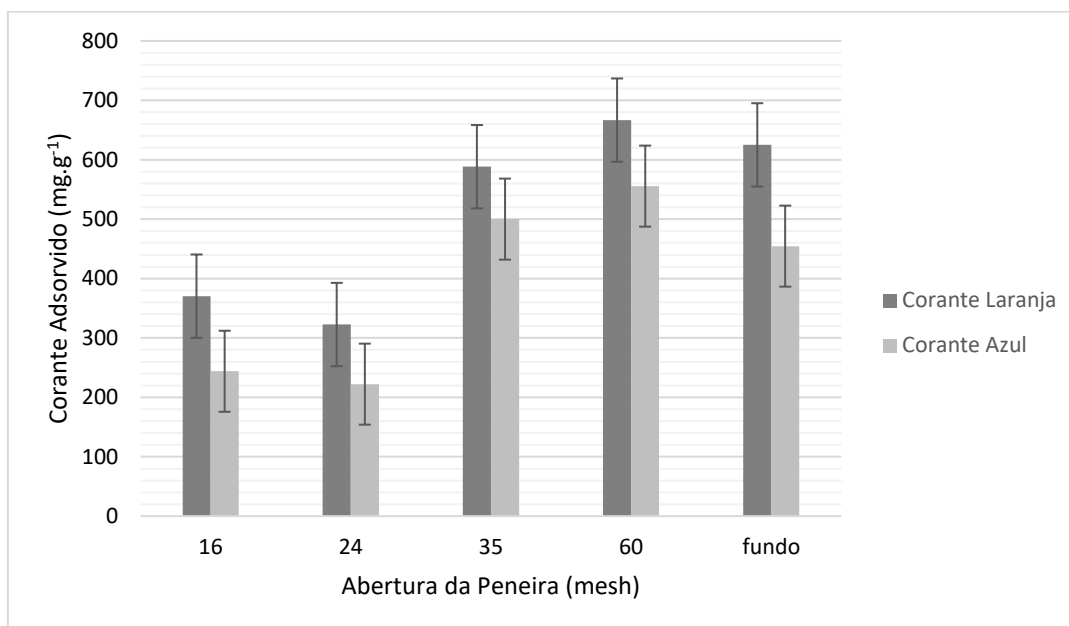
O pré-tratamento ácido diluído aplicado no bagaço e na fração externa (contendo epiderme) da cana-de-açúcar teve como objetivo desorganizar a estrutura da parede celular, modificando a estrutura da lignina, condensando-a nas fibras de celulose, aumentando sua proporção (Tabelas 4 e 5)

(ASSUMPÇÃO, 2015 e BRIENZO et al., 2015). Este aumento de proporção de lignina se deve a remoção de hemicelulose, a qual foi hidrolisada em xilose (Figura 21) (RABELO, 2010 e BRIENZO et al., 2015). Estas modificações na estrutura do material provocaram um aumento da acessibilidade à celulose. Esta acessibilidade foi estimada através da adsorção dos corantes Direct Blue (superfície específica interna) e Direct Orange (superfície específica externa) pelo método de Simon's Stain (CHANDRA et al., 2008). O corante laranja (Direct Orange) se liga à superfície externa da fibra de celulose por apresentar maior afinidade, e o corante azul (Direct Blue) ocupa a superfície interna por penetrar nos poros da parede/fibra de celulose (CHANDRA et al., 2008).

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou adsorções do corante laranja de 370 mg.g^{-1} , 323 mg.g^{-1} , 588 mg.g^{-1} , 667 mg.g^{-1} , 625 mg.g^{-1} , e do corante azul de 244 mg.g^{-1} , 222 mg.g^{-1} , 500 mg.g^{-1} , 556 mg.g^{-1} , 455 mg.g^{-1} , nos materiais retidos nas peneiras com abertura de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 27).

Nas biomassas retidas nas peneiras de abertura 24, 35 e 60 mesh, houve um aumento na adsorção do corante laranja: $322,58 \text{ mg.g}^{-1}$, $588,24 \text{ mg.g}^{-1}$ e $666,67 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente, e azul: $222,22 \text{ mg.g}^{-1}$, $500,00 \text{ mg.g}^{-1}$ e $555,56 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente (Figura 27). Nestes ensaios, a diminuição do tamanho de partícula mostrou-se influente na acessibilidade à celulose a partir da peneira de 24 mesh.

Figura 27: Acessibilidade à celulose após pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar (10 %, m/m, 121 °C/30 min).

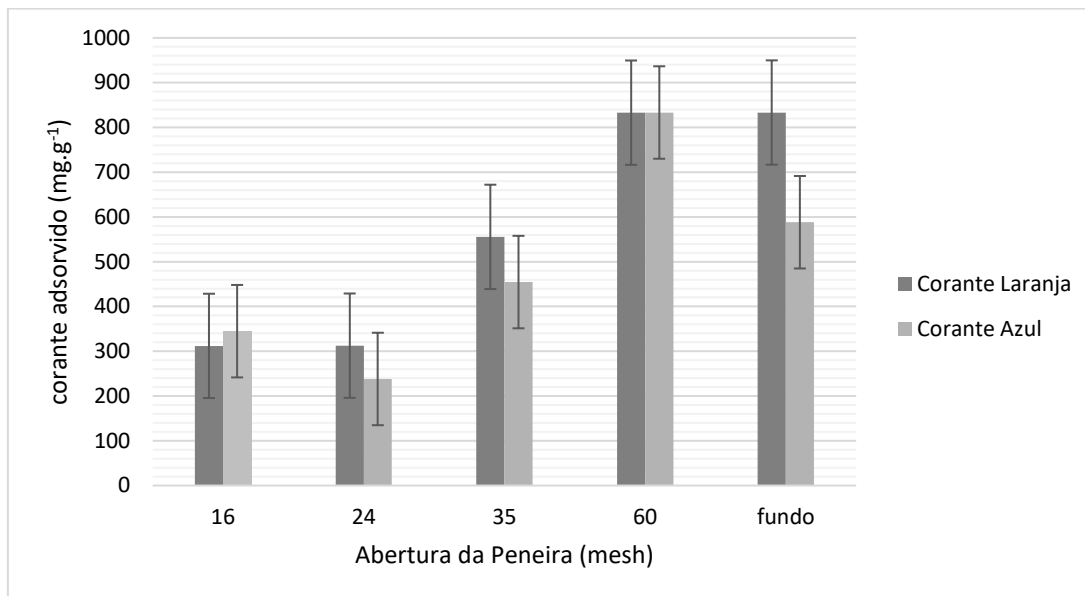


A fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar apresentou adsorções do corante laranja de 312 mg.g⁻¹, 313 mg.g⁻¹, 556 mg.g⁻¹, 833 mg.g⁻¹ e 833 mg.g⁻¹, e do corante azul de 245 mg.g⁻¹, 238 mg.g⁻¹, 455 mg.g⁻¹, 588 mg.g⁻¹, 833 mg.g⁻¹, nos materiais retidos nas peneiras com abertura de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, respectivamente (Figura 28).

Na fração externa houve um aumento na adsorção dos corantes nos materiais retidos nas peneiras de abertura 24, 35 e 60 mesh. O aumento na adsorção do corante laranja foi respectivamente, 312,50 mg.g⁻¹, 555,56 mg.g⁻¹ e 833,00 mg.g⁻¹, e do corante azul: 238,10 mg.g⁻¹, 454,55 mg.g⁻¹ e 833,33 mg.g⁻¹, respectivamente (Figura 28).

Ressalta-se que ocorreu também uma menor recuperação de massa para a fração externa (Tabela 3) e uma maior solubilização de glicose (Figura 20). Estes resultados indicam que diminuindo o tamanho das partículas com o pré-tratamento ácido diluído foi mais eficiente na fração externa do que no bagaço, expondo ou aumentando a acessibilidade à celulose.

Figura 28: Acessibilidade à celulose após pré-tratamento ácido diluído da fração externa (contendo epiderme) da cana-de-açúcar (10 %, m/m, 120 °C/30 min).



A maior adsorção dos corantes laranja e azul no bagaço e na fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar foi no material retido na peneira de abertura 60 mesh, menor tamanho de partícula. Para o bagaço a adsorção foi de 666,67 mg.g⁻¹ e 555,56 mg.g⁻¹, respectivamente (Figura 27) e para a fração externa foi de 833,00 mg.g⁻¹ e 833,33 mg.g⁻¹, respectivamente (Figura 28).

A diminuição no tamanho de partículas do bagaço e da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar, depois do pré-tratamento com ácido diluído, modificou a estrutura da lignina e removeu a hemicelulose, causou um aumento na adsorção dos corantes laranja e azul, o que indica uma maior acessibilidade à celulose (CHANDRA et al., 2008 e BRIENZO et al., 2017).

No bagaço e na fração externa a adsorção do corante laranja foi maior nos materiais retidos nas peneiras de abertura 24, 35 e 60 mesh (Figuras 27 e 28), conforme a modificação da lignina e remoção da hemicelulose causada pelo pré-tratamento ácido diluído. Provavelmente houve um aumento no volume de poros na fibra de celulose e o corante Direct Orange foi mais adsorvido do que o corante Direct Blue, que penetra no poro. Assim, uma maior adsorção do corante laranja, indica uma superfície maior de celulose acessível a hidrólise enzimática (CHANDRA et al., 2008 e SIQUEIRA et al., 2017).

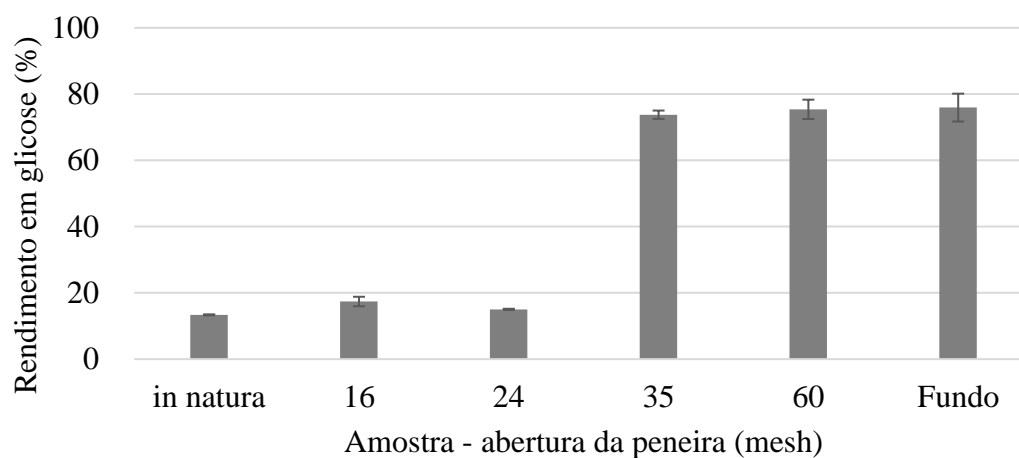
5.7. Hidrólise enzimática das biomassas de cana-de-açúcar

As amostras de bagaço e fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática para avaliar o efeito do pré-tratamento com ácido diluído nos diferentes tamanhos de partículas das biomassas.

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou rendimento em glicose para a amostra *in natura* de 13,37%. Variedades de bagaço geneticamente distintas, *in natura*, codificadas como 20, 34, 55, 57, 63 89, 102 e 114, apresentaram um rendimento em glicose de 6,6 %, 11,9 %, 6,7 %, 8,3 %, 14,6 %, 8,7 %, 12,4 % e 7,8% (BENJAMIN et al., 2013). O baixo rendimento na hidrólise enzimática é comum com material *in natura*, sendo necessário o pré-tratamento para desestruturar e diminuir a recalcitrância da biomassa. De fato, com os materiais retidos nas peneiras com abertura de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, pré-tratados, o rendimento em glicose foi de 17,40%, 15,03 %, 73,78 %, 75,41% e 75,93 %, respectivamente (Figura 29). Deste modo, o pré-tratamento apresentou efeito sob a estrutura do material, melhorando a hidrólise enzimática.

Com a diminuição do tamanho de partícula no bagaço, houve um aumento na taxa de conversão em glicose 73,78%, 75,41 % e 75,93 %, nos materiais retidos a partir das peneiras de abertura 35 e 60 mesh e fundo. Comparando o material *in natura* 13,37 %, com o material retido na peneira com abertura de 16 mesh, a taxa de conversão de glicose aumentou 1,30 %. Essa taxa de conversão aumentou comparando a amostra *in natura* com o material retido na peneira com abertura de 60 mesh, menor tamanho de partículas, 5,64 % (Figura 29). O maior o rendimento em glicose na hidrólise enzimática após o pré-tratamento ácido diluído pode ser explicado pela remoção da hemicelulose e pelo aumento da porosidade e área superficial da celulose, proporcionando uma maior acessibilidade à enzima (SRITRAKUL et al., 2017).

Figura 29: Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU.g^{-1} de substrato) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido diluído (10 %, m/m, a $121 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ min}$).



A fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar apresentou rendimento em glicose para a amostra *in natura* de 7,67%. Os materiais retidos nas peneiras com abertura de 16, 24, 35, 60 mesh e fundo, pré-tratados, apresentaram rendimento em glicose de 19,29 %, 19,78%, 33,07 %, 33,69 % e 33,56%, respectivamente (Figura 32).

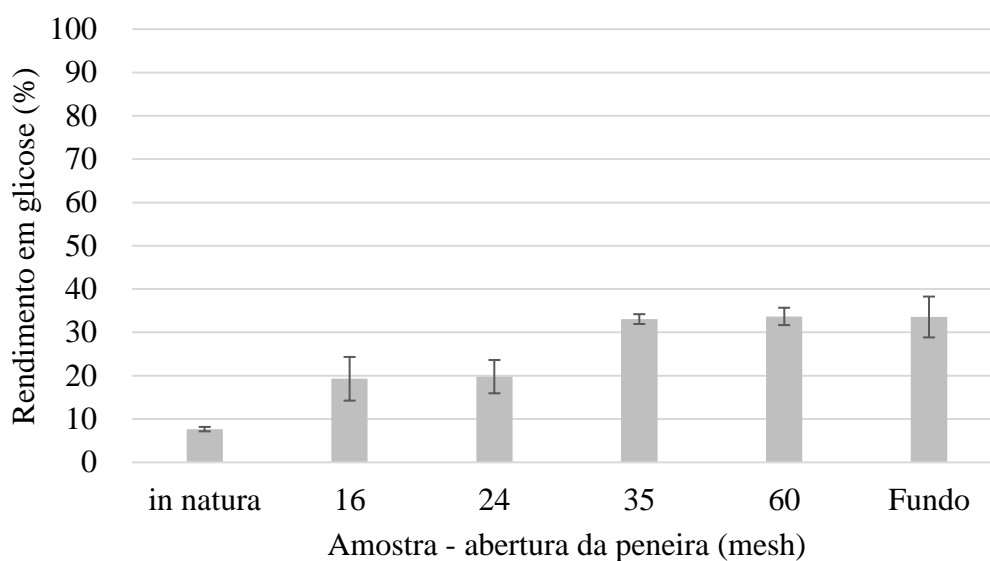
Com a diminuição do tamanho de partícula, houve um aumento no rendimento em glicose 33,07 %, 33,69 % e 33,56 %, nos materiais retidos a partir das peneiras de abertura 35 e 60 mesh e fundo. O material retido na peneira com abertura de 16 mesh apresentou uma taxa de conversão em glicose de 19,29 %, e comparando com a amostra *in natura* 7,67 %, essa taxa de conversão aumentou 2,51 %. No material retido na peneira com abertura de 60 mesh, menor tamanho de partículas a taxa de conversão aumentou 4,39 % (Figura 30).

A fração externa (contendo epiderme) pela literatura é considerada a fração mais recalcitrante da biomassa da cana-de-açúcar, devido a sua estrutura e composição química, que podem influenciar o pré-tratamento com ácido diluído (BRIENZO et al., 2014). Neste estudo, o rendimento em glicose foi menor para a fração externa comparado com o bagaço.

A amostra em estudo, a fração externa *in natura*, após 24 horas de hidrólise enzimática, resultou em rendimento em glicose inferior a 7,67 %. Comparando com a literatura, esse rendimento foi inferior a 10 % como reportado

(BRIENZO et al., 2014). A fração externa submetida ao pré-tratamento com ácido diluído a 10 % (m/m), também não resultou em rendimento em glicose superior a 20 % (BRIENZO et al., 2014). Por outro lado, as amostras em estudo com tamanhos de partículas 35 e 60 mesh e fundo, apresentaram resultados de rendimento superiores a 30% (Figura 32).

Figura 30: Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU.g⁻¹ de substrato) da fração externa (contendo epiderme) de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído (10 %, m/m, a 121 °C/30 min).



6. CONCLUSÃO

O fracionamento do bagaço e da fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar em peneiras com aberturas de 16, 24, 35, 60 mesh e o fundo, resultaram em materiais com tamanhos de partículas diferentes 1,000 mm, 0,710 mm, 0,423 mm, 0,250 mm e partículas menores que 0,250 mm, respectivamente, e que foram submetidos a um pré-tratamento ácido diluído (10 %, m/m, a 121 °C/30 min).

O pré-tratamento modificou a estrutura complexa dessas amostras. O material retido, das duas biomassas, na peneira de abertura 60 mesh, menor tamanho de partícula, sofreu uma maior modificação.

A diminuição do tamanho de partícula resultou em menor porcentagem de massa recuperada das amostras. A fração externa apresentou uma menor recuperação de massa do que o bagaço. A hidrólise ácida solubilizou mais hemicelulose do que celulose, em ambas amostras.

A área superficial total e específica da lignina é modificada pela ação do pré-tratamento ácido diluído, entretanto, não houve uma maior exposição dessa área com a diminuição do tamanho de partículas, através da adsorção do corante Azure-B.

Os corantes Direct Orange e Blue permitiram a determinação da acessibilidade à celulose, através da sua superfície exposta. O estudo com esses corantes demonstrou que ocorreu aumento da acessibilidade à celulose como um efeito do pré-tratamento ácido diluído e das condições empregadas. Uma relação diretamente proporcional foi observada entre a diminuição do tamanho de partículas com a adsorção de corantes, ou seja, com a acessibilidade à celulose.

Com a diminuição do tamanho de partícula, houve um aumento no rendimento em glicose, nos materiais retidos das amostras, a partir das peneiras de abertura 35 e 60 mesh e fundo, os menores tamanhos de partículas.

A diminuição do tamanho de partículas do bagaço e da fração externa (contendo epiderme) do colmo da cana-de-açúcar pré-tratados com ácido diluído, influenciou no aumento da acessibilidade à celulose e na taxa em conversão de glicose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, V., SADDLER J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**. 2011.
- ASSUMPÇÃO, S.M.N. de. Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração. Tese (Dissertação Mestrado) – **Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia**, Salvador, 99 f. 2015.
- AZEVEDO, G.O.de. Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial da lignina e a digestibilidade enzimática.. Tese (Dissertação de Mestrado) – **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**. Rio Claro, São Paulo. 80 f. 2018.
- BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 91–106.2014.
- BENJAMIN Y., CHENG, H., GÖRGENS. J.F. The influence of variety type on dilute acid pretreatment-hydrolysis responses of sugarcane bagasse. **Centre for Renewable and Sustainable Energy Studies**, 2013.
- BNDES e CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: **BNDES**, 316p. 2008.
- BRIENZO, M., ABUD, Y., FERREIRA, S., CORRALES, R. C., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE SOUZA, W., & SANT’ANNA, C. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Industrial Crops and Products**, 84, 305-313.2016.
- BRIENZO, M., FERREIRA, S., VICENTIM, M. P., DE SOUZA, W., & SANT’ANNA, C. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, 7(4), 1454-1465. 2014.
- BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, 104, 271-280. 2017.
- BRIENZO, M., TYHODA, L., BENJAMIN, Y., & GÖRGENS, J. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, 32(2), 253-262. 2015.
- CAI, J., HE, Y., YU, X., BANKS, S. W., YANG, Y., ZHANG, X., BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical

characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 76, 309-322. 2017.

CANDIDO, R.G., GODOY, G.G., GONÇALVES, A.R. Study of Sugarcane Bagasse Pretreatment with Sulfuric Acid as a Step of Cellulose Obtaining. **World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering**. Vol:6, No:1, 2012.

CANILHA, L., SANTOS, V. T., ROCHA, G. J., E SILVA, J. B. A., GIULIETTI, M., SILVA, S. S., CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 38(9), 1467-1475.2012.

CASCIATORI, F. P., FRASSATTO, P. A .C. Enzymes for the biochemical route of second-generation ethanol: Production by solid-state cultivation as a feasible and sustainable alternative. In: BRIENZO, N. Bioethanol and Beyond. Advances in production process in Nova Iorque: **Nova Science Publishers**, p. 285-314. 2018.

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

CHANG, V. S., HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Appl Biochem Biotechnol**. 84:5–37. 2000.

CHUNDAWAT, S. P.S., VENKATESH, B., DALE, B. E. Effect of Particle Size Based Separation of Milled Corn Stover on AFEX Pretreatment and Enzymatic Digestibility. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 96, No. 2, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perfil do setor do açúcar e do etanol no Brasil /Companhia Nacional de Abastecimento. – v. 1(2017-) – Brasília: **CONAB**, 2017. Disponível em: Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

COSTA, P. R. O., DUARTE, F. S. A utilização da biomassa da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável aplicada no setor sucroalcooleiro. **Revista de Administração da Fatea**, v. 3, n. 3, p. 2-107, 2010.

DASARI, R. K.; BERSON, R. E. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 289-299, 2007.

ELGHARBAWY, A. A., ALAMA, M. D. Z., MONIRUZZAMANB, M., GOTO, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**. 252–267.2016.

ESTEVEES, P. J. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto. Tese (Mestre em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena. **Universidade de São Paulo**. São Paulo. 2011.

FENGEL, D., & WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, 613, 1960-82.1989.

FERNANDES, E., ALVES, R. C., PAGNOCCA, F. C., CONTIERO, J., BRIENZO, M., Sugar and ethanol production process from sugarcane. In: MURPHY R. Sugarcane: production systems, uses and economic importance. Nova lorque: **Nova Science Publishers**, p. 193-216. 2017.

GUO, H., CHANG, Y., LEE, D.J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**. 198–215.2018.

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, 28:384–410, 2005.

HUANG C.F., TING-HSIANG L., GIA-LUEN G., WEN-SONG H. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**.100(17):3914-20.2009.

JOAQUIM, A.P. Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, **Universidade de São Paulo, São Carlos**. 78f. 1997.

KARIMI, K., TAHERZADEH, M. J., A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresource Technology**. 348–356. 2016.

KHULLAR, E., DIEN, B. S., RAUSCH, K. D., TUMBLESÓN, M. E., SINGH, V. Effect of particle size on enzymatic hydrolysis of pretreated Miscanthus. **Industrial Crops and Products** .11– 17.2013.

KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I. G., KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied microbiology and biotechnology**. 98(20), 8469-8480. 2014.

KONDO, T., J. POLYM. Sci.: Part B: Polym. **Physics** 1997, 35, 717.

MAURYA, D.P., SINGLA, A., NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Biotech** 5:597–609, 2015.

MELATI, R. B., SCHMATZ, A. A., PAGNOCCA, F. C., CONTIERO, J., BRIENZO, M., Sugarcane Bagasse: production, Composition, Properties, and Feedstock Potential. In: MURPHY R. Sugarcane: production systems, uses and economic importance. Nova Iorque: **Nova Science Publishers**, p. 193-216. 2017.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol** 96:673–686. 2005.

OGEDA, T. L., PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

PANAGIOTOPOULOS, I.A., BAKKER, R.R., DE VRIJE, T., KOUKIOS, E.G. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource Technology**.11204-11. 2011.

RABELO, S. C. Avaliação e Otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração – Campinas, SP, 2010.

RASTOGI, M., SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second-generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 330–340. 2017.

SAHIN, H. T., ARSLAN, M. B. A Study on Physical and Chemical Properties of Cellulose Paper Immersed in Various Solvent Mixtures. **Int. J. Mol. Sci**. 2008.

SANTOS, V. T. O., SIQUEIRA, G., MILAGRES, A. M. F., FERRAZ, A. 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. 2018.

SANT'ANNA, C., SOUZA, W., BRIENZO, M. The influence of the heterogeneity, physicochemical and structural properties on the recalcitrance and conversion of sugarcane bagasse. **Nova publishers**. 1, 1-34. 2014.

SIPPONEN, M. H., PIHLAJANIEMI, V., LITTUNEN, K., PASTINEN, O., & LAAKSO, S. Determination of surface-accessible acidic hydroxyls and surface area of lignin by cationic dye adsorption. **Bioresource technology**, 169, 80-87. 2014.

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

SIMONS, F.L. A stain for use in the microscopy of beaten fibers. **Tappi J.**; 33:312–314. 1950.

SLUITER, J. B., RUIZ, R. O., SCARLATA, C. J., SLUITER, A. D., & TEMPLETON, D. W. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(16), 9043-9053, 2010.

SRITRAKUL, N., NITISINPRASERT, S., KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources**. 512 e 519.2017.

SUN, S., SUN, S., CAO, X. AND SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource technology**, 199, 49-58. 2016.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

TELEMAN, A. Hemicelluloses and pectines. In: EK, M.: GELLERSTEDT, G., HENRIKSSON, G. *Wood Chemistry and Biotechnology*. Berlin: **Walter de Gruyter**, 2009.

YEH, A.I., HUANG, Y. C, CHEN, S. H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**.192–199. 2010.

WALLACE, J., BRIENZO, M., GARCÍA-APARICIO, M. P., GÖRGENS, J. F. Lignin enrichment and enzyme deactivation as the root cause of enzymatic hydrolysis slowdown of steam pretreated sugarcane bagasse. **New biotechnology**, 33(3), 361-371. 2016.

WHETTEN, R. W., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, 49(1), 585-609. 1998.

ZHENG, M., MOSIER, N. S., HUANG, C. P., SHERMAN, D. M., LADISCH, M. R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 97, p. 265-278, 2007.

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

ZHAO, X., ZHANG, L., & LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 6(4), 465-482, 2012.