
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**INFLUÊNCIA DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR NA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E PRODUÇÃO
DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS.**

ROSÂNGELA CRISTINA ALVES

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**INFLUÊNCIA DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR NA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E PRODUÇÃO
DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS.**

ROSÂNGELA CRISTINA ALVES

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 Alves, Rosângela Cristina
A474i Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar
na solubilização de hemicelulose e produção de açúcares
fermentáveis / Rosângela Cristina Alves. - Rio Claro, 2018
59 f. : il., figs., tabs.

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

1. Botânica econômica. 2. Biomassa lignocelulósica. 3.
Fracionamento por peneiras. 4. Tamanho de partícula. 5.
Extração ácida e alcalina. 6. Caracterização química. I. Título.

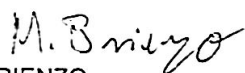
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
NA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE EM MEIO ÁCIDO E ALCALINO

AUTORA: ROSÂNGELA CRISTINA ALVES

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



Profa. Dra. LIDYANE ALINE DE FREITA

Pós-Doutoranda do Departamento de Tecnologia / FCAV Jaboticabal



Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 27 de julho de 2018

Título alterado para: "Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na
solubilização de hemicelulose e produção de açúcares fermentáveis"

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus
pais, Roberto e Diva e aos meus
irmãos Rosana, Rogério e Rosa,
pelo carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado sabedoria para cursar o mestrado. Agradeço também por Ele ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

Aos meus pais Roberto e Diva, aos meus irmãos Rosana, Rogério e Rosa e também a minhas sobrinhas, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Michel Brienzo, por toda a dedicação, atenção, apoio, confiança e paciência comigo durante todas as etapas do mestrado.

Ao Ranieri, por tudo que fez por mim durante todo o mestrado, pois sem ele não seria possível concluir as análises. Foi uma grata surpresa nossa amizade: quantas conversas no laboratório, um incentivando o outro em cada etapa. Tenho orgulho de chamá-lo de meu amigo.

À Giovanna, pela sua amizade e incentivo, outra grata surpresa. Fiz mais uma amiga durante o mestrado.

À Joira, pelas longas viagens a Rio Claro, pela companhia e conversas. Obrigada pela nossa amizade.

Ao Centro Paula Souza, pelo incentivo ao estudo, pelo afastamento parcial das minhas aulas, o que tornou possível a realização do mestrado e também à ETEC Rubens de Faria e Souza, pelas análises realizadas em seus laboratórios.

Enfim, a todos que tiveram alguma participação para a conclusão desse mestrado, muito obrigada.

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

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

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

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

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

À Dr^a. Luciana Coelho e a Ana Maria, pela ajuda com os experimentos.

EPÍGRAFE

*Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso! Não se
apavore nem desanime, pois, o
Senhor, o seu Deus, estará com
você por onde você andar".*
Joné 1:9

RESUMO

A grande capacidade da agricultura sucroalcooleira, aliada às suas dimensões continentais, faz do Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. O bagaço desta matéria-prima é um material lignocelulósico, remanescente da moagem dos seus colmos, é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, numa estrutura vegetal organizada que deve ser desestruturada mediante pré-tratamentos para disponibilizar a fração polissacarídica (celulose e hemicelulose). Objetivou-se com a presente pesquisa determinar a influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na extração/solubilização de hemicelulose na forma de polissacarídeo (macromolécula) e monossacarídeo (xilose). A extração da hemicelulose macromolecular foi realizada em condições otimizadas para bagaço de cana-de-açúcar, 6 % H_2O_2 m/v a 25 °C durante 4 h, utilizando bagaço selecionado em peneiras de 16, 30, 40, 50 mesh e base (material que passou pela peneira de 50 mesh). Para extração de hemicelulose na forma monomérica foi utilizado um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 20 % (m/m), sendo que as amostras foram autoclavadas a 121 °C por 1 h; a xilose no filtrado foi quantificado por HPLC. Foi realizada também a condutividade, determinação do teor de cinzas totais, solubilidade da hemicelulose. Os resíduos sólidos dos pré-tratamentos foram submetidos a hidrólise enzimática (12 FPU/g – Cellic Ctec) para determinação do rendimento em glicose. O bagaço *in natura* apresentou conteúdo de glucana de 42,25 %, arabinana de 2,62 %, xilana de 25,39 %, ácido acético de 3,38 % e lignina de 13,83 %. A xilana solubilizada em meio alcalino apresentou variação de 36,18 % (bagaço retido na peneira de 16 mesh) a 71,43 % (bagaço retido na base, inferior a 50 mesh), quanto menor o tamanho da partícula, maior a quantidade de xilana solubilizada. Houve uma tendência nos valores obtidos de glucana, conforme diminuiu o tamanho de partícula, aumentou o teor desse polissacarídeo no bagaço pré-tratado em meio ácido. Os valores variaram de 44,28 % (bagaço retido em peneira de 16 mesh) a 66,70 % (bagaço retido na peneira de 50 mesh). Para os materiais pré-tratados em meio alcalino retidos em peneiras de 40, 50 mesh e base ficaram acima do valor encontrado para o bagaço *in natura*. Considerando como uma característica importante da hemicelulose, todas as amostras apresentaram solubilidade acima de 96 %. A hidrólise enzimática do material pré-tratado em meio alcalino resultou em maior rendimento em glicose (65,37 % de glicose) para todas as frações/granulometrias estudadas, em comparação com meio ácido (32,12 % de glicose), mostrando tendência em aumento com diminuição da granulometria. Os resultados evidenciaram que a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar tem influência na extração/solubilização de hemicelulose na forma de polissacarídeo (polimérica) e monossacarídeo (xilose). Conclui-se que, um melhor aproveitamento em conjunto da hemicelulose e celulose ocorreu com as condições experimentais de estudo do pré-tratamento alcalino.

Palavras chave: biomassa lignocelulósica, fracionamento por peneiras, tamanho de partícula, extração ácida e alcalina, caracterização química.

ABSTRACT

The great capacity of sugar-alcohol agriculture, combined with its continental dimensions, makes Brazil the largest producer of sugar cane in the world. The bagasse of this raw material is a lignocellulosic material, reminiscent of the milling of its stems, is composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin, in an organized vegetable structure that must be destructured by means of pre-treatments to provide the polysaccharide fraction (cellulose and hemicellulose). The objective of this research was to determine the influence of sugarcane bagasse granulometry on the extraction/solubilization of hemicellulose in the form of polysaccharide (macromolecule) and monosaccharide (xylose). Macromolecular hemicellulose extraction was performed under optimized conditions for sugarcane bagasse, 6 % H₂O₂ m / v at 25 °C for 4 h, using bagasse selected in 16, 30, 40, 50 mesh sieves and base (material which passed through the 50 mesh screen). For the extraction of hemicellulose in the monomeric form, a pretreatment with sulfuric acid diluted 20 % (m/m) was used, and the samples were autoclaved at 121 °C for 1 h; the xylose in the filtrate was quantified by HPLC. Conductivity, determination of total ash content and solubility of hemicellulose were also performed. The solid residues of the pre-treatments were submitted to enzymatic hydrolysis (12 FPU/g - Cellic Ctec) to determine the glucose yield. The bagasse in natura had glucan content of 42.25 %, arabinana of 2.62 %, xylan of 25.39 %, acetic acid of 3.38 % and lignin of 13.83 %. The solubilized xylan in alkaline medium showed a variation of 36.18 % (bagasse retained in the 16 mesh sieve) at 71.43 % (bagasse retained at the base, less than 50 mesh), the smaller the particle size, the greater the amount of solubilized xylan. There was a tendency in the values obtained of glucana, as the particle size decreased, the content of this polysaccharide increased in the acid treated bagasse. The values varied from 44.28 % (bagasse retained in 16 mesh sieve) to 66.70 % (bagasse retained in the 50 mesh sieve). For materials pretreated in alkaline medium retained in 40, 50 mesh and base sieves were above the value found for the *in natura* bagasse. Considering as an important characteristic of hemicellulose, all samples had solubility above 96 %. The enzymatic hydrolysis of the pretreated material in alkaline medium resulted in a higher glucose yield (65.37 % of glucose) for all fractions/granulometry studied, compared to acid medium (32.12 % glucose), showing a trend in increase with decreasing granulometry. The results showed that the sugarcane bagasse granulometry influences the extraction/solubilization of hemicellulose in the form of polysaccharide (polymeric) and monosaccharide (xylose). It was concluded that a better use of hemicellulose and cellulose occurred with experimental conditions of the alkaline pretreatment.

Keywords: lignocellulosic biomass, comminution, particle size, acid and alkaline extraction, chemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bagaço de cana-de-açúcar proveniente de usina de etanol/açúcar mostrando fragmentos de fração externa/epiderme	12
Figura 2. Esquema da parede celular vegetal.	13
Figura 3. Principais componentes de materiais lignocelulósicos.	14
Figura 4. Divisão em frações da cana-de-açúcar. A: planta inteira. B: Stalk corresponde ao caule e Straw corresponde a folha. C: Internode corresponde ao entrenó, node corresponde ao nó, epidermis-free stalk corresponde a porção do caule livre de epiderme e epidermis fraction corresponde a fração externa (contendo epiderme).....	16
Figura 5. Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	17
Figura 6. Ligações inter e intramolecular dentro das cadeias de celulose	19
Figura 7. Carboidratos que compõem as unidades de hemicelulose	21
Figura 8. Representação esquemática de uma hemicelulose	21
Figura 9. Diversas aplicações de xilanas em diferentes campos.	24
Figura 10. Precursores primários das ligninas: álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III).	25
Figura 11. Ação das enzimas no polissacarídeo de celulose para liberação de açúcares fermentescíveis.	31
Figura 12. Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a solubilização da hemicelulose.	32
Figura 13. Diferentes tamanhos de partículas do bagaço de cana-de-açúcar após agitação de 1h em intensidade média.	33
Figura 14. Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) das frações de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com ácido diluído (20 %, m/m, a 121 °C/30 min).....	47
Figura 15. Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) das frações de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com peróxido de hidrogênio 6 % H ₂ O ₂ m/v, 25 °C/4 h).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de resíduos agrícolas.....	15
Tabela 2. Composição do bagaço de cana-de-açúcar – valores médios do conteúdo de fibra e medula.....	15
Tabela 3. Diferenças entre celulose e hemicelulose	22
Tabela 4. Abertura das peneiras utilizadas para obtenção de bagaço de cana-de-açúcar com diferente granulometria.....	33
Tabela 5. Açúcares e grupos acetil liberados na fração líquida do pré-tratamento ácido diluído (20 % m/m, a 121 °C/1 h) do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias.	38
Tabela 6. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias pré-tratado com ácido diluído (20 % m/m, a 121 °C/1 h).	40
Tabela 7. Rendimento em xilana do pré-tratamento alcalino (peróxido de hidrogênio 6 % H ₂ O ₂ m/v, 25 °C/4 h) do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias, sua condutividade, solubilidade, cinzas e lignina total.....	42
Tabela 8. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio alcalino (peróxido de hidrogênio 6 % H ₂ O ₂ m/v, 25 °C/4 h) com diversas granulometrias quanto ao conteúdo de glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos específicos	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Cana-de-açúcar	11
3.2 Características da biomassa lignocelulósica	12
3.3 Composição da biomassa	17
3.3.1 Celulose	17
3.3.2 Hemiceluloses	19
3.3.3 Lignina	24
3.4 Tamanho de partícula – granulometria da biomassa	26
3.5 Extração de hemicelulose com peróxido de hidrogênio	27
3.6 Extração de hemicelulose com ácido diluído	29
3.7 Hidrólise enzimática da celulose	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Obtenção e preparo do material	32
4.2 Extração de hemicelulose (polimérica)	33
4.3 Rendimento de extração	34
4.4 Caracterização química da hemicelulose	34
4.5 Extração de hemicelulose (monomérica)	34
4.6 Caracterização química do resíduo rico em celulose	35
4.7 Condutividade	35
4.8 Determinação do teor de cinzas totais	35
4.9 Solubilidade da hemicelulose	36
4.10 Determinação da Atividade enzimática celulase total	36
4.11 Hidrólise enzimática	37
4.12 Determinação da concentração de açúcares	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Extração de hemicelulose em meio ácido	38
5.2 Resíduo sólido pré-tratamento ácido	40
5.3 Extração de hemicelulose em meio alcalino	42
5.4 Resíduo sólido pré-tratamento alcalino	44
5.5 Hidrólise enzimática	46
6. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Dentre os materiais lignocelulósicos, um dos que mais se destaca no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. Tanto a produção de açúcar como de etanol utiliza o mesmo material de alimentação: cana-de-açúcar. A sacarose é extraída quando o caldo é produzido, usando moendas ou difusores. Este processo gera o bagaço, um produto que atualmente é usado em caldeiras para co-geração de vapor e energia elétrica. No entanto, várias aplicações industriais têm sido estudadas para o uso de bagaço, como o etanol de segunda geração (FERNANDES et al., 2017). Embora parte destes resíduos seja utilizada para produção de energia, muitas pesquisas buscam novas aplicações para o melhor aproveitamento destes materiais (BRIENZO, 2010). Entretanto, o bagaço de cana-de-açúcar é um material recalcitrante e heterogêneo, dificultando os processos de conversão em etanol e extração das suas macromoléculas.

O colmo da cana-de-açúcar é heterogêneo por apresentar entrenó e nó, e ainda, o entrenó pode ser dividido em diferentes segmentos, do centro para a periferia: medula, região intermediária e periferia. As frações provenientes da subdivisão do entrenó apresentam recalcitrância diferente. Uma diferença significativa entre estas regiões (centro/medula, região intermediária e periferia) é a presença de feixes vasculares, que são estruturas recalcitrantes por apresentar células altamente lignificadas e com paredes celulares espessas. Em um estudo recente foi observado e quantificado que o maior número de feixes vasculares aparece no nó, quando comparado com o entrenó, sendo a periferia de ambas as frações ricas em feixes vasculares (BRIENZO et al., 2016).

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente de uma usina de etanol e açúcar é composto por fragmentos com diferentes tamanhos. Os fragmentos menores aparecem em pequena proporção, enquanto os fragmentos maiores aparecem em maior proporção e são visualmente menos danificados pelo processo de extração da sacarose (SANT'ANNA et al., 2014). Deste modo, sugerem-se que as partículas menores sejam provenientes principalmente da medula, região central do colmo, a qual apresenta composição majoritária em células de parênquima e apresentam baixa recalcitrância (COSTA et al., 2013). Assim, em função das características morfológicas e estruturais supõem-se que as frações menos recalcitrantes do bagaço de cana-de-açúcar podem ser obtidas com uma etapa de peneiramento. Uma vez separadas as frações de menor recalcitrância, é provável que processo de extração de hemicelulose ocorra com maior eficácia. Neste contexto, o presente trabalho tem o propósito de determinar a influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na extração de hemicelulose (macromolécula/polimérica e monomérica).

A xilana são frequentemente encontradas como principais constituintes das hemiceluloses. A xilana é uma pentosana que quando hidrolisada dá origem a uma pentose, a xilose. A xilose pode ser diretamente convertida em xilitol por vias biotecnológicas utilizando leveduras. Na forma de oligômeros, os xilo-oligossacarídeos (XOS), cadeias curtas de xilose, formadas por 2 a 12 unidades, cujas características vem conquistando espaço crescente na indústria farmacêutica, química fina e como ingrediente alimentar. Os XOS são reconhecidos por muitos estudos como prebióticos, nutrientes com um potencial de ação sobre a fisiologia humana, visto que não servem de substrato para as enzimas do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, sendo seletivamente fermentados por alguns tipos de bactérias intestinais, principalmente bifidobactérias e lactobacilos (MANRICH, 2010).

2. OBJETIVOS

Determinar a influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na extração/solubilização de hemicelulose na forma de macromolécula (xilana) e monossacarídeo (xilose).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tamanho de partícula na extração de hemicelulose na forma macromolecular e monomérica (xilose);
- Determinar o efeito do tamanho de partícula na hidrólise enzimática da fração sólida da extração de hemicelulose.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A grande capacidade do Brasil para a agricultura sucroalcooleira, aliada às suas dimensões continentais, o faz o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e o único país do mundo que integra plenamente a produção de açúcar e álcool na mesma planta, reduzindo custos de ambos os processos. De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (2017) o total de cana-de-açúcar moída na safra 2017/2018 foi de 646,4 milhões de toneladas, produzindo 26,12 bilhões de litros de etanol, sendo que o bagaço de cana seco, o rendimento varia entre 158 L/tonelada e 335 L/tonelada. (CARPIO; SOUZA, 2017).

O bagaço é um produto, remanescente da moagem dos colmos da cana-de-açúcar. É obtido na saída do último moinho das usinas e destilarias, e constitui um conjunto de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm, apresentando um tamanho médio de 20 mm, o qual depende fundamentalmente do número de moagens realizadas e do tamanho dos equipamentos. A morfologia do bagaço está relacionada com a estrutura da cana-de-açúcar, onde se encontram fibras exteriores do colmo ou da casca, feixes fibrovasculares e outras formas fibrosas que dão resistência ao colmo da planta (MACHADO, 2009). Podendo apresentar variações em sua composição e na sua estrutura morfológica, em função dos procedimentos de corte no campo e no processamento industrial.

Essa biomassa abastece as caldeiras das usinas na geração direta de energia por combustão ou gaseificação. Atualmente tem-se investido em tecnologias para o aproveitamento total da cana-de-açúcar, para também utilizar o bagaço na produção de etanol de segunda geração. A utilização do bagaço excedente poderia suprir o abastecimento da usina sucroalcooleira, proporcionando vantagens socioambientais e elevação do rendimento econômico do processo (GÁMES, et al., 2006). Em geral, o processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera cerca de 280 kg de bagaço.

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente de uma usina é composto por fragmentos com diferentes tamanhos. Os fragmentos menores aparecem em pequena proporção, enquanto os fragmentos maiores aparecem em maior proporção e são visualmente menos danificados pelo processo de extração da sacarose. A figura 1 mostra o bagaço proveniente de usina, destacando que os fragmentos maiores estão sempre associados a fração externa/epiderme, e os menores provavelmente são originados do entrenó.

Figura 1. Bagaço de cana-de-açúcar proveniente de usina de etanol/açúcar mostrando fragmentos de fração externa/epiderme



Fonte: Sant'Anna et al. (2014).

3.2 Características da biomassa lignocelulósica

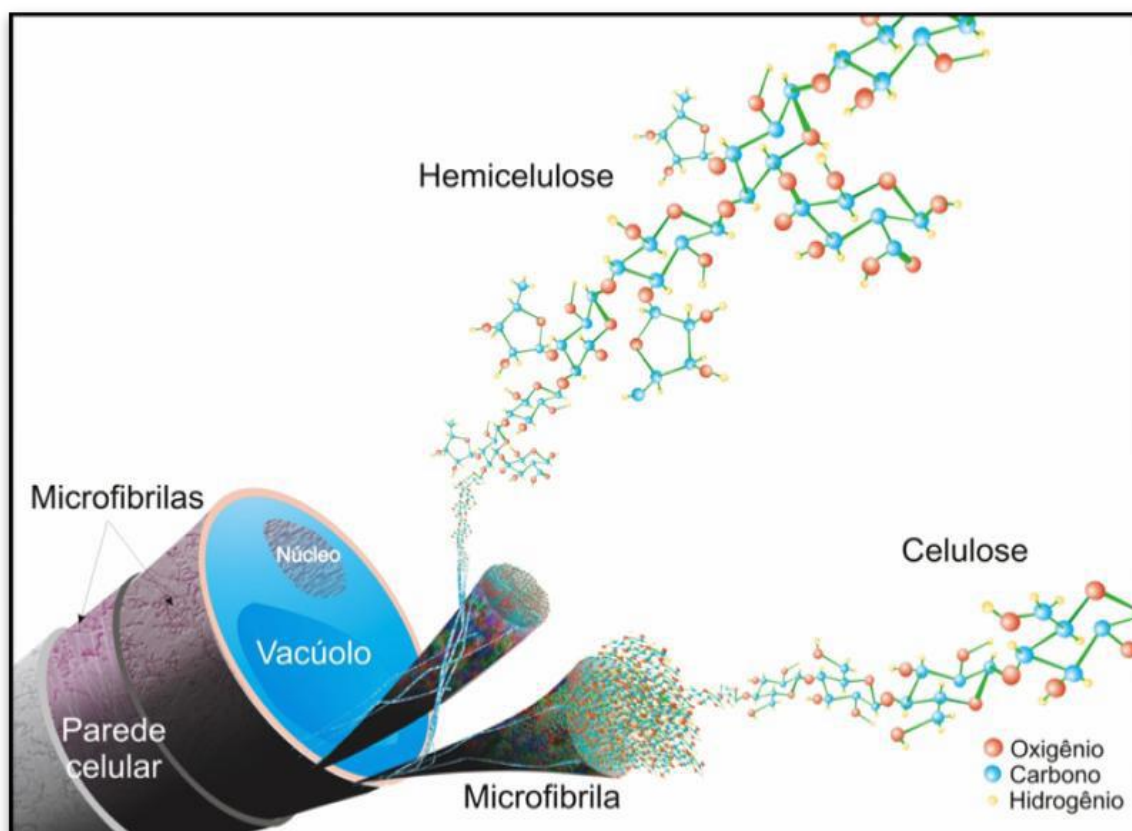
A biomassa lignocelulósica oferece as vantagens de ser abundante e barata no contexto da produção de etanol e açúcar (CARDONA et al., 2010). Entretanto, existem alguns problemas que precisam ser resolvidos para sua exploração em potencial. Este material é composto por hemicelulose, lignina e principalmente celulose (MENG et al., 2014). Estes componentes representam cerca de 90 % da massa seca do bagaço, os 10 % restantes consiste em extrativos e cinzas (BALAT, 2011). Porém, estas macromoléculas estão altamente organizadas na parede celular vegetal, o que confere alta recalcitrância a essa biomassa (SANT'ANNA et al., 2014).

A estrutura e a composição dos materiais lignocelulósicos variam grandemente, dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento do vegetal (MAZIERO et al., 2013). O bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto gerado a partir do processo de extração do caldo, seja para produção de açúcar ou de etanol, apresenta cerca de 50 % de umidade, e o teor de fibras lignocelulósicas de 45 %, podendo conter de 2 a 3 % de sólidos solúveis em água. A constituição química por grama de massa seca é composta por cerca de 45 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 20 % de lignina (MELATI et al., 2017). Na fração hemicelulósica, a xilose

aparece com até 80 % dos monossacarídeos presentes.

Todas as células vegetais possuem uma parede celular, que determina seu tamanho e forma, conferindo resistência mecânica, proteção ao ataque de predadores, promovendo adesão entre essas células e estabelecendo suas propriedades físico-químicas. A parede celular é composta por polissacarídeos (90 % da massa seca da parede), proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Esses polissacarídeos consistem em celulose (20 a 40 %), hemiceluloses (15 a 25 %) e pectinas (30 % aproximadamente). Essa matriz, ordenada e dinâmica, varia de acordo com a necessidade do vegetal, (Figura 2). (BUCKERIDGE, 2010). A figura mostra a estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose depositadas umas sobre as outras. Uma das moléculas de celulose se apresenta aumentada e prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo beta-1,4. Uma das moléculas de hemicelulose (glucuroarabinoxilana) também é mostrada em detalhe na parte de cima da figura.

Figura 2. Esquema da parede celular vegetal.



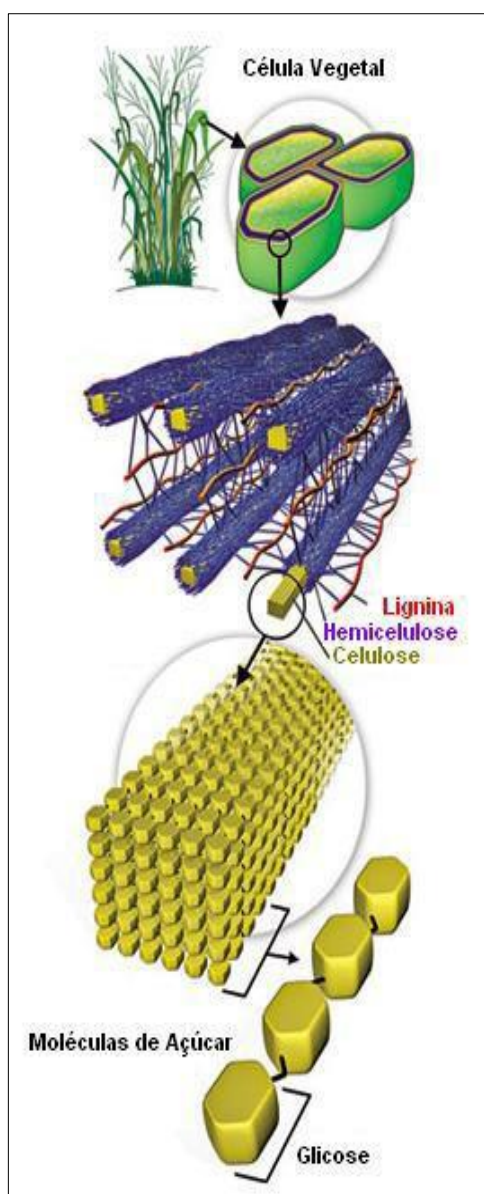
Fonte: Buckeridge (2010).

Os resíduos vegetais, quando analisados mais detalhadamente, mostram que a parede celular é formada por uma trama de fibras de celulose, agregadas em feixes em maior ou menor

grau de ordenação, permeados de outros materiais como as hemiceluloses e lignina, além de outros constituintes (ésteres, alcoóis, esteróides e minerais), conforme o tipo de material (Figura 2) (BUCKERIDGE, 2010).

A lignina, macromolécula composta por álcoois aromáticos, permeia as estruturas resistente e fibrosa da celulose e hemicelulose (BALAT et al., 2008). Na figura 3 observa-se uma representação dos componentes do material lignocelulósico, mostrando a organização das cadeias de celulose em fibras, e o arranjo com hemicelulose e lignina.

Figura 3. Principais componentes de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Ritter (2008).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente pelos compostos estruturais

ou celulares. Além da celulose, lignina e hemicelulose, outros constituintes menores também se mostram presentes. Estes incluem compostos orgânicos também chamados de extrativos (ésteres, álcoois, esteróides e outros) e inorgânicos (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, principalmente). As proporções entre os constituintes dependem do tipo de material (LEWIN & GOLDESTINE, 1991). A tabela 1 mostra a composição química de alguns dos principais resíduos agrícolas disponíveis.

Tabela 1. Composição química de resíduos agrícolas.

Resíduos	Composição (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Proteínas	Cinzas
Palha de arroz	32-47	19-27	5-24	-	12,4
Palha de milho	42,6	21,6	8,2	5,1	4,3
Palha de trigo	35-47	20-30	8-15	3,1	10,1
Bagaço de cana-de-açúcar	33-36	28-30	18,4	3	2,4

Fonte: Sarkar et al. (2012). (-) não determinado.

Já a tabela 2 apresenta a composição média do bagaço de cana-de-açúcar. A holocelulose indica a fração total de carboidratos do material da planta que fica depois da remoção da lignina.

Tabela 2. Composição do bagaço de cana-de-açúcar – valores médios do conteúdo de fibra e medula.

Tipo	Holocelulose	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Total	70,5	36,0	26,0	20,0	2,2
Fibra	71,5	41,0	27,5	20,5	1,2
Medula	71,0	33,5	29,0	21,0	3,2

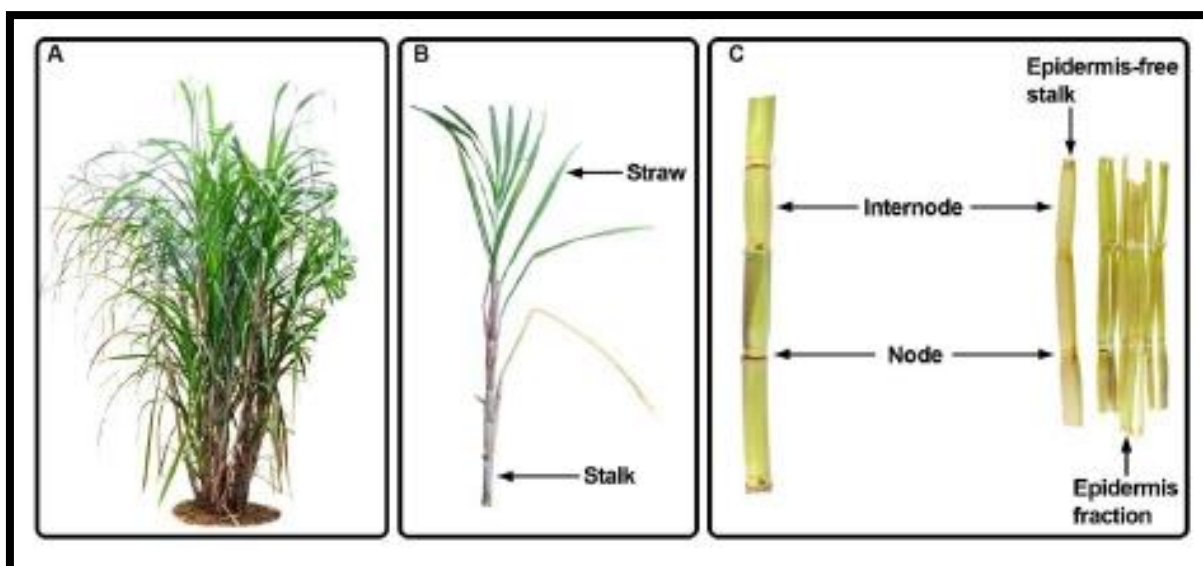
Fonte: Rabelo (2010).

O problema do uso desses materiais para a geração de produtos de alto valor agregado é que estes possuem em suas características carboidratos protegidos contra a degradação por microrganismos ou enzimas. Esta resistência do material lignocelulósico ao ataque de microrganismos ou ao pré-tratamento é chamada de recalcitrância (SANT'ANNA et al., 2014; ZHAO et al., 2012). Ou seja, mesmo o material lignocelulósico submetido a etapa de pré-tratamento comparado com o amido, requer 100 vezes mais enzimas para completar a

sacarificação (VINZANT et al., 2005).

Outro fator que dificulta a conversão por rotas biotecnológicas do material lignocelulósico é a sua heterogeneidade. Dispondo do colmo de cana, podemos dividi-lo em diversas frações baseando-se na sua morfologia: fração externa (contendo epiderme), nó e entrenó (BRIENZO et al., 2016, 2014; SIQUEIRA et al., 2011), conforme figura 4. Dentre essas frações, a fração externa se mostrou a mais resistente ao pré-tratamento ácido, o qual é um dos mais promissores para o uso em escala industrial (CANILHA et al., 2011). Esta característica está relacionada a composição desta fração, uma camada de células rígida e densa na sua extremidade (BRODEUR et al., 2011), além de grande quantidade de feixes vasculares próxima a epiderme (BRIENZO et al., 2016). O entrenó e o nó, frações menos recalcitrantes, são majoritariamente formadas por células de parênquima de armazenamento (BRIENZO et al., 2016) e em menor proporção os feixes vasculares. Sendo que o nó apresenta feixes vasculares em maior número e diâmetro do que o entrenó (BRIENZO et al., 2016). Deste modo, o peneiramento do bagaço pode separar as frações menos recalcitrantes, as quais são mais fragmentadas e aparecem em menor tamanho, como mostrado na figura 1.

Figura 4. Divisão em frações da cana-de-açúcar. A: planta inteira. B: Stalk corresponde ao caule e Straw corresponde a folha. C: Internode corresponde ao entrenó, node corresponde ao nó, epidermis-free stalk corresponde a porção do caule livre de epiderme e epidermis fraction corresponde a fração externa (contendo epiderme).



Fonte: Sant'Anna et al. (2014).

3.3 Composição da biomassa

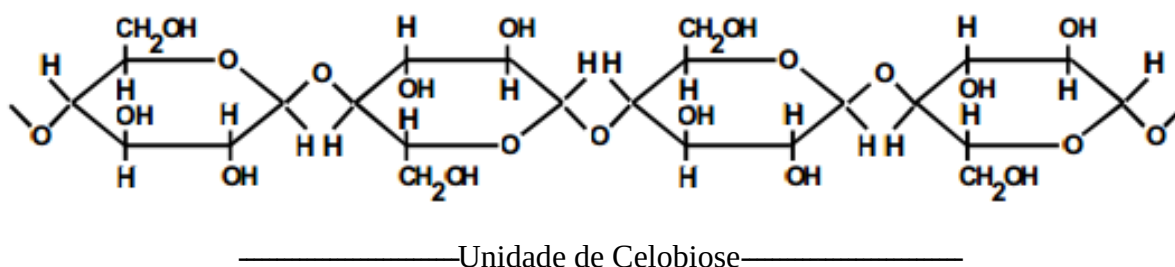
3.3.1 Celulose

A celulose, hemicelulose, e a lignina constituem uma grande proporção na composição dos materiais lignocelulósicos, sendo que a celulose e a hemicelulose são estruturas duras e fibrosas, entremeadas por uma macromolécula constituída por álcoois aromáticos, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio. A celulose é considerada a matéria orgânica mais abundante da Terra, representando cerca de 50 % de toda biomassa do planeta (YUAN, 2016).

Consequentemente se encontra ordenada em vários agregados com regiões cristalinas e amorfas chamadas de microfibrilas (LAGAERT et al., 2009). As microfibrilas constituem a unidade fundamental da parede celular das plantas e estão orientadas em diferentes ângulos com espessuras distintas. Com cerca de 10 a 25 nanômetros de diâmetro, as microfibrilas se reúnem em feixes maiores, formando as fibrilas cujas principais funções são conferir sustentabilidade, rigidez e flexibilidade a planta (ALBERSHEIM et al., 2011).

A celulose corresponde a aproximadamente 40 % de toda a reserva de carbono disponível no vegetal (RABELO, 2007). Sendo um polissacarídeo linear (parte amorfo e parte cristalino) formado por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, proporcionando assim um crescimento linear da cadeia macromolecular (Figura 5).

Figura 5. Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular



Fonte: Fengel e Wegener (1989).

As estruturas da celulose podem ser definidas em termos de três níveis organizacionais (ATALLA et al., 1993). O primeiro é definido pela sequência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidro-glicose unidas por ligações β -D (1, 4). O

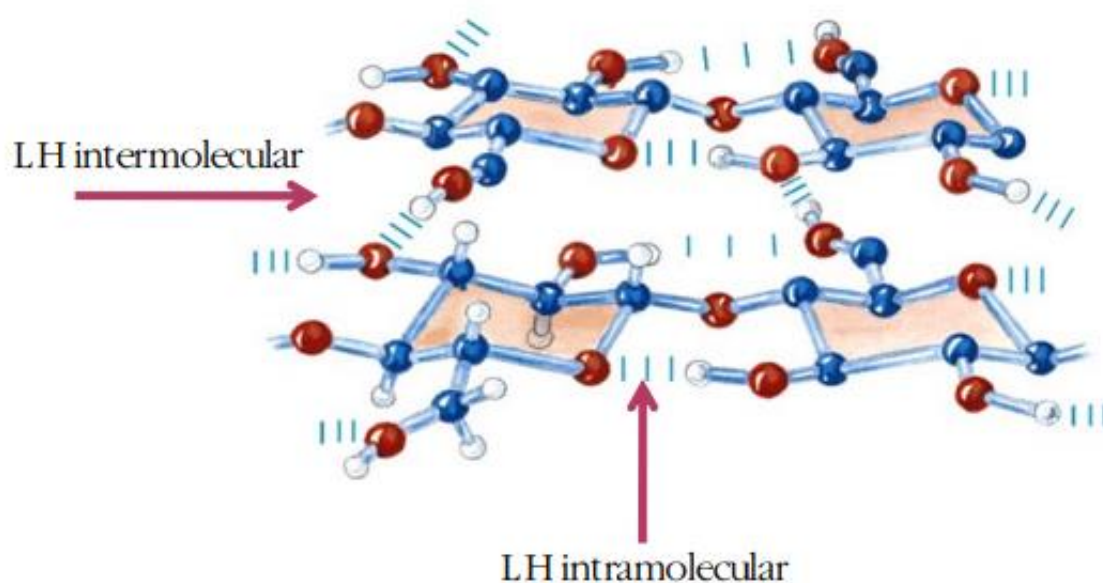
segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina.

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidro-glicose (AnGlc) que forma a cadeia polissacarídica. Este valor varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu tempo de maturação (FENGEL e WENEGER, 1989). Em plantas superiores, o GP da celulose nativa varia de 10000 a 15000 unidades de AnGlc. No entanto, todos os processos que envolvem o seu isolamento para fins industriais geram uma diminuição de uma a duas ordens de grandeza nestes valores de GP. Por exemplo, nos processos de polpação alcalina (processo Kraft), o GP da celulose decresce para 1000 a 1300 unidades de AnGlc, enquanto que, nos processos de hidrólise ácida para obtenção de celulose microcristalina, a queda de GP atinge valores da ordem de 250 a 300 unidades de AnGlc (FAN et al., 1987; FENGEL e WENEGER, 1989).

Muitas cadeias de celulose se organizam para formar uma rede cristalina, a qual é estabilizada tanto por ligações de hidrogênio intramoleculares quanto intermoleculares. Ligações de hidrogênio intramoleculares são formadas entre o oxigênio do anel de um resíduo e o hidrogênio do C3 de outro resíduo vizinho. Ligações de hidrogênio intermoleculares ocorrem entre o grupo hidroxila e átomos de oxigênio em cadeias adjacentes. Várias dezenas dessas cadeias posicionadas umas contra as outras são mantidas juntas para formar o que é conhecido como microfibrila de celulose. Muitos dos grupos hidroxilas em uma cadeia de celulose são usados nessas ligações, resultando em uma macromolécula linear de considerável resistência.

As microfibrilas organizam em fibrilas e estas formam as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (FAN et al., 1982, TAIZ E ZEIGER, 2009). Fibras de celulose têm tanto regiões amorfas quanto regiões cristalinas. Nas regiões cristalinas as cadeias individuais são precisamente arranjadas e nas regiões amorfas não (BOWES e MAUSETH, 2008). As ligações inter e intramoleculares da celulose podem ser visualizadas na figura 6.

Figura 6. Ligações inter e intramolecular dentro das cadeias de celulose



Fonte: Lehninger (2011)

O carbono anomérico aloja a hidroxila, que pode estar na posição α ou β . É esta posição que determina a diferença entre celulose e amilose. Quando a hidroxila está na posição α forma a amilose (α -D (1-4) glucopiranoose), e quando a posição é β , o composto formado é a celulose (β -D (1,4) glucopiranoose) (OKAMURA, 1990, FAN et al., 1982). Essas diferenças estruturais são a razão porque a amilose e celulose têm diferentes propriedades físicas e biológicas. Amilose é pouco solúvel em água, e forma suspensões, nas quais sua forma helicoidal é preservada. Fibras de celulose são insolúveis em água (WINGER et al., 2009).

3.3.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses compõem entre 28 a 30 % da biomassa lignocelulósica. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses não são cristalinas, possuem cadeias mais curtas e são ramificadas. A quantidade e os tipos de ramificação (grupos funcionais) variam dependendo da fonte da matéria-prima. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos constituídos por monossacarídeos, como pentose (D-arabinose e D-xilose), hexoses (D-galactose, D-manose e D-glicose), açúcares acetilados e ácidos urônicos (Figura 7). Os vários tipos podem variar amplamente em diferentes plantas e às vezes são usados para classificar a ordem da planta (NAIDU, 2017).

As hemiceluloses são amorfas e consequentemente, menos resistentes ao ataque de agentes químicos, sendo esta solúvel em álcalis (BALAT, 2011). A xilana é um dos

polissacarídeos mais encontrados na natureza, ou seja, é o principal constituinte da hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005). Independente da região do vegetal em que a hemicelulose esteja localizada, existem as interações entre os componentes estruturais, principalmente com as fibrilas elementares de celulose, outros polissacarídeos não celulósicos e, na maioria dos casos, com a macromolécula de lignina. As ligações não-covalentes entre as cadeias de xilana e outros polissacarídeos envolvem basicamente as pontes de hidrogênio; porém, ligações covalentes também são responsáveis por conectar hemicelulose e lignina e alguns ácidos fenólicos (JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992).

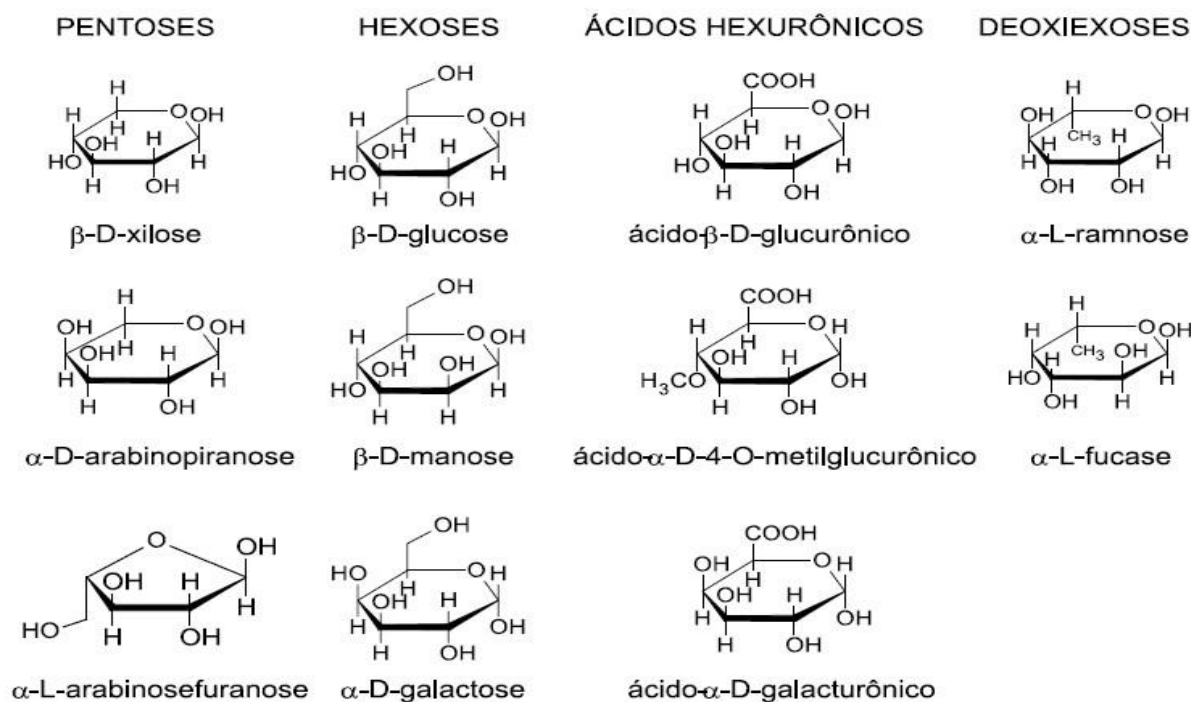
Os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos ferúlico e p-cumárico, existem particularmente em gramíneas e são conhecidos pela capacidade de realizarem ligações cruzadas entre os polímeros de lignina e hemicelulose (YANG et al., 2009). O ácido ferúlico é encontrado facilmente na natureza, em plantas é visto, tanto na forma monomérica quanto dimérica, principalmente esterificado à hidroxila do C-5 de resíduos arabinosil em arabinoxilanas (SINGH; MISHRA, 1995). Encontram-se também ligados à lignina através de ligação éter.

As microfibrilas de celulose são embebidas em uma matriz de polissacarídeos não celulósica, composta principalmente de hemicelulose e substâncias pécticas. Esses polissacarídeos unem as microfibrilas, mantendo-as organizadas paralelamente (CASTRO, 2005).

Hemicelulose é uma complexa mistura heterogênea de açúcares altamente ramificados. As xilana, arabinoxilana, galactomanana, glucomanana e xiloglucanana são as classes mais frequentes de hemicelulose. Todas as hemiceluloses possuem uma espécie de eixo formado por uma cadeia plana de açúcares unidos quase sempre por ligações-1,4 podendo sair ramificações curtas. Possuem também algumas características estruturais que as impedem de formar agregados fibrilares, como ocorre nas cadeias de celulose (CASTRO, 2005).

A hemicelulose exhibe maior susceptibilidade à hidrólise ácida, uma vez que oferecem maior acessibilidade aos ácidos comumente usados como catalisadores. Isso acontece devido ao caráter relativamente amorfo desses polissacarídeos, que geralmente apresentam grau de polimerização bem menor que o da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

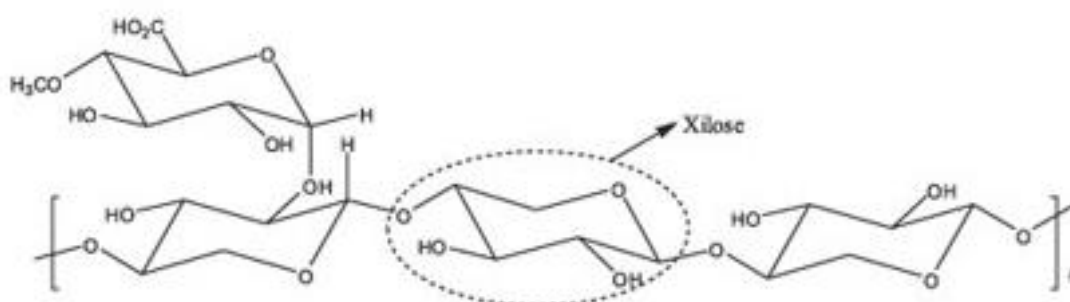
Figura 7. Carboidratos que compõem as unidades de hemicelulose



Fonte: Rodrigues e Camargo (2008).

Quando se trata do bagaço da cana-de-açúcar, a hidrólise da fração hemicelulósica gera como produto uma mistura de açúcares, com predominância de xilose (Figura 8). Tradicionalmente, este açúcar tem sido usado na produção de furfural, que é um solvente seletivo, muito reativo, utilizado em larga escala na purificação de óleos minerais, de vegetais e animais, como também na concentração de vitamina A de óleo de fígado de peixe (CGEE, 2010).

Figura 8. Representação esquemática de uma hemicelulose



Fonte: Santos et al. (2012)

Geralmente as hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal, como por exemplo xilanas, mananas e glucanas (WYMAN et al., 2005). Diferentes subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, dependendo da espécie vegetal, do estágio de desenvolvimento, do tipo de tecido.

Algumas hemiceluloses têm função de estabilizar a parede celular através de pontes de hidrogênio com a celulose e de ligações covalentes com a lignina. Outras podem ser utilizadas como energia extracelular, como sistema de armazenagem de produtos brutos e como mecanismo de retenção de água em sementes (WYMAN et al., 2005).

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

A Tabela 3 apresenta algumas diferenças entre a celulose e hemicelulose.

Tabela 3. Diferenças entre celulose e hemicelulose

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose ligadas entre si	Unidades variadas de açúcares
Grau de polimerização elevado	Grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalinas	Forma somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

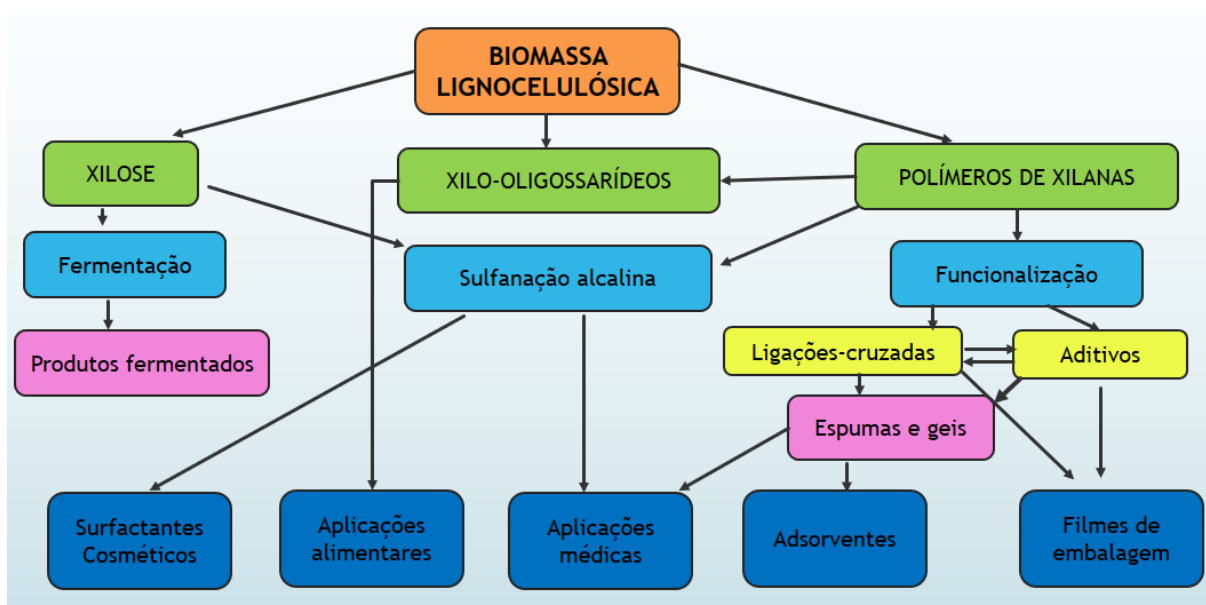
Fonte: Bianchi (1995).

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose, devido, principalmente, a estrutura física. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas dificultam a sua separação. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (BIANCHI, 1995).

Bian et al. (2012) estudando o isolamento da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar em diferentes temperaturas. Extraiu sete frações hemicelulósicas com 10 % KOH por 10 h a

20, 25, 30, 35, 40, 45, e 50 °C. A composição química e as características estruturais de todas as frações foram investigadas por uma combinação de HPAEC, GPC, FT-IR, 1D (H, C) e espectros 2D nas massas moleculares (HSQC) e TGA-DTA. Diferenças notáveis foram observadas nas massas moleculares, onde frações extraídas a 20 °C, 25 °C e 30 °C mostraram-se relativamente menores (68, 400-76, 900 g.mol⁻¹) e a extração em temperaturas elevadas de 35 a 50 °C resultou em maior massa (80, 400-93, 300 g.mol⁻¹). Todavia, as diferenças no rendimento, na composição química, nas características estruturais e na estabilidade térmica foram menos evidenciadas neste estudo. Os resultados também sugeriram que todos os polissacarídeos hemicelulósicos tinham uma cadeia de (1→4)-β-D-xilose e principalmente substituídas por (1→2) e (1→3) ligados a resíduos arabinofuranosil, e também com o ácido 4-O-metil-D-glucorônico ligado ao oxigênio. Como conclusão foi observado que não haviam significativas diferenças nos rendimentos das sete frações hemicelulósicas isoladas a temperaturas de 20-50 °C (41,4 - 42,7 %), e todas as hemiceluloses tinham composições semelhantes que eram compostas de grandes quantidades de xilose (83,1 - 84,6 %) e pequenas quantidades de outros componentes. Os tratamentos alcalinos a 40 – 50 °C não degradaram a estrutura macromolecular dos polissacarídeos hemicelulósicos do bagaço da cana-de-açúcar significativamente. Além disso, todas as sete frações apresentaram uma estrutura similar e todas eram 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana consistindo de uma base linear com ramificações a O-2 e O-3 de arabinofuranosil ou a O-2 de O-4 unidade de ácido metilglucurônico. Na figura 9 apresentam-se, em esquema, as principais aplicações das xilanas.

Figura 9. Diversas aplicações de xilanas em diferentes campos.



Fonte: Adaptado de Serigado (2014)

3.3.3 Lignina

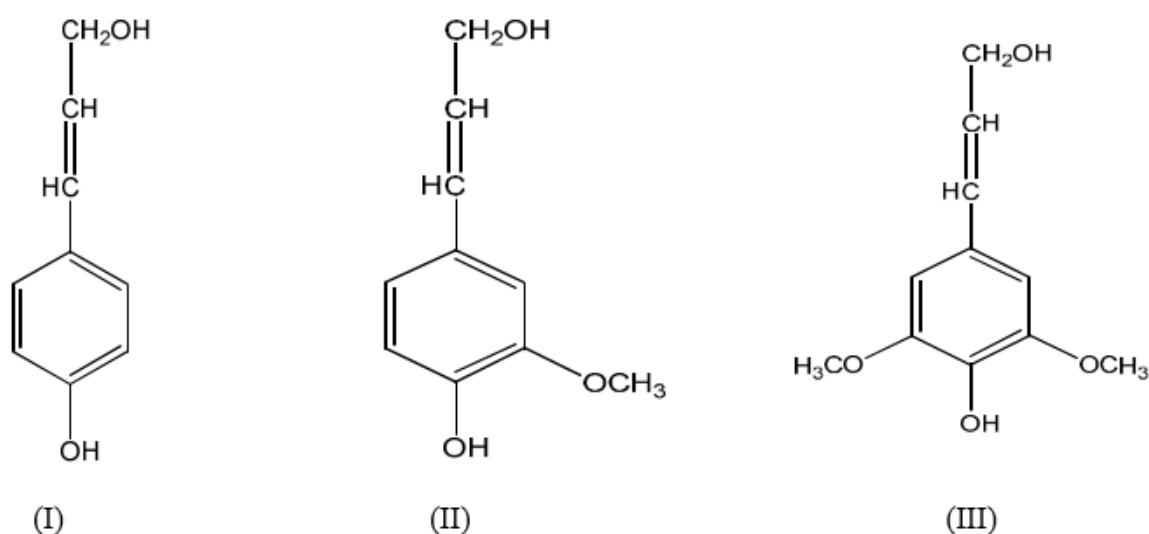
Lignina compõe entre 10 e 20 % da biomassa lignocelulósica dependendo da espécie. É constituída por unidades de fenilpropano que são mantidas unidas por vários tipos de ligações e está intimamente ligada à hemicelulose e à celulose e atua como a cola que as mantém juntas. A lignina é hidrofóbica e consequentemente impede a entrada de água nas paredes celulares; protegendo assim a celulose e hemicelulose. Além disso, é extremamente resistente à degradação química e enzimática, sendo responsável por proteger a biomassa lignocelulósica do ataque bacteriano (NAIDU, 2017).

A lignina é uma macromolécula tridimensional, amorfa e altamente ramificada, (FASANELLA, 2008), apresentando em sua estrutura inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos ligados por meio de diferentes tipos de ligações, como do tipo éter (hidroxilas primárias e secundárias, carbonilas, carboxilas, ésteres e ligações etilênicas) ou carbono-carbono (ARANTES, 2009; RAMIRES, 2010).

Do ponto de vista químico, a lignina é um composto heterogêneo, de alta massa molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante. Este biopolímero é formado pela polimerização oxidativa de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool sinapílico (propanol siringil), álcool coniferílico (propanol guaiacil) e álcool cumarílico (propanol p-hidroxifenil), unidos entre si, e com os polissacarídeos da parede celular, por ligações éter e carbono-carbono. A proporção destes monômeros pode variar entre espécies de

plantas, sendo as ligações β -0-4 as mais frequentes (HOFRICHTER, 2002). É um polímero derivado de unidades fenilpropânicas (unidades-C9) que têm sua origem na polimerização desidrogenativa dos álcoois: cumarílico (unidade p-hidroxifenila), coniferílico (unidade guaiacila) e sinapílico (unidade siringila) (Figura 10).

Figura 10. Precursores primários das ligninas: álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III).



Fonte: Fengel; Wegener (1989).

A liberação das hemiceluloses da matriz celular é restringida, entre outros fatores, pela presença da lignina, uma vez que ambas estão intimamente associadas. Diversos estudos demonstram que existem interações físicas e químicas como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, e ligações do tipo éster ou éter, que formam uma espécie de “rede” entre os componentes da parede celular. Dentre as ligações covalentes formadas entre a lignina e os polissacarídeos conhecidas como complexos lignina-carboidratos (LCCs), contribuem ainda mais para recalcitrância da parede celular (SCALBERT et al., 1985; ALÉN, 2000; EBRINGEROVÁ, 2006).

Do ponto de vista morfológico a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das plantas, a lignina é incorporada como o último componente da parede celular, interpenetrando as fibrilas, acarretando no fortalecimento da parede. Sua estrutura é bem mais complexa do que a da celulose e da hemicelulose devido à presença de diversas unidades precursoras e ao grande

número de combinações possíveis entre as mesmas (MARABEZI, 2009).

A parede celular de gramíneas, como a cana-de-açúcar, difere da de outras espécies quando se trata da composição da lignina (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Essa composição é similar entre mono e dicotiledôneas, no entanto, as primeiras possuem uma pequena, mas significativa, quantidade da unidade hidroxifenil (4 a 15 %), enquanto que nas dicotiledôneas ela é encontrada em pequena porcentagem (GRABBER et al., 2004).

3.4 Tamanho de partícula – granulometria da biomassa

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos visa romper as interações existentes entre os constituintes da parede celular e a sua separação através de operações que levam a redução do tamanho das partículas da biomassa, geração limitada de produtos de degradação da celulose e da hemicelulose, tudo isso com o consumo mínimo de energia e à baixo custo. Estas propriedades, aliadas a outras como a reutilização de reagentes e recuperação dos componentes solubilizados, para geração de produtos com elevado valor agregado, são parâmetros a serem avaliados para a escolha do pré-tratamento adequado (MOSIER et al., 2005; GALBE; ZACCHI, 2012).

Uma das vantagens do pré-tratamento físico é o fato de este ser indiferente às características físicas e químicas da biomassa utilizada (CHANDRA et al., 2007). Entretanto, a energia consumida para este processo depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa utilizada, e não há remoção de lignina (KUMAR et al., 2009; ALVIRA et al., 2010). Esta técnica de pré-tratamento consome energia e tempo, podendo ser a parte de maior custo do processo (BALAT, 2011).

Os pré-tratamentos físico utilizam a moagem, trituração ou o refinamento e tem como objetivo a diminuição do tamanho da partícula e, dependendo da intensidade do processo, podem alterar a cristalinidade da celulose (SILVA, 2016). A redução do tamanho da partícula pode aumentar a área superficial, o que promove uma melhora na sacarificação enzimática.

O material lignocelulósico pode ser submetido a diferentes formas de moagem: moinho de bolas, facas, martelo e coloidal (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). O principal objetivo é reduzir o tamanho das partículas, tornando maior sua superfície de contato, melhorando a transferência de calor e massa no processo. Além disso, a moagem provoca alterações na estrutura que podem reduzir a cristalinidade das fibras de celulose, de modo a alcançar melhores conversões (ZENG et al., 2007; LIU et al., 2013).

Um estudo feito por Queralt (2014), teve como objetivo estudar a viabilidade do

aproveitamento energético de resíduos agrícolas e agroindustriais em processos de conversão termoquímica, por meio da determinação de suas propriedades físico-químicas. O bagaço foi seco e então separado por peneiramento em duas frações: a retida (tamanho de partícula > 4 mm) e a fina (tamanho de partícula < 4 mm). As peneiras da série TYLER utilizadas apresentavam diferentes diâmetros de abertura (9, 20, 28, 35, 60, 100 mesh) e encaixadas junto ao fundo de peneiras, com abertura de malha em ordem crescente da base para o topo, de modo a formar um único conjunto de peneiras. Foi observado que nas análises elementar e imediata das amostras de bagaço *in natura* a fração retida e fina apresentaram valores pouco divergentes, representando assim semelhantes composições químicas.

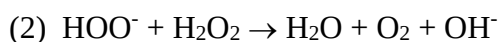
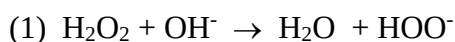
Um estudo feito por Aghcheh et al., (2015), verificou a influência do tipo de bagaço de cana-de-açúcar e seu tamanho de partícula na produção de xilose e bioconversão de xilose para xilitol com a levedura *Debaryomyces hansenii*. As amostras de bagaço foram trituradas utilizando um moinho de bolas e as diferentes frações de tamanho foram separadas por peneiras apropriadas. As gamas de tamanho empregadas em vários experimentos foram 1/4 mesh a 5 mesh. Os resultados indicaram que a desfibracão do bagaço pode melhorar o rendimento de xilose obtida na hidrólise ácida, bem como o rendimento da fermentação com xilitol a partir do hidrolisado de hemicelulose resultante usando a levedura *D. hansenii*. Os resultados também mostraram que, dentro da faixa de -5 mesh a 1/4 mesh, uma diminuição no tamanho das partículas de bagaço resultou em um aumento significativo na taxa de sua hidrólise ácida. No caso do bagaço não desfibrado, o hidrolisado de hemicelulose preparado a partir de um tamanho maior de partícula resultou em maiores taxas de fermentação de xilitol, enquanto que para o bagaço não-desfibrado este não foi evidenciado.

O pré-tratamento físico tem como objetivo a redução do tamanho da partícula, reduzindo também a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose e aumentando a superfície de contato (ALVIRA et al., 2010; CHANDRA et al., 2007). Isso torna a matriz lignocelulósica mais acessível às enzimas do complexo celulase.

3.5 Extração de hemicelulose com peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é um excelente oxidante em meio alcalino, apresentando baixa toxicidade, de fácil manuseio, sendo seus dois produtos de decomposição, água e oxigênio não poluentes. O tratamento com peróxido de hidrogênio é um processo eficiente para remoção de lignina e hemicelulose de lignocelulósicos e, remove também, sílica e graxas (CURRELI et al., 1997). O peróxido reage com as estruturas aromáticas e alifáticas da lignina, sendo muito

utilizado em processos de branqueamento de polpa (LIU, 2013). A ação desse agente pode gerar produtos de degradação devido à formação de radicais oxidantes. A influência do pH já foi bastante estudada e a literatura apresenta como ótimo o valor de 11,6 (SUN et al., 2001; YANG et al., 2002). Em meio alcalino o peróxido de hidrogênio se decompõe no ânion peroxidrila (HOO^-), o principal agente na degradação de grupos cromóforos, de acordo com a reação 1 ($\text{pK}_a = 11,6$ a 25°C) (KADLA e CHANG, 2001):



Por outro lado, quando o peróxido é usado como agente de deslignificação em extração alcalina, a sua decomposição ocorre devido à formação de hidroxila e de oxigênio, que são os oxidantes que iniciam as reações de deslignificação (reação 2). Embora a decomposição do peróxido seja necessária para que ocorra a deslignificação, a velocidade de decomposição deve ser reduzida para que não ocorra formação em excesso de radicais livres, o que pode levar a uma degradação excessiva dos polissacarídeos.

Alguns metais como ferro, cobre e manganês aceleram a decomposição do peróxido de hidrogênio em meio alcalino, nos radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os quais participam do mecanismo de deslignificação (SUN e TOMKINSON, 2002). Tais radicais apresentam efeito positivo para o processo de deslignificação, entretanto, também atuam hidrolisando os carboidratos, o que é indesejável para o rendimento do processo. Como as consequências negativas são maiores, os metais devem ser eliminados do processo.

O pré-tratamento deve ser forte o suficiente para desestruturar o complexo lignocelulósico e possibilitar a separação dos seus principais componentes (celulose, hemiceluloses e lignina) sem que ocorra degradação química (ROCHA et al., 2011).

A adição da base hidróxido de sódio ao peróxido de hidrogênio faz com que a solução se torne um agente efetivo na deslignificação e solubilização da hemicelulose. Isto é devido à formação do ânion hidroperóxido (HOO^-), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe em radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($^{\circ}\text{O}-2$). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos, quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina e hemicelulose (PAN et al., 1988; FANG et al., 1999; SUN et al., 2004).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino de resíduos lignocelulósicos,

como o bagaço de cana-de-açúcar, aumenta a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e consequentemente a produção de etanol. Várias condições do processo têm sido estudadas para otimizar a efetividade enzimática (AZZAM, 1989).

3.6 Extração de hemicelulose com ácido diluído

Dentre os pré-tratamentos, com ácido sulfúrico diluído está entre os processos mais comumente aplicados. A solubilização da hemicelulose, as alterações estruturais da lignina, a quebra das ligações lignina-carboidrato e a diminuição no tamanho de partículas, são alguns dos efeitos causados pelo pré-tratamento ácido aos substratos lignocelulósicos; sendo a temperatura, a concentração do ácido e o tempo de residência, as variáveis de processo que demandam otimizações. As modificações estruturais causadas na matriz lignocelulósica proporcionam melhoras significativas nos rendimentos de conversão enzimática da fração celulósica (SANTOS, 2015).

O pré-tratamento com ácido diluído tem como característica aumentar a reatividade da celulose para a hidrólise enzimática. Este tipo de pré-tratamento é usado para promover a hidrólise da hemicelulose. Após o tratamento, é obtida uma solução hidrolisada que contém açúcares simples (glicose, galactose, arabinose e xilose) e um resíduo sólido formado por lignina e celulose (LUCARINI et al., 2017). O ácido sulfúrico é o mais utilizado, podendo ser também empregado outros ácidos, como por exemplo, os ácidos clorídrico e fosfórico. A principal consequência deste pré-tratamento é a formação de uma série de compostos, sendo os principais: xilose, glicose, arabinose, ácido acético, o furfural e o 5- hidroximetil-furfural (HMF), devido à quebra das ligações entre os açúcares monoméricos e as cadeias poliméricas da hemicelulose e da celulose. O principal inconveniente, além de ser um tratamento que requer equipamentos que resistam à corrosão, é a formação de inibidores de fermentação, compostos tóxicos tais como os aldeídos furfural e HMF, que inibem a maioria dos microrganismos produtores de etanol (RASMUSSEN et al., 2014).

Morais (2010), estudou o pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química e investigou a padronização de procedimentos para avaliar o pré-tratamento físico e químico do bagaço da cana-de-açúcar, aliado a diferentes tratamentos térmicos a partir de duas granulometrias de bagaço (1,1 e 2,5 mm). O pré-tratamento ácido diluído mostrou-se bastante eficiente na separação dos três principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar, sendo que, a porcentagem no teor de lignina permaneceu praticamente a mesma em todos os tratamentos, atingindo um aumento nesta fração com a aplicação do ácido

sulfúrico em relação ao controle. Ainda, o pré-tratamento químico realizado no bagaço, apresentou uma quebra nas fibras do substrato: a celulose aumentou em comparação ao controle e fez o teor de hemicelulose baixar em todos os tratamentos, demonstrando um bom resultado como pré-tratamento para a posterior hidrólise.

Devido à estrutura complexa da biomassa lignocelulósica, um pré-tratamento torna-se pré-requisito para que a hidrólise enzimática dos polissacarídeos a açúcares fermentescíveis seja realizada de maneira eficaz. Um pré-tratamento realizado com sucesso deve: maximizar os rendimentos de convertibilidade enzimática; minimizar a perda de açúcares; maximizar a produção de co-produtos com valor agregado; não exigir a adição de substâncias químicas que possam prejudicar as enzimas hidrolíticas ou agentes fermentativos; minimizar o uso de energia, substâncias químicas e equipamentos; e permitir a ampliação para escala industrial. Na realidade, é muito difícil alcançar todos os itens descritos acima em um único processo. Entretanto, os dois últimos itens são especialmente importantes para a viabilidade econômica e prática de um dado processo industrial (SANTOS, 2010).

3.7 Hidrólise enzimática da celulose

Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- β -D-glucosidades que hidrolisam a celobiose à glicose.

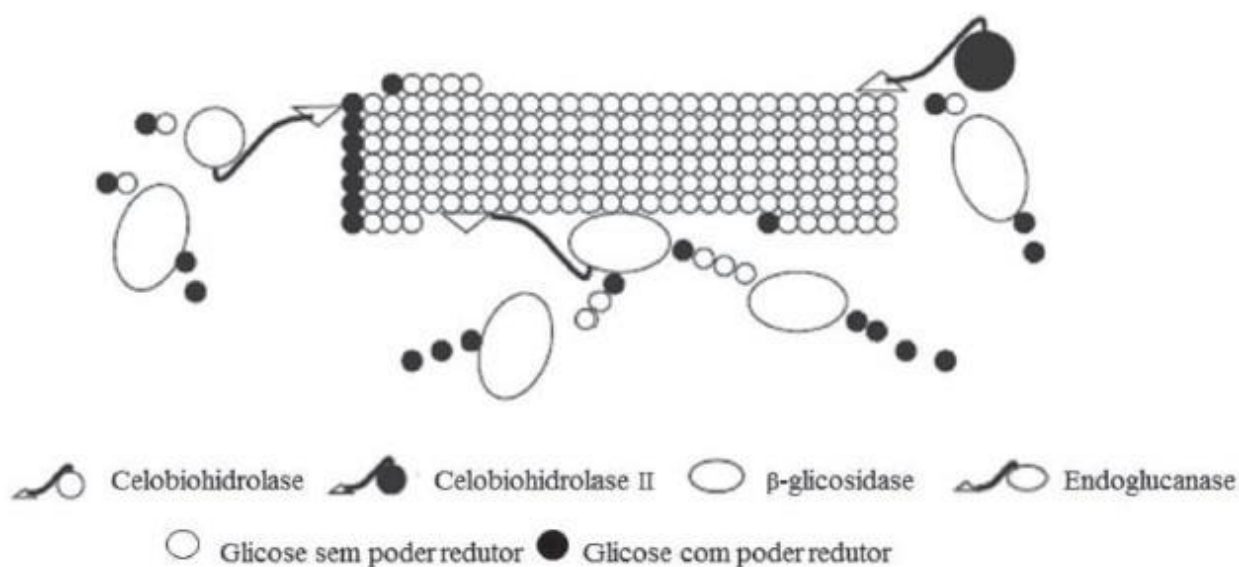
As endoglucanases atuam clivando aleatoriamente as regiões internas da cadeia de celulose, preferencialmente nas regiões amorfas, diminuindo o grau de polimerização da mesma. Algumas endoglucanases podem ser processivas, agindo por clivagens consecutivas de uma única cadeia polissacarídica através do sítio ativo (HORN et al., 2012).

As exo-1,4-glucanases ou celobiohidrolases são enzimas processivas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas próximas aos terminais da molécula de celulose, liberando celobiose e algumas celodextrinas (ZHANG et al., 2006). Podem ser classificadas em dois grupos, CBH1 e CBH2, sendo que a primeira atua nas extremidades redutoras da celulose, e a segunda, nos terminais não redutores (TEERI et al., 1997). As celobiohidrolases são essenciais para a degradação efetiva da maior parte da celulose cristalina. As β glicosidases convertem a pequenos oligômeros solubilizados pela endoglucanase e celobiose (dímero de glicose) em glicose (HORN et al., 2012).

Uma das propriedades destas enzimas é a atuação em sinergismo, alvo de diversos estudos na literatura que demonstram que a eficiência de hidrólise destas enzimas é muito maior quando elas são utilizadas conjuntamente. Tais estudos demonstram que as enzimas que tem ação endo atuam gerando novos terminais redutores e não redutores para a ação das enzimas que possuem ação exo, as quais, liberam celobiose, a qual é convertida em glicose, pelas β -glicosidases (HORN et al., 2012).

As enzimas celulolíticas são capazes de atuar na hidrólise do polissacarídeo de celulose através da ação sinérgica dos seus três principais grupos de enzimas: endoglucanases (EGases) que clivam aleatoriamente ligações β -1,4 glicosídicas nas regiões amorfas da celulose e geram novos terminais redutores e não-redutores, celobiohidrolases (CBH) que são enzimas processivas e liberam celobiose a partir de terminais redutores e não redutores de fragmentos de celulose produzidos por endoglucanases, e as β -glicosidases que hidrolisam celobiose ou celo-oligossacarídeos em glicose. As β -glicosidases são enzimas não-processivas, pois o substrato deve ser liberado após cada clivagem para permitir a liberação da nova molécula de glicose (Figura 11). Ambas as enzimas, celobiohidrolase e β -glicosidase, são fortemente inibidas pelo produto de cada reação, celobiose e glicose, respectivamente.

Figura 11. Ação das enzimas no polissacarídeo de celulose para liberação de açúcares fermentescíveis.

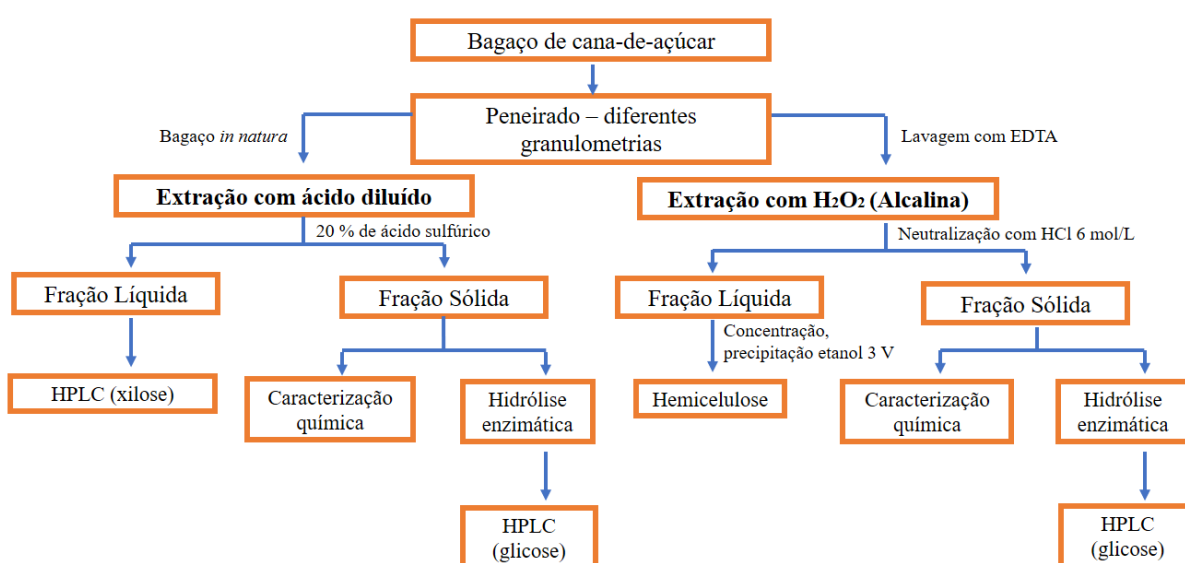


Fonte: Florencio (2017)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 12 mostra uma representação esquemática dos procedimentos utilizados para solubilização da hemicelulose, tanto na forma monomérica quanto polimérica, além das análises como caracterização química e hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados (sólidos obtidos após extração de hemicelulose).

Figura 12. Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a solubilização da hemicelulose.



Fonte: Autor

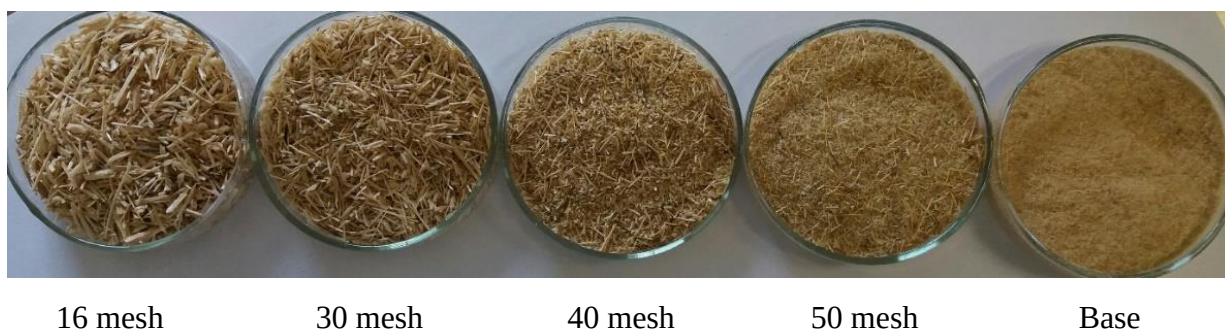
4.1 Obtenção e preparo do material

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de Piracicaba/SP. O material foi previamente lavado e seco em estufa a 40 °C. Em seguida, armazenado em laboratório para análises. O bagaço de cana-de-açúcar foi moído em moinho de facas (Marconi - MA 580), sem utilização de peneiras para retenção de material e com curto ciclos de moagem para produzir material com variado tamanho de partícula. As análises foram realizadas em triplicata.

Posteriormente este foi submetido a peneiramento com agitador de peneiras (Marconi – MA 750-PEN) para obter frações com diferente tamanho de partícula. Foram obtidas frações com peneiras de 50, 40, 30, e 16 mesh e base, conforme apresentado na Figura 13. O bagaço controle, em testes de hidrólise enzimática e análise de extrativos, foi selecionado passante pela

peneira de 20 mesh. Utilizou-se amostras de 100 g de bagaço, submetidas a agitação por cerca de 1 h em intensidade média, para distribuir as frações granulométricas. A tabela 4 traz a abertura em mesh das peneiras e sua abertura em milímetros correspondentes, utilizadas para a granulometria.

Figura 13. Diferentes tamanhos de partículas do bagaço de cana-de-açúcar após agitação de 1h em intensidade média.



Fonte: Autor

Tabela 4. Abertura das peneiras utilizadas para obtenção de bagaço de cana-de-açúcar com diferente granulometria.

Mesh	mm
16	1,19
30	0,595
40	0,420
50	0,297
Base	< 0,297

Fonte: Autor

4.2 Extração de hemicelulose (polimérica)

As amostras do bagaço peneirado foram tratadas com solução de ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) 0,2 % (m/v) durante 1 h a 90 °C para remoção de metais. A extração foi realizada com condições otimizadas para bagaço de cana-de-açúcar, 6 % H₂O₂ m/v a 25 °C durante 4 h (BRIENZO et al., 2009). Posteriormente, experimentos foram realizados com 5 ou 10 g de material, colocados em Erlenmeyer, seguido da adição dos reagentes preparados em um volume de 200 mL, sendo o pH ajustado com NaOH em 11,6, e submetido a agitação de 135 rpm. Após a reação, o material foi filtrado em papel de filtro. Em seguida o pH do filtrado foi imediatamente corrigido para 6,0 com adição de HCl 6 mol/L. Esta solução foi concentrada cerca de 3 vezes (relação volume) em uma estufa a 45 °C. A hemicelulose foi precipitada

adicionando 3 volumes de etanol 96 %. Após a sedimentação do material, o sobrenadante foi removido e ao precipitado adicionado uma solução de etanol 70 %. Esta etapa, lavagem com etanol 70 %, foi repetida (cerca de 4 vezes) até obter-se um sobrenadante límpido. O resíduo foi separado e seco em estufa a 45 °C.

4.3 Rendimento de extração

O rendimento de extração de hemicelulose/xilana foi determinado pela relação entre a quantidade de hemicelulose extraída em massa (gramas) pela quantidade de material utilizado:

$$\text{Rendimento de extração, \%} = \frac{M_h * 100}{M_{\text{bag}}}$$

M_h = massa extraída;

M_{bag} = massa inicial de bagaço.

4.4 Caracterização química da hemicelulose

O método caracterização química da hemicelulose consiste em hidrolisar aproximadamente 300 mg de hemicelulose, adicionando 3 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m), a reação ocorreu a 45 °C por 7 min. A reação foi interrompida com adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 min (GOUVEIA et al., 2009; BRIENZO et al., 2009). O conteúdo foi filtrado em filtro de placa porosa nº 4, previamente tarado. O resíduo sólido foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação da lignina insolúvel (Klason). O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado por medida de absorbância em 205 nm. Para o cálculo da concentração de lignina solúvel foi utilizada uma absorvidade de 105 L/g.cm nesse comprimento de onda (GOUVEIA et al., 2009).

4.5 Extração de hemicelulose (monomérica)

Para extração de hemicelulose na forma monomérica foi utilizado um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Foram pesadas 5 g das diferentes frações do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em frasco schott e então adicionados 50 mL de solução de ácido sulfúrico 20 % (m/m). As amostras foram autoclavadas a 121 °C por 1 h. No filtrado foi quantificado xilose com HPLC. O material sólido foi lavado até chegar em pH da água destilada (4,5 a 5,0), sendo seco em estufa a 60 °C e posteriormente feita a caracterização química desse

material pré-tratado, sendo este armazenado para subsequente hidrólise enzimática com celulase (Cellic Ctec).

4.6 Caracterização química do resíduo rico em celulose

O método caracterização química do resíduo rico em celulose, que é a fração sólida que sobrou após a filtragem da etapa de extração da hemicelulose, consiste em hidrolisar aproximadamente 300 mg do resíduo rico em celulose, adicionando 3 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m), a reação ocorreu a 30 °C por 1 h. A reação foi interrompida com adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura foi autoclavada a 121 °C por 1 h (SLUITER et al., 2010). O conteúdo foi filtrado em filtro de placa porosa nº 4, previamente tarado. O resíduo sólido foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação da lignina insolúvel (Klason). A fração solúvel foi usada para determinar os teores de açúcares e ácido acético por cromatografia líquida (GOUVEIA et al., 2009). O teor de lignina solúvel em ácido é determinado por medida de absorbância em 205 nm. Para o cálculo da concentração de lignina solúvel foi utilizada uma absortividade de 105 L/g.cm nesse comprimento de onda (DENCE, 1992).

4.7 Condutividade

Foi preparada uma solução da amostra em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A solução foi aquecida sob agitação magnética até atingir o ponto de ebulição (ou em micro-ondas), em seguida foi resfriada e permaneceu sob agitação de 80 rpm por uma noite a 25 °C. Foi centrifugada a 4500 rpm por 10 min para separação do material insolúvel, com esse material foi feita a leitura de condutividade, foi medida em mS/cm a 25 °C.

4.8 Determinação do teor de cinzas totais

Os cadinhos de porcelana foram colocados em mufla, à temperatura de 575 °C, pelo período de 4 h. Posteriormente foram retirados da mufla e colocados no dessecador, deixados pelo tempo necessário para atingir a temperatura ambiente. Os cadinhos foram pesados em balança analítica e anotado suas massas. Foram pesados 0,5 g do material no cadinho e anotado a massa exata. Os cadinhos com o material foram colocados na mufla à temperatura de 575 °C durante o período de 4 h. Então foram removidos os cadinhos da mufla e colocados no dessecador pelo tempo necessário para atingir a temperatura ambiente. Novamente os cadinhos,

foram pesados em balança analítica e anotada a massa exata. A massa do cadinho seco foi descontada, assim obtendo a massa de cinzas totais.

O teor de cinzas totais foi calculado conforme a equação a seguir:

$$\text{Teor de cinzas, \%} = \frac{M_f * 100}{M_{\text{bag}}}$$

M_{bag}

M_f = massa final;

M_{bag} = massa inicial de bagaço.

4.9 Solubilidade da hemicelulose

A solubilidade da hemicelulose foi determinada de acordo com método de Bailey (1992). O método consiste em preparar uma solução de xilana 1 % em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A solução foi aquecida sob agitação magnética até atingir o ponto de ebulição (ou em micro-ondas), em seguida a solução foi resfriada e permaneceu sob agitação de 80 rpm por uma noite a 25 °C. A solução foi centrifugada a 4500 rpm por 10 min para separação do material insolúvel, o qual foi seco em estufa a 60 °C até massa constante.

4.10 Determinação da Atividade enzimática celulase total

A atividade de celulasas totais foi determinada segundo a técnica descrita por Ghose (1987). Tiras de papel de filtro Whatman nº 1 (1x6 cm) foi adicionada a tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 50 °C por 60 min e a reação foi interrompida com 3 mL de DNS. Os tubos foram então fervidos a 100 °C em banho maria por 5 min. Em seguida, 20 mL de água destilada foi adicionada e a então procedeu-se a leitura da absorbância do conteúdo a 540 nm. O controle foi feito substituindo o papel de filtro e o volume da enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 4,8. Nos controles para cada amostra, o reagente DNS (MILLER, 1959), foi adicionado antes do extrato enzimático para descontar a produção de açúcar não relacionada a reação enzimática. A curva padrão de glicose foi construída utilizando reagente D-glicose (Merck) em concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg/mL.

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo completamente 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio, em 1,4 L de água destilada. A seguir, foram adicionados 300 g de tartarato de sódio e potássio; 7,6 g de fenol (aquecido a 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O volume foi acertado para 1,5 L; filtrado e armazenado em frasco

âmbar (MILLER, 1959).

4.11 Hidrólise enzimática

As amostras *in natura*, pré-tratadas com ácido diluído e pré-tratadas com NaOH 6 mol/L foram submetidas a hidrólise enzimática para avaliar o rendimento em glicose. Cerca de 0,1 g de amostra foi pesado em tubos falcon de 50 mL, e submetido a hidrólise enzimática para comparar a digestibilidade utilizando coquetel comercial (Cellic Ctec), em 5 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A atividade enzimática utilizada foi de 12 FPU/g, em reação a 50 °C e agitação de 140 rpm em incubadora shaker (Solab - SL-222), por 24 h (BRIENZO et al., 2015). O rendimento em glicose (anidroglicose, fator de hidratação 0,9) foi expresso com base no conteúdo de celulose no material.

4.12 Determinação da concentração de açúcares

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas por HPLC, utilizando uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 45 °C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H₂SO₄ 0,005 mol/L, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em filtro de seringa 0,22 µm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de hemicelulose em meio ácido

O ácido diluído é um dos principais métodos de pré-tratamento empregados na desconstrução da biomassa. Este tipo de pré-tratamento é muito utilizado para solubilizar a hemicelulose, na forma de monossacarídeo, e consequentemente tornando a celulose no material pré-tratado mais acessível a ação de enzimas (BRIENZO et al., 2017).

No presente trabalho o pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico a 20 % (m/m). O ácido sulfúrico diluído é vantajoso quanto à remoção da fração hemicelulósica, com baixa degradação da celulose (ASSUMPÇÃO, 2016). O pré-tratamento ácido tem a vantagem do rendimento elevado no teor de glicose com a posterior hidrólise enzimática, e a solubilização das hemiceluloses (QUINELATO, 2016).

A caracterização quanto a concentração dos componentes principais do bagaço, solubilizados durante o pré-tratamento ácido diluído, de cana-de-açúcar com diversas granulometrias, está descrita na Tabela 5.

As frações líquidas (hidrolisado), obtidas por filtração, do pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias, foram caracterizadas quanto a concentração de açúcares e grupos acetil (Tabela 5). Esta composição foi baseada no conteúdo de celulose/glucana, xilana, arabinana, ácido acético, os quais são os principais componentes da biomassa lignocelulósica solubilizados com o pré-tratamento ácido diluído (OLIVEIRA et al., 2017).

Tabela 5. Açúcares e grupos acetil liberados na fração líquida do pré-tratamento ácido diluído (20 % m/m, a 121 °C/1 h) do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias.

Amostra – abertura da peneira (mesh)	Concentração (g/L)			
	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético
16	0,40 ± 0,02	6,04 ± 0,99	0,50 ± 0,12	1,02 ± 0,22
30	0,36 ± 0,04	5,94 ± 0,91	0,57 ± 0,12	1,01 ± 0,16
40	0,41 ± 0,27	6,59 ± 1,64	0,68 ± 0,28	0,93 ± 0,46
50	0,26 ± 0,17	3,34 ± 1,35	0,61 ± 0,20	0,72 ± 0,32
Base	0,34 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,62 ± 0,19	0,52 ± 0,20

- Base: material que passou pela peneira de 50 mesh.

Conforme a tabela 5, foi possível analisar os açúcares liberados na fração líquida do pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias quanto ao conteúdo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético. Considerando as frações 16, 30, 40, 50 mesh e a base (material que passou pela peneira de 50 mesh), para a glicose, apresentou uma variação de 0,26 g/L (bagaço 50 mesh) a 0,41 g/L (bagaço 40 mesh); já para xilose, a variação foi de 6,04 g/L (bagaço 16 mesh) a 0,43 g/L (material que passou pela peneira de 50 mesh); para arabinose a variação foi de 0,50 g/L (bagaço 16 mesh) a 0,68 g/L (bagaço 40 mesh); e finalmente, para o ácido acético a variação de foi de 1,02 g/L (bagaço 16 mesh) a 0,52 g/L (material que passou pela peneira de 50 mesh). A maior solubilização de açúcar foi para os componentes da hemicelulose (xilose, arabinose ácido acético), o que é característico do pré-tratamento ácido diluído.

De acordo com Santos (2015) estudando a ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana, obteve os seguintes resultados considerando o tempo de 60 min: H89 glicose 4,0 g/L; xilose 12,9 g/L; arabinose 1,1 g/L; ácido acético 2,2 g/L, já para H140 glicose 1,2 g/L; xilose 12,6 g/L; arabinose 1,1 g/L; ácido acético 2,4 g/L e para H121 glicose 1,6 g/L; xilose 11,7 g/L; arabinose 1,1 g/L; ácido acético 2,2 g/L. Observa-se que a solubilização de glicose e xilose podem variar de acordo com a variedade do material utilizado. Comparando com os valores obtidos no presente trabalho com a literatura, observou-se que as xilanas também estão presentes em maior concentração que as glucanas. A presença de arabinose e ácido acético nos hidrolisados ácidos não seguiu um padrão definido, observando-se que os grupos acetil também não seguiram um padrão, conforme as diferenças na granulometria do bagaço. Para Santos (2015), vale destacar a detecção destes oligômeros em alguns dos hidrolisados ácidos do H89, nos quais foram detectadas apenas xiloses monoméricas. Já no presente trabalho a glucana e a xilana não seguiram um padrão, porém a arabinana e o ácido acético diminuíram conforme diminui o tamanho da partícula.

A aplicação do pré-tratamento ácido em concentração de 0,5 % (m/v) levou a uma redução média de arabinoxilana na composição química do material em 50 % (BENJAMIN et al., 2013). Este resultado sugere que uma parte da redução da massa após o pré-tratamento seja proveniente da remoção do total de hemicelulose. No presente trabalho, utilizando maior concentração de ácido, porém menor temperatura, a fração com menor tamanho de partícula a base (material que passou pela peneira de 50 mesh) foi o material com menor quantidade de hemiceluloses. O conteúdo de xilana diminuiu com a diminuição do tamanho de partícula (Tabela 5).

5.2 Resíduo sólido pré-tratamento ácido

O material sólido, rico em celulose, resultante da filtração do pré-tratamento ácido diluído, foi caracterizado para determinar sua composição química em celulose/glucana, xilana, arabinana e grupos acetil. Na tabela 6 encontram-se os resultados da composição do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias pré-tratado com ácido diluído (20 % m/m, a 121 °C/1h). A partir dos pré-tratamentos, pode-se realizar uma quantificação de biomassa resultante após extração/solubilização de hemicelulose. Assim, foi possível estabelecer a porcentagem de rendimento do material pré-tratado ou recuperação de massa (Tabela 8). A recuperação de massa após o pré-tratamento pode ser um indicativo da recalcitrância do material, sendo a menor perda de massa associada ao material mais resistente (BENJAMIN et al., 2013).

Tabela 6. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias pré-tratado com ácido diluído (20 % m/m, a 121 °C/1 h).

Composição química (% , massa seca)						
Amostra – abertura da peneira (mesh)	Glucana	Xilana	Arabinana	Ácido acético	Lignina Total	Recuperação de massa
Bagaço in nature	42,25 ± 2,02	25,39 ± 1,64	2,62 ± 0,47	3,38 ± 0,86	18,83 ± 0,85	-
16	43,60 ± 6,56	13,53 ± 2,71	1,17 ± 0,04	1,08 ± 0,07	44,16 ± 3,69	53,13 ± 6,28
30	40,07 ± 1,33	13,84 ± 2,26	1,31 ± 0,34	0,69 ± 0,23	44,32 ± 4,90	49,33 ± 4,45
40	41,35 ± 0,48	13,95 ± 4,46	1,36 ± 0,28	-	42,89 ± 2,31	57,07 ± 2,64
50	41,62 ± 0,81	7,94 ± 0,62	0,45 ± 0,79	-	43,06 ± 4,69	55,40 ± 2,95
Base*	39,26 ± 0,57	5,40 ± 0,48	1,46 ± 0,36	-	40,80 ± 1,06	80,40 ± 5,94

* Base: material que passou pela peneira de 50 mesh; (-): não detectado ou determinado.

O bagaço *in natura* do presente trabalho apresentou conteúdo de glucana de 42,25 %, arabinana de 2,62 %, xilana de 25,39 % e ácido acético de 3,38 % (Tabela 6). A composição química do bagaço utilizado no presente trabalho foi próxima aos descritos na literatura. De acordo com Oliveira et al. (2016), o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi reportado com composição química de 24,07 % de xilana, 3,33 % de arabinana 2,12 % de ácido acético e 33,25 % de glucana. Outros valores encontrados na literatura: 20,60 % xilana, 5,56 % arabinana, 38,90 % glucana (AGUILAR et al., 2002). Em outro estudo, os valores encontrados foram: 12,67 - 20,33 % de xilana, 1,73 - 2,77 % de arabinana e 32,60 - 40,70 % de glucana (BENJAMIN et al., 2013).

Considerando as frações 16, 30, 40, 50 mesh e a base, para a glucana, resultou em uma variação de 43,60 % (bagaço 16 mesh) a 39,26 % (base). Os valores ficaram próximos da glucana do bagaço *in natura*, que foi de 42,25 %, os valores entre as diferentes granulometrias ficaram próximos entre si, sem seguir uma tendência em função da granulometria.

Para xilana a variação do bagaço 40 mesh foi de 13,95 % e de 5,40 % para a base, os valores estes menores quando comparado com o bagaço *in natura*, que foi de 25,39 %. Porém, houve uma tendência, conforme diminuiu o tamanho da partícula, diminuiu também a quantidade de xilana no material.

Para a arabinana foi possível observar uma variação de 1,46 % (base) a 0,45 % (bagaço 50 mesh), valores estes que ficaram abaixo do bagaço *in natura*, que foi de 3,38 %. Para estes dados não houve uma tendência nos valores de polissacarídeo, conforme a diminuição do tamanho de partícula. Para o ácido acético a variação foi de 1,08 % para o bagaço 16 mesh e 0,69 % para o bagaço 30 mesh, abaixo do valor de bagaço *in natura*, que foi de 2,62 %. Houve uma tendência, conforme diminuiu o tamanho da partícula, diminuiu também a quantidade de ácido acético no bagaço, sendo que nos meshes 40, 50 e base não foi detectado ácido acético.

A lignina apresentou variação de 44,32 % (bagaço 30 mesh) a 40,80 % (base), sendo que todos os valores das diferentes granulometrias ficaram acima do encontrado no bagaço *in natura*, que foi de 18,83 %. Para Melati, (2017) a variação no teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* pode variar de 35,00 a 54,87 %, para hemicelulose de 16,52 a 35,80 % e para a lignina de 14,10 a 26,20 %. Portanto o valor de lignina obtido no presente trabalho (18,83 %), encontra-se dentro da variação da literatura. O bagaço de cana-de-açúcar proveniente de uma usina de etanol/açúcar é composto por fragmentos com diferentes tamanhos. Espera-se que os valores de lignina nas frações mais internas (nó e entrenó) sejam menores em comparação com a fração externa, já que a fração externa é formada pelos tecidos mais expostos a ações externas e, portanto, devem ser mais resistentes a ataques de microrganismos, e ações naturais degradativas (EVERT, 2006). De fato, a fração externa, próxima a epiderme, apresenta grande concentração de feixes vasculares, os quais são mais lignificados (BRIENZO et al., 2016). O bagaço de cana-de-açúcar é composto por regiões como centro/medula, região intermediária e periferia e possui feixes vasculares, que são estruturas recalcitrantes por apresentar células altamente lignificadas e com parede celular espessas, o que se sugere então a explicação do maior conteúdo de lignina no material em estudo, tendo uma variação de 43,06 a 40,80 %.

A influência da severidade do pré-tratamento foi estudada nas alterações estruturais, no teor de lignina e na hidrólise enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar, sendo os

materiais pré-tratados com ácido diluído com maior proporção de glucana e lignina nos materiais pré-tratados (BRIENZO et al., 2017). Este resultado está de acordo com o presente trabalho (Tabela 6), onde ocorreu a remoção de hemiceluloses (arabinosilana e grupo acetil) em função do pré-tratamento. A remoção de arabinosilana foi aumentada com um aumento de severidade do pré-tratamento (88,1 a 97,6 %). No entanto, a remoção de arabinosilana na biomassa foi ligeiramente inferior quando não foi utilizado ácido em comparação com o material pré-tratado com ácido diluído. Os valores de lignina e glucana no presente estudo foi de 40 % e 60 % respectivamente; sendo estes maiores quando comparado com Brienzo et al. (2017) que obteve valores de 20 a 33 % de lignina e 40 % para glucana. Já para arabinana os resultados foram semelhantes aos da severidade média estudada por Brienzo et al. (2017) da ordem de 1 a 2 %.

5.3 Extração de hemicelulose em meio alcalino

O pré-tratamento alcalino utiliza bases como hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e amônio (NH_4OH). Este tipo de pré-tratamento provoca a quebra da ligação éster, resultando na alteração da estrutura da lignina, diminuindo também a cristalinidade da celulose e remoção parcial da hemicelulose. O pré-tratamento alcalino tem a vantagem de ser eficiente na remoção da lignina e tem baixa formação de inibidores (QUINELATO, 2016).

A partir da extração da hemicelulose em meio alcalino (peróxido de hidrogênio 6 % H_2O_2 m/v, 25 °C/4 h), foi possível obter o rendimento em xilana do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias, sua condutividade, sua solubilidade e cinzas, conforme tabela 7.

Tabela 7. Rendimento em xilana do pré-tratamento alcalino (peróxido de hidrogênio 6 % H_2O_2 m/v, 25 °C/4 h) do bagaço de cana-de-açúcar com diversas granulometrias, sua condutividade, solubilidade, cinzas e lignina total.

Amostra – abertura da peneira	Rendimento de extração (%)	Condutividade (mS/cm)	Solubilidade (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)
16	36,18 ± 3,32	20,70 ± 1,46	96,10 ± 1,84	2,58 ± 0,04	6,19 ± 3,49
30	37,84 ± 2,24	20,17 ± 0,70	97,80 ± 0,42	1,20 ± 0,70	5,28 ± 1,95
40	48,49 ± 4,49	20,70 ± 0,70	96,35 ± 2,05	4,75 ± 0,33	4,98 ± 1,58
50	64,97 ± 8,53	20,74 ± 0,53	96,35 ± 0,21	6,08 ± 1,34	10,40 ± 1,98
Base*	71,43 ± 6,03	19,73 ± 0,00	96,70 ± 0,00	3,06 ± 0,82	4,73 ± 0,00

Tampão citrato pH 5	-	10,46 ± 0,00	-	-	-
Xilana comercial	-	12,04 ± 0,00	69,70 ± 0,00	-	-

- Base: material que passou pela peneira de 50 mesh; (-) não aplicável.

A xilana solubilizada do presente trabalho teve uma variação de 36,18 % (bagaço 16 mesh) a 71,43 % (bagaço base, material que passou pela peneira de 50 mesh). Observou-se que, quanto menor o tamanho da partícula, maior a quantidade de xilana solubilizada (Tabela 7). Este resultado comprova a hipótese deste trabalho, qual seria o efeito do tamanho de partícula na extração de hemicelulose.

Relatos de Sun et al. (2000), a extração de hemicelulose de palha de arroz previamente pré-tratada com NaOH a 1,0 % a 55 °C por 2 h, e com tratamento seguinte de extração com solução alcalina diluída sob condições similares, mas na presença e ausência de peróxido (0,05 % a 45 °C por 12 h em pH 11,5) solubilizou 55 % das hemiceluloses originais e 27,0 % das hemiceluloses residuais, respectivamente. Enquanto o tratamento da palha extraída com álcalis 0,5–5 % H₂O₂ liberou 49,3–74,3 % das hemiceluloses residuais originalmente presentes na palha extraída com álcali. Já a xilana solubilizada no presente estudo foi de 71,43 % (base), ficando com rendimento maior do que o obtido por Sun et al. (2000).

Para maximizar a extração de hemicelulose, várias condições de extração foram estudadas e chegando a melhor condição como sendo: concentração de H₂O₂ de 6 % (m/v), tempo de reação de 4 h, temperatura de 20 °C (Brienzo et al., 2009). Hemicelulose com 86 % de rendimento com baixo teor de lignina (5,9 %) foi obtida com tratamento com 6 % de H₂O₂ por 4 h e 20 °C. O maior rendimento de extração de xilana obtido no presente trabalho foi de 71,43 % para a o material retido na base, um pouco baixo do rendimento reportado na literatura, nas mesmas condições de extração.

Comparando a condutividade da solução de xilana comercial (*birchwood*) com as amostras de xilana extraídas do bagaço de cana-de-açúcar, com diversas granulometrias, com peróxido de hidrogênio, conclui-se que houve formação de sal, NaCl (Tabela 7). A solução de xilana comercial apresentou condutividade 60 % menor que a condutividade das amostras. Excluindo a contribuição do tampão citrato a solução de xilana comercial apresentou baixa condutividade comparada a solução das amostras extraídas do bagaço. Esta formação de sal ocorreu provavelmente durante o processo de neutralização, no qual foi comparado o ácido sulfúrico com o clorídrico. De fato, os experimentos neutralizados com ácido sulfúrico tendem a formar sal, o que é influenciado também pela sua solubilidade. O processo de extração de

hemicelulose conta com etapas de lavagem com etanol 70 % para separar a lignina e sal que estão em solução. Porém, estas lavagens não foram suficientes, sendo necessário aumentar o número de lavagens com etanol 70 %. Por outro lado, existe um esforço em diminuir estas lavagens para reduzir custos de produção (FIGUEIREDO et al., 2016). Experimentos utilizando ácido clorídrico na neutralização não levou a formação de sal, resultando em um material de interesse para este trabalho.

É desejável que a hemicelulose tenha alta solubilidade, portanto foi realizada análise de solubilidade com as amostras extraídas em meio alcalino (Tabela 7). A solubilidade da hemicelulose pode afetar suas aplicações, como por exemplo, na hidrólise enzimática para produção de xilo-oligossacarídeos. Todas as amostras analisadas obtiveram solubilidade acima de 96 %. Portanto, quando comparada à solubilidade da hemicelulose extraída com a da xilana comercial, observou-se que as amostras de xilana em estudo resultaram em maior solubilidade.

O teor de cinzas obtido no presente trabalho foi de 2,58 % para o bagaço 16 mesh; 1,20 % para o bagaço 30 mesh; 4,75 % para o bagaço 40 mesh; 6,08 % para o bagaço 50 mesh e 3,06 % para o bagaço base (Tabela 7). O teor de cinzas fornece informações da quantidade de substâncias inorgânicas ainda presentes na biomassa. As cinzas são constituídas basicamente por sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos, tendo como contra-íons mais comuns cálcio, potássio, magnésio e manganês (CURVELO, 1992). No caso do material extraído acredita-se que a cinza seja proveniente da formação de sal.

Quanto a lignina total, na extração da hemicelulose com peróxido de hidrogênio 6 mol/L a variação foi de 4,73 % (base) a 10,40 % (50 mesh). Para Figueiredo et al., (2016), numa extração de hemicelulose com KOH, foi encontrado 25,2% de lignina total. O valor encontrado no presente trabalho ficou abaixo do encontrado na literatura. Para Sun et al., (2000), o rendimento de lignina (% de matéria seca) solubilizada durante o tratamento da palha de arroz com NaOH a 1 %, obtida por extração 5 % H_2O_2 a 45 °C por 12 h em pH 11,5 foi de 4,50 %, ficando próximo do bagaço 30 mesh, que foi de 5,28 %. Já para Brienzo et al., (2009), nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho, foi encontrado 5,9 % de lignina, ficando próximo do bagaço 30 mesh, que foi de 5,28 %.

5.4 Resíduo sólido pré-tratamento alcalino

O resíduo rico em celulose gerado do pré-tratamento alcalino, com peróxido de hidrogênio foi caracterizado quanto a sua composição química quanto ao conteúdo de glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina.

Houve uma tendência nos valores obtidos de glucana, conforme diminuiu o tamanho de partícula, aumentou o teor desse polissacarídeo no bagaço pré-tratado. Os valores variaram de 44,28 % (bagaço 16 mesh) a 66,70 % (bagaço 50 mesh). Para os materiais pré-tratados retidos em peneiras de 40, 50 mesh e base ficaram acima do valor encontrado para o bagaço *in natura*, 16 e 30 mesh (Tabela 8).

Tabela 8. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio alcalino (peróxido de hidrogênio 6 % H₂O₂ m/v, 25 °C/4 h) com diversas granulometrias quanto ao conteúdo de glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina.

Amostra – abertura da peneira (mesh)	Composição química (% , massa seca)					Recuperação de massa
	Glucana	Xilana	Arabinana	Ácido acético	Lignina Total	
Bagaço <i>in natura</i>	42,25 ± 2,02	25,39 ± 1,64	2,62 ± 0,47	3,38 ± 0,86	18,83 ± 0,85	-
16	44,28 ± 2,13	21,23 ± 1,95	3,28 ± 0,12	2,38 ± 0,45	16,10 ± 4,75	71,90 ± 1,30
30	47,68 ± 1,31	20,45 ± 1,21	4,11 ± 0,49	0,58 ± 0,02	15,68 ± 1,53	72,40 ± 2,20
40	61,49 ± 1,18	16,86 ± 1,56	2,64 ± 1,13	-	17,68 ± 6,48	68,90 ± 2,10
50	66,70 ± 1,25	11,12 ± 1,46	1,36 ± 0,04	-	13,16 ± 9,37	61,00 ± 1,20
Base	66,24 ± 2,05	11,50 ± 0,97	0,12 ± 0,00	-	15,88 ± 3,32	51,80 ± 0,00

- Base: material que passou pela peneira de 50 mesh; (-) não detectado.

O conteúdo de xilana variou de 21,23 % (bagaço pré-tratado 16 mesh) e 11,20 % (bagaço pré-tratado 50 mesh), os valores seguiram uma tendência, quanto menor o tamanho da partícula, menor o valor de xilana encontrado. O bagaço *in natura* apresentou 25,39 % de xilana os bagaços de maiores meshes 16 e 30, ficaram com valores próximos ao do bagaço *in natura* pré-tratado, 21,23 e 20,45 %, respectivamente. Para a arabinana a variação foi de 0,12 % para a base (material pré-tratado que passou pela peneira de 50 mesh) a 4,11 % (bagaço pré-tratado 30 mesh). Os valores não seguiram uma tendência, com a diminuição do tamanho de partícula. O bagaço pré-tratado 40 mesh, 2,64 %, ficou com o valor semelhante do bagaço *in natura* 2,62 %. Para o ácido acético a variação foi de 0,58 % (bagaço pré-tratado 30 mesh) a 2,38 % (bagaço pré-tratado 16 mesh) sendo que os bagaços pré-tratados 40, 50 mesh e base não apresentaram presença de ácido acético. O bagaço *in natura* pré-tratado apresentou 3,38 % de ácido acético, acima das frações analisadas.

A lignina variou de 13,16 % (bagaço pré-tratado 50 mesh) a 17,68 % (bagaço pré-tratado 40 mesh), os valores não seguiram uma tendência com a diminuição do tamanho de partícula. A lignina do bagaço *in natura* ficou um pouco acima dos valores das frações pré-tratadas, 18,83 %. O método Klason (THEANDER; WESTERLUND, 1986) pode ser utilizado para obtenção da lignina pelo isolamento como resíduo, utilizando uma hidrólise ácida, onde os

polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como um resíduo. No isolamento como derivado, são liberados produtos solúveis durante o tratamento com determinados reagentes, e estes produtos são separados ao final da reação (FENGEL; WEGENER, 1984).

As condições ótimas para o pré-tratamento com peróxido alcalino do bagaço de cana-de-açúcar foram definidas como: temperatura de 60 °C, concentração de H₂O₂ de 2 %, MgSO₄ de 0,5 % e tempo de 4 h (MONTE et al., 2011). Esse pré-tratamento foi confirmado como efetivo para recuperação da celulose e para remover a lignina e solubilizar a hemicelulose. Sendo que nestas condições a porcentagem de celulose convertida foi de 58,8 %, e no presente trabalho de 66,70 % para o bagaço com granulometria de 50 mesh, ficando acima do encontrado na literatura.

5.5 Hidrólise enzimática

Para que ocorra a hidrólise enzimática, se faz necessária uma interação entre as enzimas atuantes do processo, e, no caso dos materiais lignocelulósicos, com a celulose, para que haja interação é necessário haver exposição. Portanto, quanto maior a superfície de contato, ou seja, a superfície da celulose acessível as enzimas, mais rápida será a reação, levando consequentemente a uma maior taxa de conversão em glicose (MENG; RAGAUSKAS, 2014). As figuras 14 e 15 mostram os rendimentos de glicose na hidrólise enzimática com pré-tratamento ácido e alcalino, respectivamente.

Figura 14. Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) das frações de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com ácido diluído (20 %, m/m, a 121 °C/30 min).

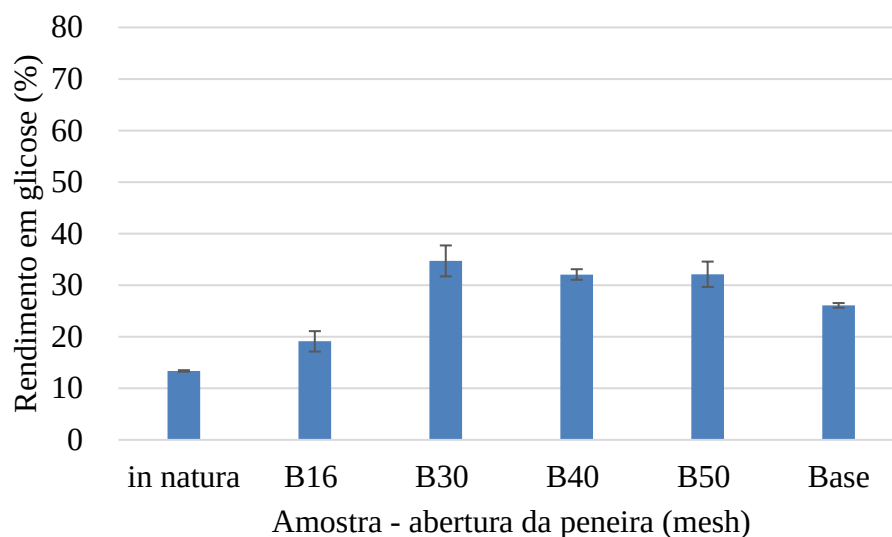
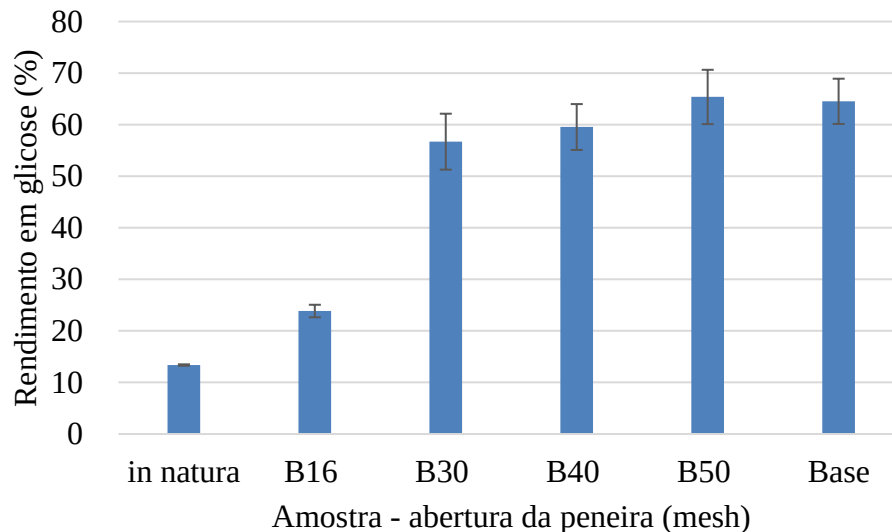


Figura 15. Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) das frações de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com peróxido de hidrogênio 6 % H_2O_2 m/v, 25 °C/4 h).



Para o bagaço 16 mesh o rendimento de glicose foi de 19,11 % para o pré-tratamento ácido e de 23,85 % para o alcalino. Já para o bagaço 30 mesh o rendimento de glicose foi de 34,71 % para o pré-tratamento ácido e de 56,70 % para o alcalino. Para o bagaço 40 mesh, o rendimento de glicose foi de 32,08 % para o pré-tratamento ácido e de 59,54 % para o alcalino. Para o bagaço 50 mesh, o rendimento de glicose foi de 32,11 % para o pré-tratamento ácido e de 65,37 % para o alcalino. Para o bagaço retido na base o rendimento de glicose para o pré-

tratamento ácido foi de 26,08 % e de 64,53 % para o alcalino. Comparando o rendimento em glicose na hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) das frações de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com ácido diluído (20 %, m/m, a 121°C/30 min), com o rendimento em glicose na hidrólise enzimática das frações pré-tratadas com peróxido de hidrogênio (6 % H_2O_2 m/v, 25° C/4 h), observou-se que o pré-tratamento alcalino resultou em maior rendimento em glicose para todas as frações/granulometrias estudadas (16, 30, 40, 50 e base). Os resultados do presente trabalho não seguiram uma tendência no rendimento de glicose, conforme a diminuição de tamanho de partícula, sendo que o bagaço 30 mesh foi o que teve maior rendimento para o pré-tratamento ácido. Já para o pré-tratamento alcalino, seguiu uma tendência do bagaço 16 mesh até o 50 mesh.

Estudando a ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana, Santos (2015), observou que, os rendimentos de conversão de glucana das amostras tenderam a aumentar de acordo com a severidade do pré-tratamento aplicada à três híbridos de cana. Contudo, foi observado que os rendimentos de conversão não diferiram substancialmente entre algumas amostras dos híbridos H89 (não tratado e 20 min), H140 (60 e 90 min) e H321 (40 e 60 min). Provavelmente, este resultado se deve à semelhança entre a composição química das amostras, pois as condições de pré-tratamento não foram suficientemente eficientes para ocasionar mudanças significativas, a ponto de diferir os rendimentos de conversão. No presente trabalho, para o pré-tratamento ácido a variação foi de 19,11 % para o bagaço 16 mesh a 34,71 % para o bagaço 30 mesh (Figura 13). Esses valores estão abaixo dos valores máximos obtidos por Santos, (2015), porém deve ser levado em consideração que este autor utilizou 72 h de hidrólise, já no presente estudo foi utilizado 24 h. O presente trabalho utilizou 12 FPU/g como carga de enzima, enquanto que o trabalho da literatura utilizou 10 FPU/g.

Um estudo dos procedimentos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio ou peróxido de hidrogênio alcalino para produção de etanol foram avaliados e comparados, por Rabelo et al. (2007). Os experimentos foram realizados utilizando o bagaço de cana-de-açúcar, pois ele vem de uma fábrica de álcool/açúcar e bagaço, no tamanho, variando de 0,248 a 1,397 mm (12 a 60 mesh). Partículas menores foram desprezadas por conterem principalmente areia. Os testes realizados mostraram que o desempenho da hidrólise de bagaço pré-tratado com peróxido alcalino é melhor para o bagaço não peneirado, quando o açúcar de interesse é a glicose. Considerando a condição de hidrólise enzimática de 65 °C/24 h o rendimento foi de 68 %, no presente trabalho o tempo foi o mesmo utilizado por Rabelo et al., porém a temperatura foi de 50 °C, o rendimento mais próximo da literatura foi do bagaço

50 mesh, 65,37 %.

Monte (2011), estudando sobre a utilização de suco de caule de abacaxi para aumentar a eficiência hidrolítica da enzima no bagaço de cana após um pré-tratamento otimizado com peróxido alcalino. A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi investigada tratando-se um bagaço de peróxido e alcalina com suco de caule de abacaxi, xilanase e celulase. As respostas avaliadas foram o rendimento de celobiose e glicose liberada do bagaço pré-tratado após hidrólise enzimática. Os resultados mostram que a maior conversão enzimática foi obtida para o bagaço usando 2 % de peróxido de hidrogênio a 60° C por 16 h na presença de 0,5 % de sulfato de magnésio. O bagaço (5 %) foi tratado com extrato de caule de abacaxi, que contém misturas de protease e esterase, em combinação com xilanase e celulase. Observou-se que a quantidade de glicose e celobiose liberada do bagaço aumentou com a mistura de enzimas. Acredita-se que as enzimas presentes nos extratos de abacaxi sejam capazes de hidrolisar ligações específicas que facilitem a ação da digestão das enzimas das paredes celulares das plantas. Isso aumenta a quantidade de glicose e outras hexoses que são liberadas durante o tratamento enzimático e também reduz a quantidade de celulase necessária em uma hidrólise típica.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se a metodologia empregada, os resultados obtidos permitem concluir que: a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar tem influência na extração/solubilização de hemicelulose na forma de macromolécula (xilana) e monossacarídeo (xilose). No rendimento em xilana do pré-tratamento alcalino, observou-se que, quanto menor o tamanho da partícula, maior a quantidade de xilana solubilizada. Isso comprova a hipótese deste trabalho, que, menor tamanho de partícula poderia resultar em maior extração de hemicelulose. Considerando como uma característica importante da hemicelulose, todas as amostras apresentaram solubilidade acima de 96 %.

O resíduo rico em celulose do pré-tratamento alcalino, com peróxido de hidrogênio foi caracterizado quanto a sua composição química, observando uma tendência nos valores de glucana, conforme diminuiu o tamanho de partícula, aumentou o teor desse polissacarídeo no bagaço pré-tratado. Já para o material sólido, rico em celulose, resultante do pré-tratamento ácido diluído os valores de glucana não seguiram uma tendência.

A hidrólise enzimática do material pré-tratado em meio alcalino resultou em maior rendimento em glicose para todas as frações/granulometrias estudadas, mostrando tendência em aumento com diminuição da granulometria. Deste modo, um aproveitamento em conjunto da hemicelulose e celulose pode ocorrer com pré-tratamento alcalino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHCHEH, R. K, KUBICEK, C. P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.
- AGUILAR, R., RAMIREZ, J. A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**. v. 55, p. 309-18, 2002.
- ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., ROBERTS, K., SEDEROFF, R. **Plant Cell Walls**. 1 ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, USA, 2011.
- ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In: STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 12 p. 2000.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJO, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ARANTES, T. M. (2009). **Uso de soluções hidrotrópicas na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 145 p. 2009.
- ASSUMPÇÃO, D., CARVALHO, D., ANDRADE, D., Pré-tratamento combinado $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ para obtenção das frações lignocelulósicas do bagaço da cana-de-açúcar. **Rev. Virtual Química XX**, 2016.
- ATALLA, R. H., HACKNEY, J. M., UHLIN, I., et al. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. Int. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15. p. 109-112, 1993.
- AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 24 p. 421-433, 1989.
- BAILEY, M. J. A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29. p. 494-496, 1988.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**., v. 34. p. 551–573, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, n.52, p. 858-875, 2011.
- BENJAMIN Y, CHENG H, GÖRGENS J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**. v. 51. p. 7-18, 2013.
- BENJAMIN, Y., CHENG, H., GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**. v. 51, p. 7-18, 2013.

BIAN, et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, ISSN: 0144-8617, Vol: 88, Issue: 2, p. 638-645, 2012.

BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv**. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Mestrado), 1995.

BOWES, B. G., MAUSETH, J. D. Plant Structure – a Color Guide. **Jones and Bartlett Publishers**. 2 ed. 2008.

BRIENZO, M., SIQUEIRA, A. F. MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46. p. 199-204, 2009.

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

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**, v. 7. p.1454-1465, 2014.

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

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**, v. 84. p. 305-313, 2016.

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**, v. 104. p. 271-280, 2017.

BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, Tallahassee, p.1-17, 2011.

BUCKERIDGE, M., **Etanol: Pesquisa & Desenvolvimento**. 1a Ed. São Paulo: Blücher. 135 p. ISBN 986 -84-213-02314-3, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G.J.M. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 38, p. 1467–1475, 2011.

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

CARPIO, L. G. T.; SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 105, p. 1-798, maio 2017.

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

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química verde no Brasil 2010-2030**. Brasília, 434 p. 2010.

CHANDRA, R. P., BURA, R., MABEE, W.E., BERLIN, A., PAN, X. SADLEER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocelulosics? **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, n.108, p. 67–93. 2007.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 02 maio 2018.

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.

CURRELI, N., FADDA, M. B., RESCIGNO, A., RINALDI, A. C., SODDU, G., SOLLAI, F.; VACCARGIU, S.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 665-670, 1997.

CURVELO, A. A. S. **Processos de deslignificação organossolve**. 1992 .97f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

DENCE, C. W. The determination of lignin. In: LIN, Y.L.; DENCE, C. W. **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin: Ed. Springer, p. 33-62, 1992.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232. n. 333. p. 1–12, 2006.

EVERT, R. F. Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. **John Wiley & Sons**, 2006.

FAN, L. T., LEE, Y. H., GHARPURAY, M. M. The nature of lignocelulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Eng., n.23, p. 157-187, 1982.

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

FANG, J. M., SUN, R. C., SALISBURY, D., et al. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 66. p. 423–432, 1999.

FASANELLA, C. C. (2008). **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 79p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, Berlim, p. 132–181, 1984.

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

FERNANDES, E. S.; ALVES, R. C.; PAGNOCCA, F. C.; CONTIERO, J.; BRIENZO, M. Sugar and ethanol production process from sugarcane. In: Rachel Murphy. (Org.). Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance. 1ed. Nova York: **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 193-216, 2017

FIGUEIREDO, F. C. "Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas." [Dissertação]. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2016.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. **Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica**. Química Nova, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1082-1093, 2017.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GÁMES, F., et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

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

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability: lignin–cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 5, p. 455-465, 2004.

HOFRICHTER M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, p. 454-466, 2002.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylan and their interaction in plant cell walls. **Xylans and Xylanases**, p. 1-15, 1992.

KADLA, J. F., CHANG, H. The reaction of peroxides with lignin and lignin model compounds, In: ARGYROPOULOS, D. S. **Oxidative delignification chemistry: Fundamentals and catalysis**. Washington: Ed. McGill University, American Chemical Society, p. 108-129, 2001.

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

KUMAR, P., BARRET, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, n.48, p.3713-3729, 2009.

LAGAERT, S., BELIËNB, T., VOLCKAERTA, G. “Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes”, **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.20, p. 1064–1073, 2009.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood structure and composition**. New York: Marcel Dekker. 488 p. 1991.

LIU, Z. H.; QIN L.; PANG F.; JIN, M. J.; LI, B. Z.; KANG Y.; DALEC, B. E. YUANA, Y. J. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 176-184, 2013.

MACHADO, D. S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**. Piracicaba, 2009. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/.../11/...0911 2009 .../Denise_Machado.pdf> Acesso em 02 set. 2017.

MANRICH A., KOMESU A, ADRIANO W. S., TARDIOLI P. W., GIORDANO R. L. C. Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment of agarose and chitosan supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161. p. 455-467, 2010.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana- de-açúcar**. 2009. 142 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MAZIERO, P.; JONG, J.; MENDES, F. M.; GONÇALVES, A.R.; EDER, M.; DRIEMEIER, C. Tissue-specific cell wall hydration in sugarcane stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5841–5847, 2013.

MELATI, R. B.; SHMATZ, A.; PAGNOCCA, F. C.; CONTIERO, J.; BRIENZO, M. Sugarcane bagasse: production, composition, properties, and feedstock potential. In: Rachel Murphy. (Org.). Sugarcane: Production systems, uses and economic importance. 1ed. **Nova York: Nova Science Publishers**, v. 1, p. 1-38, 2017.

MENG, X., & RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose

accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current opinion in biotechnology**, v. 27. p. 150-158, 2014.

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

MORAIS, A. P. S. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010.

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

NAIDU, D. S. et al. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28-41, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011

OKAMURA, K. Structure of Cellulose. **In: wood and wood cellulosic chemistry**. 10^a. Marcel Decker Inc, 977p. 1990.

OLIVEIRA, C. A. P. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético diluído em sistema pressurizado**. 123 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia – MG, 2016.

OLIVEIRA, R. A., ROSSELL, C. E. V., MACIEL FILHO, R. Using Hemicellulosic Liquor from Sugarcane Bagasse to Produce Second Generation Lactic Acid. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, v. 4, 2017.

PAN, G. X., BOLTON, J. L., LEARY, G. J. Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46. p.5283–5288, 1988.

PORTAL BRASIL. **Safra 2017/2018 de cana-de-açúcar deve ser de 647 milhões de toneladas**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/04/safra-2017-2018-de-cana-de-acucar-deve-ser-de-647-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

QUERALT, B. P. **Caracterização físico-química do bagaço visando seu aproveitamento energético**; Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Química) - Universidade Federal do ABC, 2014.

QUINELATO, C. Métodos de extração da lignina do bagaço da cana-de-açúcar do noroeste do estado de São Paulo. 95 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP) – São José do Rio Preto, 2016.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de**

hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e gl.** 262p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RASMUSSEN, H.; SORENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, n. 385, p. 45-57, 2014.

RITTER, S. K. Calling All Chemists: **Chemists and chemical engineers will be providing the thousands of technologies needed to achieve a more sustainable world.** 2008, imagem. Disponível em: <<http://cen.acs.org/articles/86/i33/Calling-Chemists.html>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. Bagaço de cana-de-açúcar como potencial **para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico.** São Joaquim da Barra: Iara Coimbra. 25 p. 2008.

SANT'ANNA, C., DE SOUZA, W., BRIENZO, M. The influence of the heterogeneity, physicochemical and structural properties on the recalcitrance and conversion of sugarcane bagasse. **Sugarcane: production, consumption and agricultural management systems**, p. 1-34, 2014.

SANTOS, M. F. R. F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. Biorefinery in brazil: New technological trends adopted by domestic companies. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 5, n. 2, p. 84-90, 2010.

SANTOS, F. A.; de QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol. **Química Nova** (Impresso), v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, V. T. O. **Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana.** Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCALBERT, A. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1359–1362, 1985.

SERIGADO, S. B. **Recuperação de xilanas por processos de separação com membranas** Dissertação Mestrado - Engenharia Química – Técnico Lisboa, 2014.

SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization: current applications in biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., v. 33. p. 33-70, 1995.

SANTOS, V. T. O. **Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana**. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SILVA, D. S. G. **Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual**. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

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

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**, v. 58, p. 9043-9053, 2010.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; & LIANG, S.F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**. v.42, p.111-122, 2000.

SUN, R. C., FANG, J. M., TOMKINSON, J., GENG, Z. C., LIU, J. C. Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 29-39, 2001.

SUN, R. C., TOMKINSON, J. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from what straw. **Carbohydrate polymers**, v. 50, p. 263-271, 2002.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. **Biosource Technology**, n.83(1), p.1-11, 2002.

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

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: **A Review**. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Arned, 4 ed., 2009.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fibre. 3. Improved procedures for analysis on dietary fibre. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 34, p. 330-336, 1986.

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

WINGER, M., CHRISTEN, M., van GUNSTEREN, W.F. On the Conformational Properties of Amylose and Cellulose Oligomers in Solution. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, 2009.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YANG, B., BOUSSAID, A., MANSFIELD, S. D., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77. p. 678–84, 2002.

YUAN, Z. **Sistema para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade de Brasília Instituto de Química. Brasília, 2016.

ZENG, 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 Bioengineering**, v. 97. p. 265-278, 2007.

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

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6. n. 4. p. 465-482, 2012.