
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA LUIZA GARCIA MENOZZI

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NOVOS
CORANTES NA MEDIÇÃO DA
ACESSIBILIDADE À CELULOSE**

ANA LUIZA GARCIA MENOZZI

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NOVOS CORANTES NA MEDIÇÃO
DA ACESSIBILIDADE À CELULOSE

Orientador: Michel Brienzo

Coorientador: Felipe Lange Shimizu

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2019

M547a Menozzi, Ana Luiza Garcia
Avaliação da eficiência de novos corantes na medição da acessibilidade à celulose / Ana Luiza Garcia Menozzi.
-- Rio Claro, 2019
28 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Michel Brienzo

Coorientador: Felipe Lange Shimizu

1. Biomassa. 2. Acessibilidade. 3. Pré-tratamento. 4. Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro: Dados fornecidos pelo autor(a).
Corantes. 5. Celulose. I. Título

Essa ficha não pode ser modificada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Material Lignocelulósico.....	5
2.2. Celulose.....	6
2.3. Acessibilidade.....	7
2.4. Determinação da acessibilidade.....	8
2.5. Pré-tratamentos.....	8
3. OBJETIVO	10
3.1. Objetivos específicos.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. Preparo e moagem da biomassa.....	11
4.2. Pré-tratamento ácido.....	11
4.3. Determinação da acessibilidade à celulose.....	12
4.3.1 Novos corantes.....	12
4.3.2. Corantes Direct Orange e Direct Blue.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1. Determinação de adsorvidade máxima por corantes Direct Orange e Direct Blue.....	13
5.2. Teste com novos corantes.....	14
5.2.1. Amarelo Crepúsculo.....	14
5.2.2. Amarelo Tartrazina	16
5.2.3. Vermelho Allura.....	17
5.2.4. Vermelho Amaranto.....	19
5.2.5. Azul Brilhante.....	21
5.3. Análise com corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranto.....	22
6. CONCLUSÃO	24
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMO

O bagaço e folha de cana-de-açúcar podem ser utilizados na produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Por ser um material lignocelulósico abundante, é muito utilizado em métodos que envolvem o processamento ou extração da celulose, e assim em estudos sobre sua acessibilidade. A acessibilidade à celulose depende de vários fatores, como conteúdo de hemicelulose e lignina, grau de polimerização e cristalinidade. Tal acessibilidade pode ser medida por quantidade de corante adsorvido na superfície exposta da celulose. Os exemplos encontrados na literatura utilizam os corantes Direct Blue e Direct Orange, que se encontram fora de circulação. Este trabalho utiliza de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído para testar cinco novos corantes (Amarelo Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Vermelho Amaranto, Vermelho Allura e Azul Brilhante), avaliando o seu uso na determinação da acessibilidade à celulose. Cada corante foi testado em comprimentos de onda que fornecem sua máxima absorvância e comparado com os resultados apresentados pelos corantes tradicionais. Os corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranto provaram-se os mais adequados para análise de biomassas, enquanto os outros não apresentaram sensibilidade nem afinidade o suficiente para indicar as superfícies expostas da celulose. O aumento na acessibilidade e digestibilidade dos materiais testados foi comprovado pelos corantes Direct Blue e Direct Orange, implicando uma biomassa mais suscetível à conversão em açúcares. Tal conclusão foi ratificada corretamente pelos corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranto, apresentando duas alternativas aos já descontinuados Direct Blue e Orange.

Palavras-chave: biomassa, cana-de-açúcar, pré-tratamento ácido, corantes, acessibilidade, celulose, digestibilidade, açúcares.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre os materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) é uma abundante biomassa gerada pela atividade agrícola, principalmente nos países tropicais. Cerca de 585 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram geradas em 2018 no Brasil (UNICA, 2018). Seu papel na agroindústria o coloca como alternativa na produção de biocombustíveis e outros produtos de maior valor agregado (ADSUL et al., 2004). O bagaço de cana-de-açúcar é constituído em sua maioria por celulose, hemicelulose e lignina, que estão organizados na parede celular vegetal. A presença de hemicelulose e lignina na matriz lignocelulósica torna mais difícil a degradação da biomassa e diminui a acessibilidade à celulose; a essa resistência damos o nome de recalcitrância (ZHAO et al., 2012). A lignina confere rigidez ao vegetal, o que colabora em sua integridade estrutural (MIEDES et al., 2014). A hemicelulose, por sua vez, está intimamente associada à celulose por ligações de hidrogênio (FREUDENBERG, 1965). Propriedades pertencentes à celulose também podem influenciar a acessibilidade. Tais propriedades são: cristalinidade e alto grau de polimerização (NADERI, 2017).

Moagem e pré-tratamentos são capazes de alterar as características da biomassa e aumentar a acessibilidade à celulose (TAHERZADEH et al., 2008). O pré-tratamento ácido remove a hemicelulose do material e aumenta a superfície exposta da celulose (BRIENZO et al., 2017). Corantes como Direct Blue e Direct Orange são utilizados para avaliar a superfície exposta da celulose, servindo de parâmetro para verificar sua acessibilidade (CHANDRA et al., 2008). A fim de testar novos corantes (amarelo tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho amaranto, vermelho allura e azul brilhante) para esse fim, amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar foram moídas e pré-tratadas com ácido para alterar sua estrutura e permitir avaliar a eficácia dos novos corantes.

Encontrar métodos novos de se utilizar a biomassa é essencial em um contexto com combustíveis fósseis que poluem o ambiente e que são encontrados no planeta em quantidades limitadas, e, portanto, não são renováveis. Avaliar a acessibilidade à celulose nesses materiais permite apontar quais são promissores na produção de insumos de valor agregado e biocombustíveis e quais metodologias são mais eficientes na manipulação dessa biomassa.

Além disso, os corantes Direct Blue e Direct Orange, muito utilizados nessa área por sua eficiência, não são mais fabricados. Isso torna o necessário o uso de corantes alternativos. Os corantes alimentícios que foram testados neste trabalho podem fornecer substitutos, além de não serem tão tóxicos ao meio ambiente quanto os corantes têxteis anteriormente utilizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Material lignocelulósico

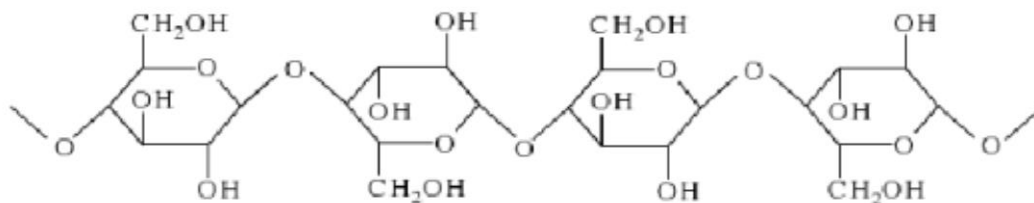
Uma matéria prima que demonstra grande potencial na produção de bioetanol é a biomassa lignocelulósica, não somente pelo baixo custo, mas pela abundância com que pode ser obtida (BROWN et al., 2017). Contudo, antes que possa ser utilizada em grande escala, é necessário que se resolvam certos desafios tecnológicos. Composta principalmente de celulose, que pode constituir de 30% a 40% de suas paredes celulares, esta biomassa também possui hemicelulose, extrativos, cinzas e lignina (MENG et al., 2014;). As macromoléculas de lignina são constituídas de compostos polifenólicos, organizados em uma estrutura tridimensional, responsável por reter polissacarídeos nas paredes celulares de vegetais. As hemiceluloses, por sua vez, são polissacarídeos amorfos, heterogêneos e ramificados, de recalcitrância baixa quando comparada com a lignina (DAVISON et al., 2013). Todavia, por estarem bastante organizadas na parede celular, essas macromoléculas conferem alta recalcitrância à biomassa como um todo (SANT'ANNA et al., 2014).

Dentre os países com grande produção de etanol e açúcar está o Brasil. Durante essa produção, a cana-de-açúcar passa por um processo de extração da sacarose, que gera resíduos como o bagaço (BEZERRA et al., 2016). Por esse motivo, a alternativa de utilizar as grandes quantidades de resíduos para produzir combustíveis e outros produtos se torna extremamente benéfica, tanto economicamente quanto ambientalmente (MORENO et al., 2017). No entanto, uma grande dificuldade em se usar esses materiais para a produção de etanol e outros produtos de valor agregado está na morfologia e estrutura química da biomassa lignocelulósica, que a permite proteger seus carboidratos contra micro-organismos e suas enzimas. A essa resistência à ação de micro-organismos e agentes químicos se dá o nome de recalcitrância (ZHAO et al., 2012). Mesmo após passar por pré-tratamentos, materiais lignocelulósicos requerem em torno de cem vezes mais enzima do que o amido para realizar a sacarificação (VINZANT et al., 2005).

2.2 Celulose

A celulose, que provém a estrutura presente em todas as plantas, é um carboidrato fibrilar (BRETT, 2000) encontrado em grande abundância ao redor do mundo. Sua biossíntese pode chegar a milhares de toneladas anuais (KUKRETY et al., 2017). A estrutura compacta característica da celulose se deve à formação de uma rede rígida por suas moléculas (KÖPCKE, 2008). Na parede celular da planta, a celulose está organizada na forma de microfibrilas longas e ordenadas, que geram fibras extensas (SOMERVILLE, 2006). Encontra-se associada a outros compostos como a hemicelulose, lignina, pectina e proteínas (DAVISON et al., 2013). Geralmente, moléculas de hemicelulose são responsáveis por estruturar as fibras de celulose, enquanto a lignina se responsabiliza por preencher os espaços entre polissacarídeos (PAGE, 1976). A cristalinidade é uma importante propriedade da celulose (CALIARI et al., 2017), que possui regiões amorfas e cristalinas com características diversas. Essas regiões cristalinas são constituídas por microfibrilas, que são arranjos paracristalinos de dezenas de cadeias de (1,4) β -D-glicose conectadas por ligações de hidrogênio ao longo de seu comprimento, o que forma uma cadeia de glicose mais organizada em comparação com as áreas amorfas (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). O que origina as regiões cristalinas são a presença das ligações de hidrogênio. São também as regiões mais recalcitrantes, pois aumentam a resistência à digestibilidade da celulose (ZHU et al., 2010). Sendo um carboidrato composto por unidades de glicose, o número de unidades na cadeia da molécula de celulose é conhecido como grau de polimerização (EVANS et al., 1989). Altos graus de polimerização dificultam a ação de enzimas celulolíticas e oferecem uma estrutura mais resistente e maior (ZHAO et al., 2012). A celulose é utilizada para as mais diversas finalidades, como a produção de biocombustíveis, produção de fibras, filmes, plásticos, cosméticos, tintas, adesivos, aglomerados de madeira, na indústria alimentícia, revestimentos e nano materiais (GUERRIERO et al., 2016).

Figura 1: Segmento de uma cadeia de celulose.



Fonte: O'Sullivan, 1997

2.3 Acessibilidade

A conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol e produtos de alto valor agregado é influenciada por muitos fatores, dentre eles pode-se citar a acessibilidade à celulose para a hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2015; diversas referencias), e o custo elevado das tecnologias utilizadas nesses processos de conversão. A acessibilidade pode aumentar ou diminuir de acordo com a características do próprio substrato, como o grau de polimerização, a cristalinidade e a heterogeneidade estrutural, que causa a existência de estruturas mais recalcitrantes ou mesmo inacessíveis (CHANDRA et al., 2008). O acesso limitado à grande parte da celulose é um dos maiores desafios a serem superados, uma vez que ela se encontra protegida por um conjunto de microfibrilas bastante rígidas e organizadas (ARANTES et al., 2010). A presença de hemicelulose e lignina também influenciam na acessibilidade à celulose, pois alteram a distribuição de poros e a eficácia de pré-tratamentos ou componentes enzimáticos (ESTEGHLALIAN et al., 2001).

Substratos heterogêneos e porosos, como os materiais lignocelulósicos, tem sua área superficial dividida entre interna e externa, na qual cada uma tem afinidades distintas (CHANDRA et al., 2008). Acessibilidade da superfície interna pode ser medida pelas aberturas superficiais, fendas internas e espaços vazios, que são formados pela retirada de compostos não celulósicos, como a hemicelulose e a lignina da parede celular. Essa retirada é causada por pré-tratamentos que utilizam diferentes métodos como ácido diluído, alcalino peróxido, explosão à vapor, entre outros (STONE et al., 1965). As moléculas da hemicelulose agem como barreiras físicas que dificultam a hidrólise enzimática pois estão agrupadas, tanto envoltas quanto entre as microfibrilas de celulose contida nas paredes celulares secundárias (ZHU et al., 2010). Por tal fato,

quando se trata de acessibilidade à celulose, alguns autores consideram a remoção da hemicelulose mais relevante que a retirada da lignina no material (LEU et al., 2013).

Um grau de polimerização baixo resulta em mais sítios de ligação para enzimas celulases, o que facilita a hidrólise. Contudo, a celulose tem que estar acessível para enzimas possam entrar em ação. Mudanças no grau de polimerização estão sempre acompanhadas por alterações na porosidade e cristalinidade do substrato devido à moagem pelo qual a biomassa passa, que encurta suas fibras e aumenta significativamente sua porosidade (ZHAO et al., 2012). A despolimerização, por sua vez, é o processo no qual os polissacarídeos se convertem em monômeros ou em uma mistura de monômeros (JENKINS et al., 1996).

2.4 Determinação da acessibilidade

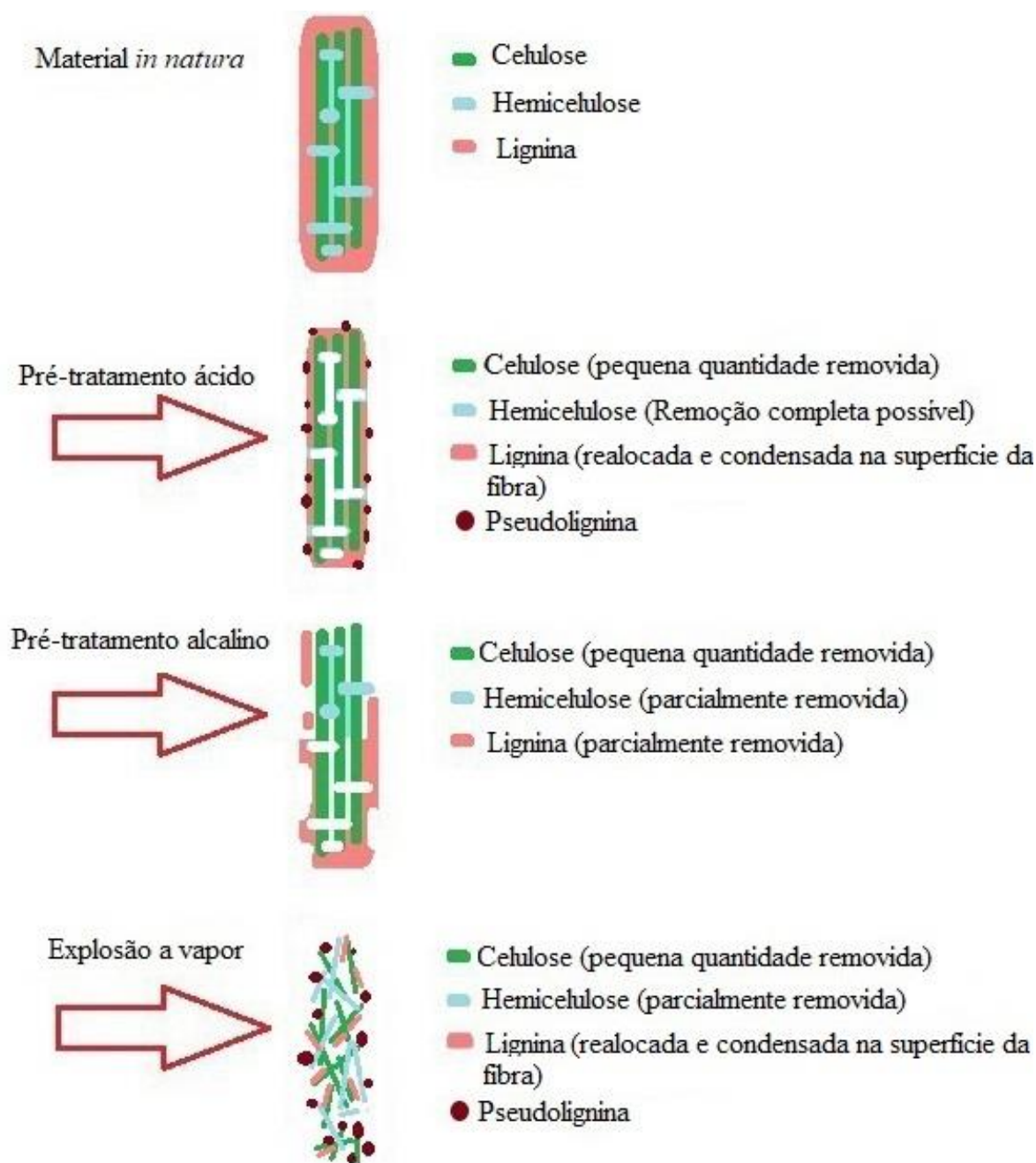
Diversos métodos podem ser aplicados para avaliar a acessibilidade à celulose em materiais lignocelulósicos. O método Simons' Stain utiliza corantes com o objetivo de medir o dano microscópico sofrido pelas fibras dos materiais lignocelulósicos após a moagem (SIMONS, 1950). É empregada uma mistura dos corantes Direct Blue 1 e Direct Orange 15, pois as moléculas de Direct Blue apresentam massa molecular baixa e não possui afinidade pela celulose, ocupando assim os poros menores da fibra, enquanto o Direct Orange apresenta massa molecular maior e afinidade grande com a celulose, por isso adsorve na superfície externa do material (CHANDRA et al., 2008). Foi apontado através de experimentos que aumentar o tamanho dos poros de materiais lignocelulósicos através de ações biológicas ou físicas resultam no ganho de acesso do corante Direct Orange aos poros alargados, o que remove o Direct Blue, devido a sua maior afinidade com os grupos hidroxila da celulose (YU et al., 1995). Tal método provou eficiência em comparar a acessibilidade relativa em amostras de celulose que sofreram por diferentes tratamentos (ESTEGHLALIAN et al., 2001).

2.5 Pré-tratamentos

Materiais lignocelulósicos apresentam partículas grandes, que são geralmente inadequadas para etapas de pré-tratamento. Além disso, diversos tipos de moagem podem ser usados, tanto como uma etapa anterior ao pré-tratamento quanto como método de pré-tratamento, pois tem a capacidade de aumentar a eficácia da hidrólise enzimática (TAHERZADEH et al., 2008). No entanto, métodos que causam tal efeito são considerados invariáveis, porque consomem muita energia e geram alto custo. Com

isso, o material lignocelulósico é moído com a intenção de aumentar a superfície de contato e reduzir o tamanho de suas partículas. Essa redução na organização das fibras da celulose é bastante desejável (DA SILVA et al., 2013) pois diminuiria a recalcitrância do material. Os moinhos de bolas, que utilizam esferas de diversos materiais e tamanhos para produzir material em pó devido aos cortes e impactos gerados na biomassa (LIN et al., 2010), e os moinhos de discos, que usam chapas serradas com sulcos ou pontas para esmagar e desestruturar a biomassa (HIDENO et al., 2009), são os mais utilizados nos processos de moagem. O pré-tratamento ácido geralmente usa ácido sulfúrico em temperaturas de até 150° C e pressões que chegam a 10 atm (SUN et al., 2002). Embora a celulose seja resistente ao pré-tratamento ácido, podem ocorrer perdas de 2 % a 20% de celulose dependendo da intensidade do processo e dos fatores envolvidos, como temperatura, tempo de reação e concentração de ácido (TRAJANO et al., 2013). Essa perda acontece principalmente em sua fração amorfa. São altas temperaturas, longos períodos de reação e pH bastante baixo para realmente afetar o material devido à natureza cristalina da celulose. Contudo, em condições que são favoráveis à hidrólise ácida da celulose, que atingem a fração cristalina, há degradação da glicose gerada em hidroximetil furfural, ácido fórmico e levulínico (FITZPATRICK, 2002).

Figura 2: Consequências dos diferentes pré-tratamentos em relação à estrutura e composição química de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de MELATI, et al., 2019

3. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar os corantes Amarelo Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Vermelho Amaranto, Vermelho Allura e Azul Brillhante na determinação da acessibilidade da celulose. Foram utilizadas amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar pré-tratadas com ácido diluído.

3.1 Objetivos específicos

- Moer e pré-tratar com ácido diluído amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar para remover hemicelulose e alterar o material a fim de aumentar acessibilidade à celulose;
- Avaliar aumento de acessibilidade utilizando os novos corantes (amarelo tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho amaranto, vermelho allura e azul brilhante), verificando quais adsorvem à biomassa e apresentam diferenças entre amostras pré-tratadas e em *in natura*;
- Utilizar corantes Direct Blue e Direct Orange para avaliar acessibilidade e comparar os novos corantes com os métodos atuais encontrados na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo e moagem da biomassa

O bagaço e folha de cana-de-açúcar foram moídos em moinho de facas e selecionados por peneiras de 20 mesh. O material foi armazenado em estufas a 60 °C, para que mantivesse o nível de umidade baixo.

4.2. Pré-tratamento ácido

As amostras de cana-de-açúcar (bagaço e folha) foram submetidas a diferentes condições de pré-tratamento com ácido diluído (H₂SO₄) (ZHANG et al., 2015). A quantidade de material utilizado foi de 20 g e a reação foi realizada em frascos de 500 mL, com volume reacional de 200 mL, adicionando-se as concentrações de ácido 5 e 25 % (m/m, massa de ácido por massa de material).

Os frascos foram então autoclavados a 121°C por 30 min (BRIENZO et al., 2014). Após esfriar, o material foi filtrado em papel de filtro. A fração sólida foi lavada até o pH da água de lavagem atingir o pH da água destilada (4,5 a 5). O material foi seco em estufa a 60°C e armazenado em frascos plásticos. O experimento foi feito em duplicata.

4.3. Determinação da acessibilidade à celulose

4.3.1. Novos corantes

Soluções de cada um dos corantes (amarelo tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho amaranto, vermelho allura e azul brilhante) foram preparadas em concentrações de 10 mg/mL. Volumes de 1,0 mL de cada corante e 0,5 mL de solução tampão pH 6, 0,3 M Na₃PO₄ foram adicionados a 50 mg de bagaço e 50 mg de folha, que passaram por períodos de 24 horas a 70 °C em shaker a 150 rpm. Feitos em duplicata.

Os corantes que apresentaram as tendências desejadas foram novamente testados em triplicata para confirmar que o comportamento continuaria sendo o mesmo após os primeiros testes. Após centrifugação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a fim de avaliar a quantidade de corante adsorvido na fibra, indiretamente determinado pela diferença da concentração inicial e final de corante no sobrenadante. Os comprimentos de onda utilizados para cada corante foram:

- Amarelo tartrazina: 420 nm;
- Amarelo crepúsculo: 480 nm;
- Vermelho amaranto: 520 nm;
- Vermelho allura: 490 nm;
- Azul brilhante: 630 nm.

4.3.2. Corantes Direct Orange e Direct Blue

A quantidade de corante adsorvido nas fibras (SIMONS, 1950) foi determinada pela adição de 50 mg (massa seca) das amostras pré-tratadas em seis tubos de centrifuga de 15 mL; e 0,5 mL de solução tampão fosfato salina (pH 6, 0,3 M PO₄, 1,4 mM NaCl) em cada tubo. A solução Direct Orange (DO) (10 mg/mL) foi adicionada em diferentes volumes (0,06, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75, 1,0 mL) nos tubos contendo amostras (CHANDRA et al., 2008). A solução Direct Blue (DB) (10 mg/mL) também foi adicionada a cada tubo da mesma forma, para obter no final um conjunto de tubos com uma mistura 1:1 de corantes DO e DB em diferentes concentrações.

Os tubos foram preenchidos com água destilada em um volume final de 5 mL e foram mantidos a 70°C por 6h e agitação de 120 rpm. Os tubos foram centrifugados a

10.000 rpm por 5 min e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para leitura de absorvância em espectrofotômetro a 624 e 455 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de adsorvidade máxima por corantes Direct Orange e Direct Blue

A superfície exposta interna da celulose é determinada pelo corante Direct Blue e a externa pelo corante Direct Orange, respectivamente (CHANDRA et al., 2008). Esses corantes são amplamente utilizados na literatura e seu propósito foi confirmar que os materiais utilizados realmente tiveram sua acessibilidade aumentada por pré-tratamento. Dessa forma, os novos corantes puderam ser testados em materiais onde sua capacidade de análise seria aparente (Tabela 1). Amostras de bagaço *in natura* apresentaram adsorção total (soma de ambos corantes adsorvidos) de 125,7 mg/g. Após pré-tratamento ácido 5%, a adsorção aumentou para 243,3 mg/g. Condições de pré-tratamento com ácido 25% geraram material com adsorção corante de 714 mg/g. Mostrando a mesma tendência, a folha *in natura* apresentou adsorção de 121,6 mg/g. Pré-tratamento ácido em condições de 5% de ácido gerou material com adsorção de 167,6 mg/g adsorvidos. Pré-tratamento em condição com maior concentração de ácido 25%, gerou material com adsorção de corante de 671,8 mg/g.

Tabela 1: Máxima adsorção dos corantes Direct Orange e Direct Blue em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar após diferentes condições de pré-tratamento ácido (5 e 25 %, m/m).

Amostra	Adsorvidade máxima DO (mg/g)	Adsorvidade máxima DB (mg/g)	Razão (DB/DO)	Total (mg/g)
Bagaço <i>in natura</i>	65,8	59,9	0,9	125,7
Bagaço ácido 5%	126,7	107,6	0,8	234,3
Bagaço ácido 25%	513,0	201,0	0,4	714,0
Folha <i>in natura</i>	69,6	52,0	0,7	121,6
Folha ácido 5%	88,6	79,0	0,9	167,6
Folha ácido 25%	472,1	199,7	0,4	671,8

Total: soma das adsorções dos corantes DO e DB;

DO: Direct Orange;

DB: Direct Blue.

Tanto o bagaço quanto a folha de cana-de-açúcar tiveram sua constituição alterada, resultando em maior adsorção de corantes e confirmando aumento de acessibilidade (BRIENZO et al., 2017). Essas alterações permitiram que o corante Direct Orange seja melhor adsorvido por ambas as superfícies (interna e externa) expostas da celulose. O corante Direct Blue tem afinidade menor pela celulose e

tamanho reduzido, sendo menor que o Direct Orange e adentrando regiões da superfície exposta da celulose onde o Direct Orange pode não chegar (YU et al., 1995). Dessa forma, a acessibilidade pode ser medida não só pela adsorção total, mas também pela maior quantidade de Direct Orange adsorvida em relação a quantidade de Direct Blue adsorvido, significando aumento da superfície externa, onde as enzimas conseguem agir de forma mais efetiva (MENG et al., 2014). Tal comportamento é representado pela diminuição da razão (DB/DO), que acompanha o aumento de acessibilidade.

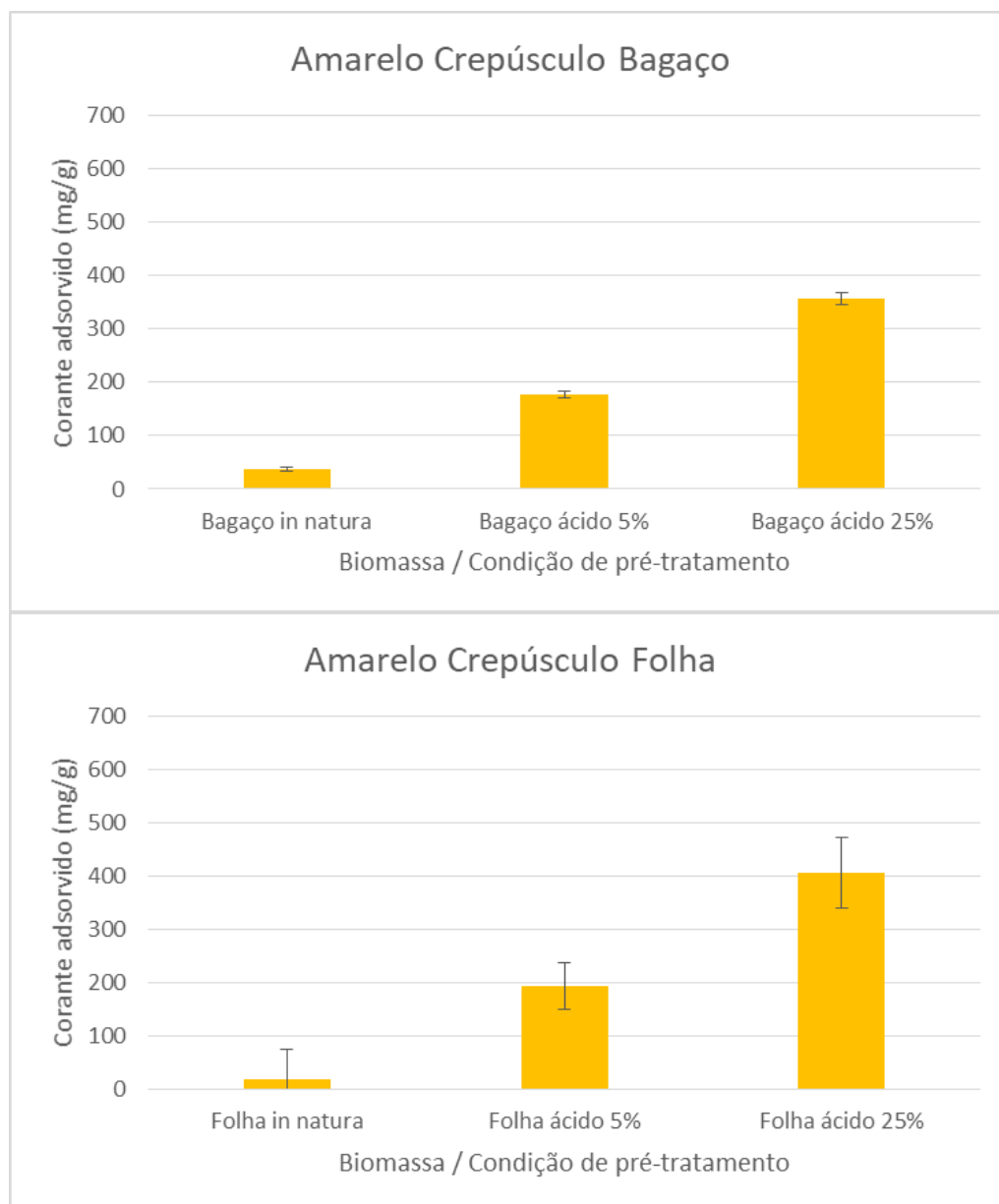
5.2. Testes com novos corantes

Os corantes alimentícios Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Vermelho Allura, Vermelho Amaranto e Azul Brillhante foram testados para averiguar sua afinidade pela celulose e sua sensibilidade ao aumento de acessibilidade. Os corantes Direct Blue e Direct Orange não são mais fabricados, tornando os testes para se encontrar substitutos uma necessidade imediata.

5.2.1. Amarelo Crepúsculo

Amostras de bagaço *in natura* adsorveram 37,4 mg/g de Amarelo Crepúsculo (Figura 3). Após pré-tratamento em condições de ácido 5%, o material pré-tratado apresentou adsorção de corante de 177,1 mg/g. Condições de pré-tratamento com ácido 25% geraram material com adsorção de corante de 357,5 mg/g em amostras de bagaço de cana-de-açúcar. A folha *in natura* apresentou adsorção de corante Amarelo Crepúsculo de 19,9 mg/g. Pré-tratamento com ácido 5% gerou amostras com adsorção de 192,6 mg/g e, após condições severas de ácido 25%, adsorveu 406 mg/g.

Figura 3: Adsorção do corante Amarelo Crepúsculo (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).

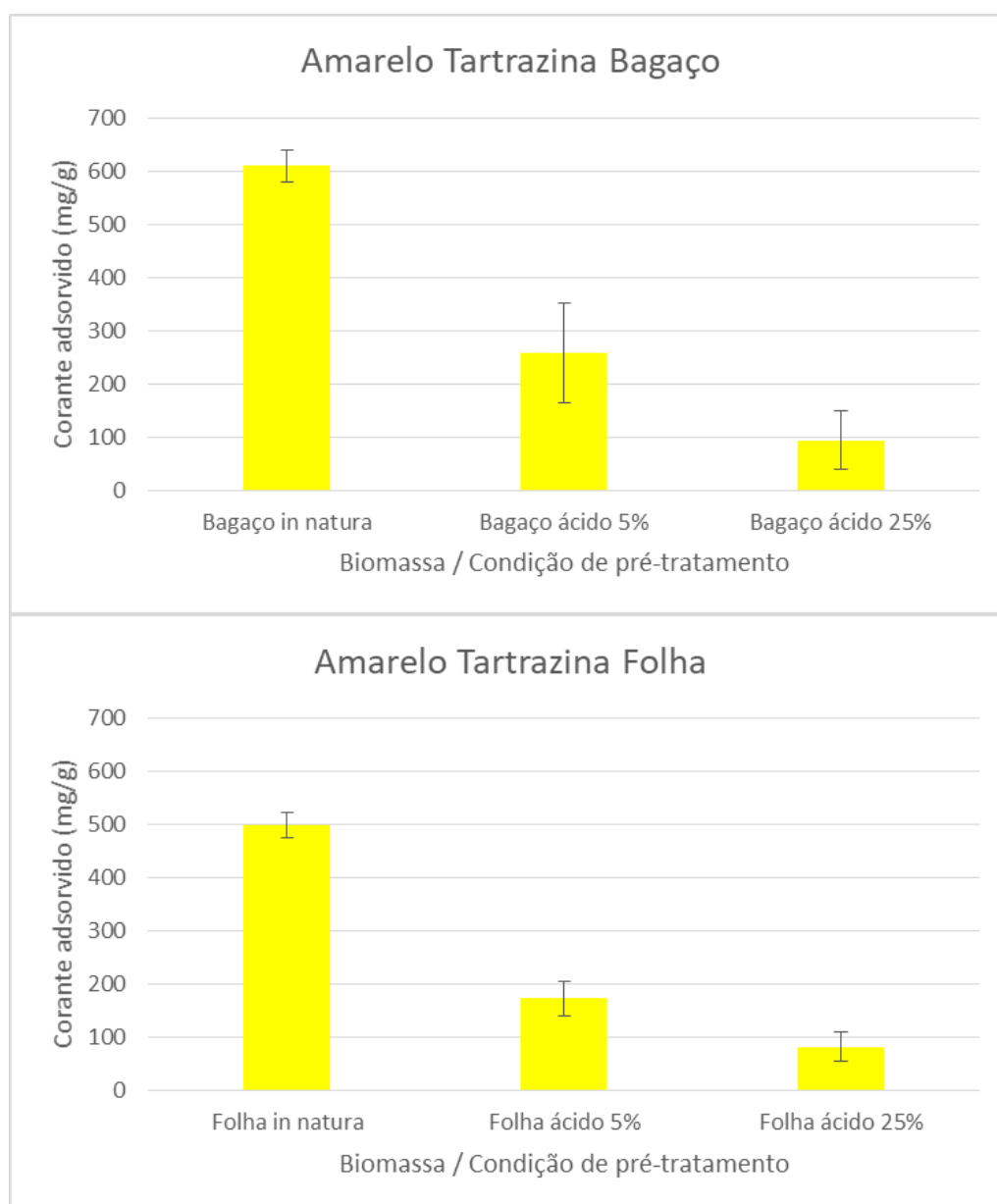


Apesar de não apresentar valores altos de adsorção, o corante Amarelo Crepúsculo mostrou-se sensível ao aumento de acessibilidade. Os baixos valores podem significar que não há grande afinidade do corante pela celulose exposta, porém foi suficiente para diferenciar qual amostra possui maiores regiões expostas à adsorção de corantes ou para outros fins.

5.2.2. Amarelo Tartrazina

Amostras de bagaço *in natura* mostraram adsorção de 609,7 mg/g com corante Amarelo Tartrazina (Figura 4). Após pré-tratamento em condições de ácido 5%, atingiu adsorção de 258,6 mg/g. Após condições de ácido 25%, a adsorção cai para 93,7 mg/g. Amostras de folha *in natura* apresentaram adsorção de 499,1 mg/g. Condições de ácido 5% mostraram queda na adsorção para 173,2 mg/g. Após pré-tratamento com ácido 25%, nova queda para 82 mg/g.

Figura 4: Adsorção do corante Amarelo Crepúsculo (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).

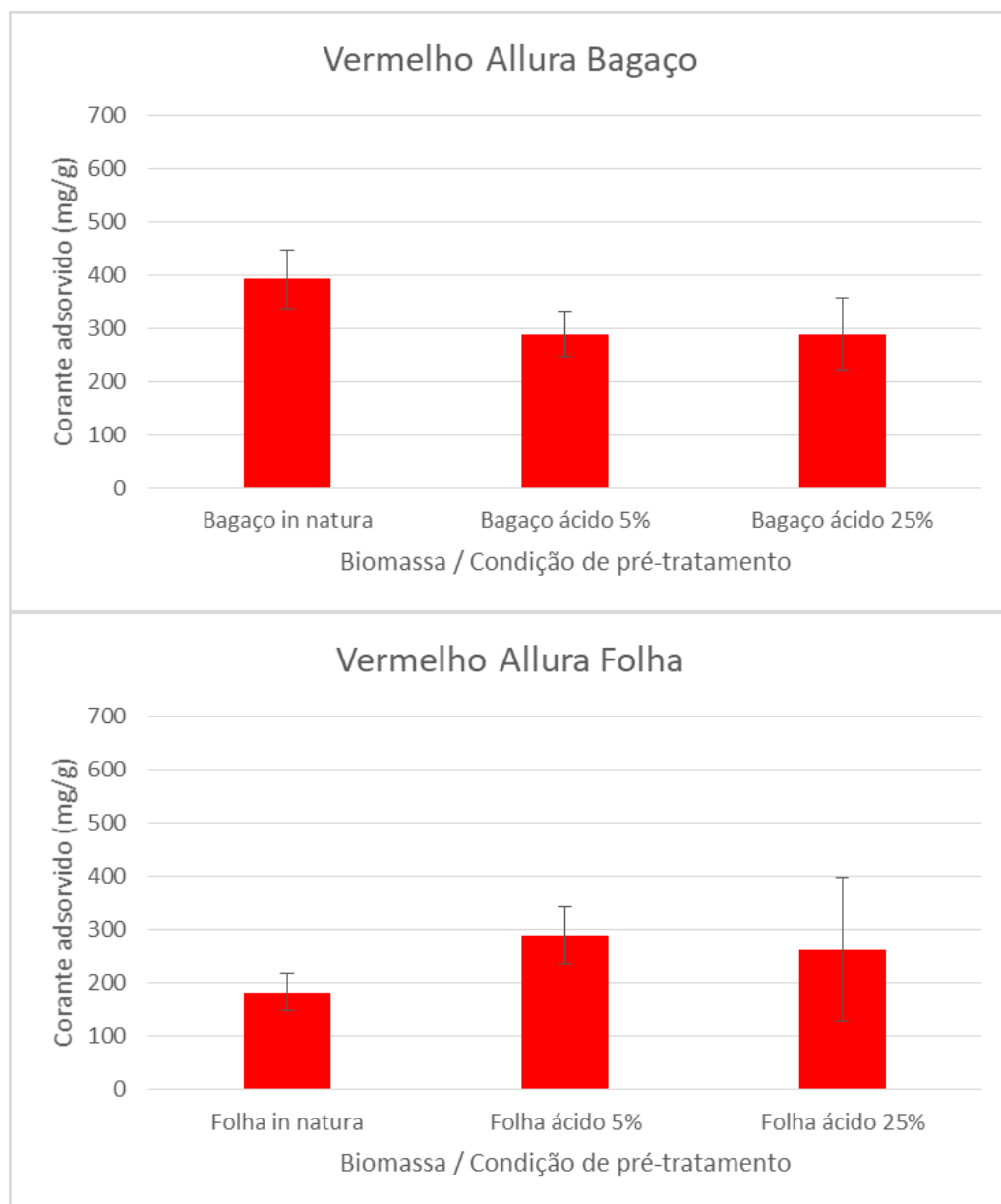


Diferentemente do corante Amarelo Crepúsculo, o Amarelo Tartrazina mostrou menor adsorção em materiais com maior acessibilidade. Tal característica dificultaria muito sua utilização em análises e não possui a mesma função dos corantes Direct Orange e Direct Blue. Porém, a diminuição apresentada pode ser usada como outro tipo de indicador ainda não explorado.

5.2.3. Vermelho Allura

Observou-se adsorção de 392,4 mg/g de corante Vermelho Allura em amostras de bagaço *in natura* (Figura 5). Condições de pré-tratamento ácido 5% geraram adsorção de 289 mg/g e, condições mais severas de 25%, 289,6 mg/g. Amostras de folha de cana-de-açúcar *in natura* mostraram adsorção de 182,9 mg/g. Após condições de ácido 5%, a adsorção sobe para 290 mg/g. Por fim, condições de pré-tratamento ácido 25% apresentaram amostras com 262,4 mg/g de corante adsorvido.

Figura 5: Adsorção do corante Vermelho Allura (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).

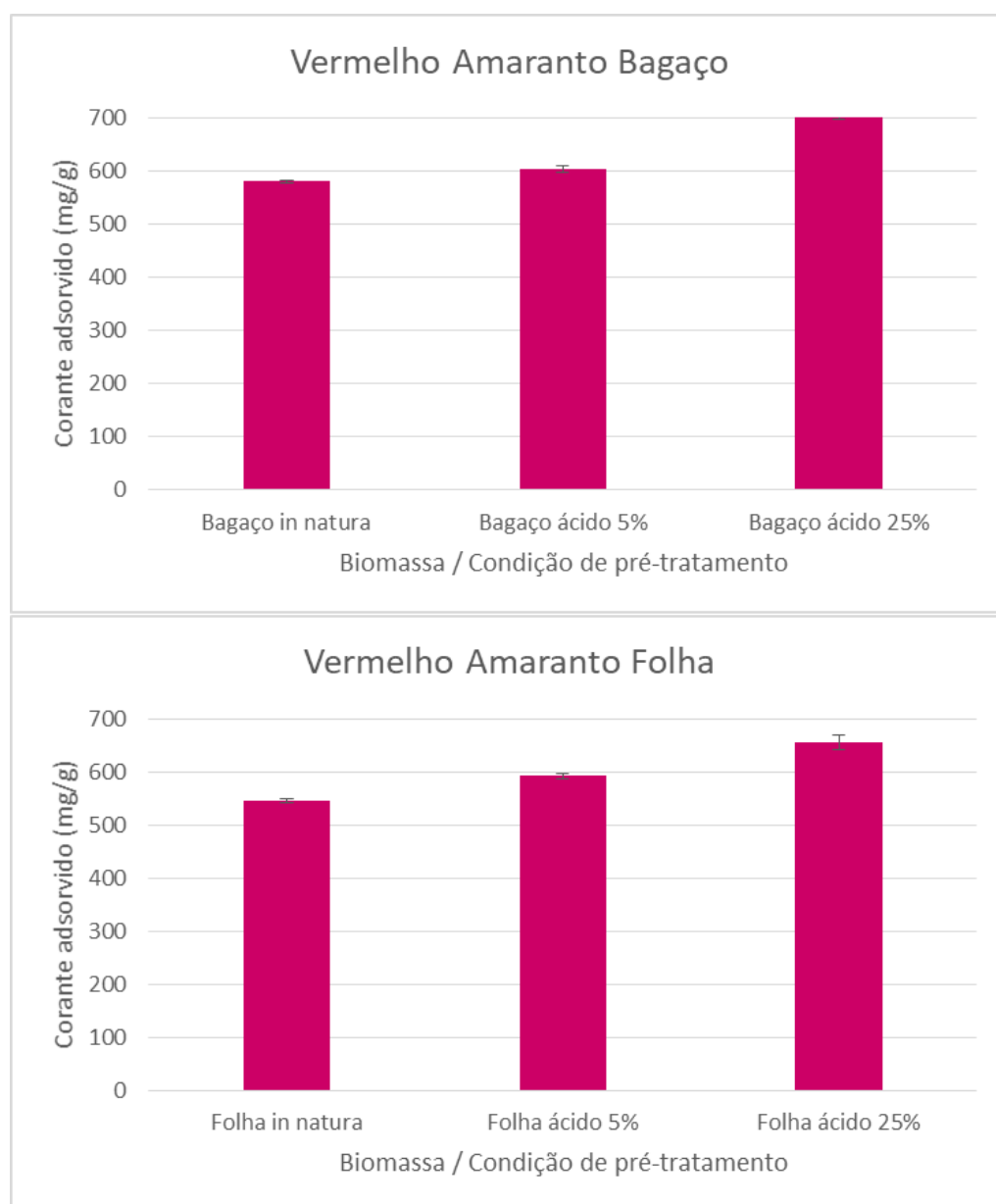


O corante Vermelho Allura mostrou valores de adsorção muito próximos e não relacionados à acessibilidade do material. Além disso, não apresentou grande afinidade pela superfície exposta da celulose. Não há potencial de análise aparente em relação a biomassa lignocelulósica, tanto para afinidade quanto para sensibilidade ao avaliar acessibilidade.

5.2.4. Vermelho Amaranto

O bagaço *in natura* adsorveu 580,6 mg/g de corante Vermelho Amaranto (Figura 6). Condições de ácido 5% elevaram a adsorção para 603,9 mg/g. Pré-tratamento ácido em condições severas de 25% apresentaram 700,9 mg/g de Vermelho Amaranto adsorvido. Amostras de folha *in natura* apresentaram adsorção de 545,7 mg/g. Adsorção de 592,2 mg/g foi obtida após pré-tratamento com ácido 5%. Condições de pré-tratamento ácido 25% geraram amostras de folha com 654,3 mg/g de Vermelho Amaranto adsorvido.

Figura 6: Adsorção do corante Vermelho Allura (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).

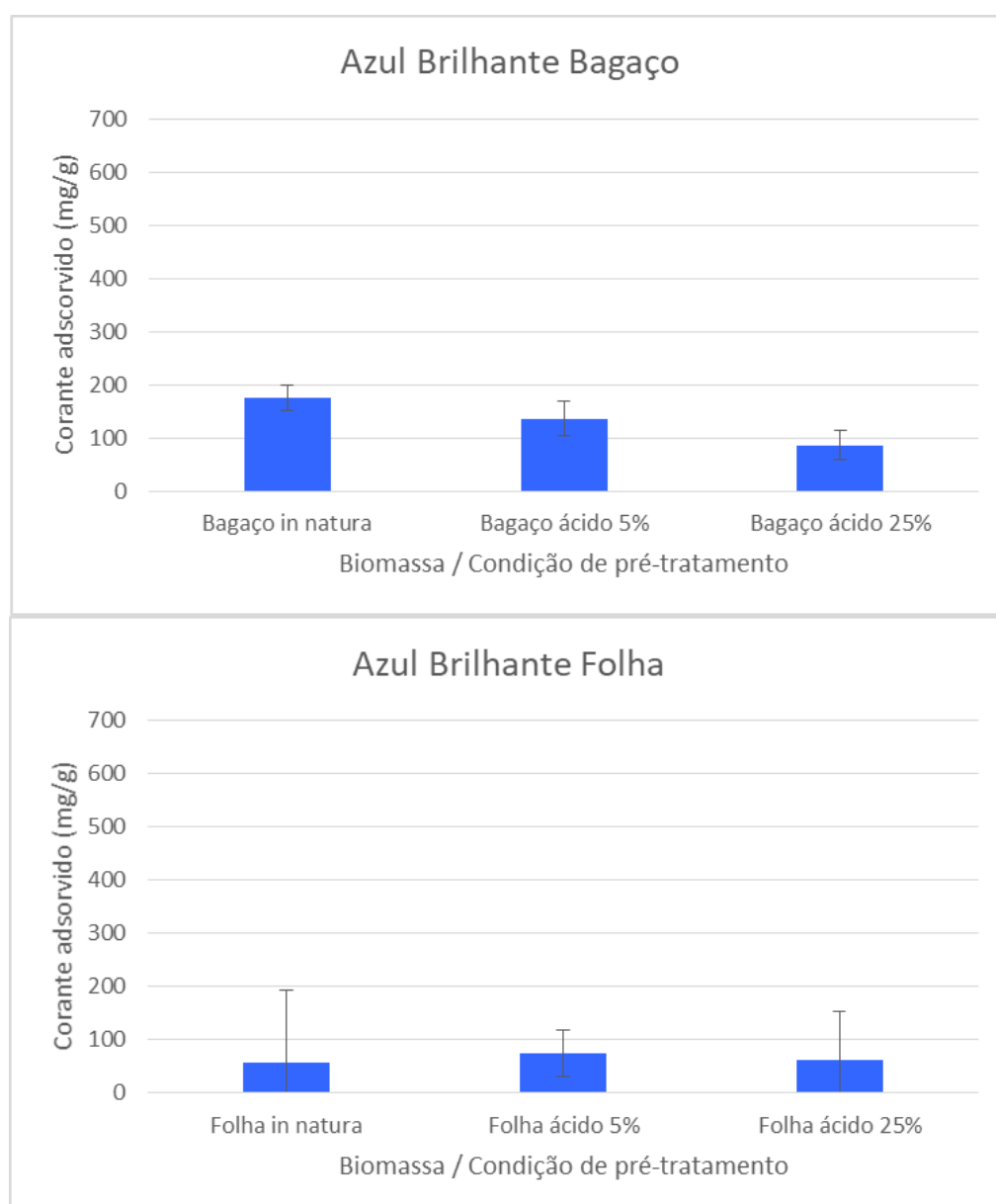


O corante Vermelho Amaranato apresentou maior afinidade pela celulose exposta, representada pelos maiores valores de adsorção apresentados. Além disso, mostrou ligeira sensibilidade ao aumento de acessibilidade. Junto ao corante Amarelo Crepúsculo, mostrou potencial para analisar amostras de biomassa lignocelulósica. Ao contrário do amarelo, esse corante demonstrou alta afinidade e baixa sensibilidade a acessibilidade.

5.2.5. Azul Brillhante

Amostras de bagaço *in natura* adsorveram 175,1 mg/g de corante Azul Brillhante (Figura 7). Condições de ácido 5% geraram amostras com adsorção de 136,3 mg/g. Por fim, condições severas de pré-tratamento ácido 25% apresentaram 85,9 mg/g adsorvidos. Folha de cana-de-açúcar *in natura* adsorveu 56,8 mg/g de corante. Pré-tratamento com ácido 5% apresentou adsorção de 74,3 mg/g. Condições severas de 25% geraram amostras com 60,7 mg/g de corante adsorvido.

Figura 7: Adsorção do corante Azul Brillhante (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).



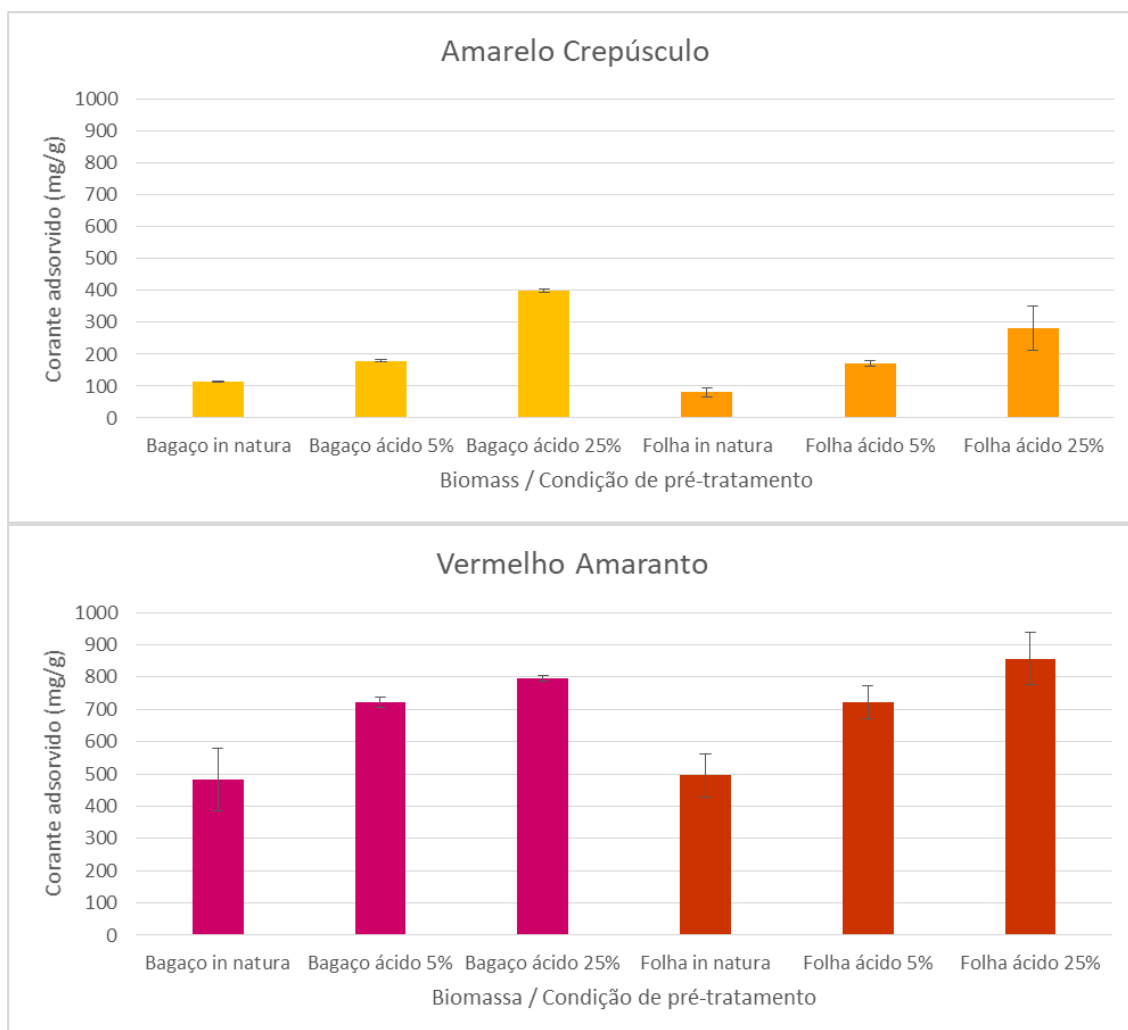
O corante Azul Brillhante demonstrou baixa afinidade pela celulose e nenhuma sensibilidade ao aumento de acessibilidade nas amostras. Possui os menores valores de adsorção dentre os corantes testados e não mostra capacidade de análise em materiais lignocelulósicos. Além disso, mesmo em concentrações de 10 mg/mL se mostra muito concentrado e necessita de maiores diluições para ser utilizado.

5.3. Análise com corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranato

Ambos corantes mostraram resultados positivos em relação às suas capacidades de análise em materiais lignocelulósicos. A fim de comprovar se essa tendência persistiria, mais ensaios em triplicata foram realizados apenas com os corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranato (Figura 8). Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* mostrou adsorção de 114 mg/g do corante Amarelo Crepúsculo. Condições de 5% e 25% geraram adsorções de 180 mg/g e 400,2 mg/g respectivamente. Para a folha, o material *in natura* adsorveu 81 mg/g de corante Amarelo Crepúsculo. Condições de ácido 5% geraram adsorção de 172,23 mg/g e condições de ácido 25% apresentaram 280,9 mg/g.

O corante Vermelho Amaranato gerou amostras de bagaço *in natura* com adsorção de 483,6 mg/g. Após condições de ácido 5%, o bagaço adsorveu 722,2 mg/g de corante. Condições severas de ácido 25% apresentaram adsorção de 796,9 mg/g. Folha *in natura* adsorveu 496,2 mg/g de corante Vermelho Amaranato. Pré-tratamento com ácido 5% mostrou adsorção de 731,1 mg/g. Com condições de ácido 25% obtiveram adsorção de 857 mg/g.

Figura 8: Adsorção dos corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranço (mg/g) em amostras de bagaço e folha de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento ácido em diferentes concentrações (5 e 25 % m/m, a 121°C/30 min).



Os testes com estes corantes ratificaram seu potencial para análises em biomassas lignocelulósicas. Ainda se utilizam dos corantes Direct Blue e Direct Orange para as análises, mesmo com o fato de terem saído de linha (SHIMIZU et al., 2018). Isso se dá pela grande capacidade desses corantes de detectar aumento na acessibilidade. O aumento na adsorção ou a diferença de adsorção entre amostras aponta para um material mais suscetível à conversão em açúcares fermentáveis (BRIENZO et al., 2017; CHANDRA et al., 2008). Os corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranço possuem as duas características necessárias para a análise de acessibilidade: afinidade pela superfície exposta da celulose e sensibilidade ao aumento na

acessibilidade. Essas qualidades são usadas para indicar se a biomassa será facilmente convertida em açúcares ou não, apontando sua digestibilidade (facilidade de acesso para celulases) (SIQUEIRA et al., 2017).

No entanto, suas maiores virtudes são opostas. O Amarelo Crepúsculo não possui alta afinidade pela celulose exposta, mas apresenta grande sensibilidade ao aumento na acessibilidade do material. O corante Vermelho Amaranto possui grande afinidade pela superfície exposta da celulose, mostrando altos valores de adsorção. No entanto, não possui sensibilidade tão precisa quanto o corante Amarelo Crepúsculo.

6. CONCLUSÃO

Primeiramente, os corantes Direct Blue e Direct Orange apontaram aumento na acessibilidade e, conseqüentemente, aumento na digestibilidade dos materiais. O corante Amarelo Crepúsculo demonstrou a maior sensibilidade dentre os corantes testados, fator muito importante ao se analisar acessibilidade. O corante Vermelho Amaranto apresentou a maior afinidade pela celulose exposta dentre todos os corantes testados. Os dois possuem qualidades opostas, mais testes utilizando os corantes em conjunto podem gerar resultados mais expressivos. O corante Amarelo Tartrazina mostrou queda de adsorção com o aumento na acessibilidade, isso o desqualifica para averiguar a superfície exposta da celulose, mas pode ser outro tipo de indicador ainda não explorado.

Os corantes Vermelho Allura e Azul Brilhante não demonstraram afinidade pela celulose exposta nem sensibilidade ao aumento na acessibilidade. Além disso, não mostraram nenhuma tendência de aumento ou diminuição de adsorção. Dentre todos os corantes testados, são os menos promissores. Continuar os testes com os corantes Amarelo Crepúsculo e Vermelho Amaranto pode ser o caminho para substituir os corantes Direct Blue e Direct Orange na tarefa de analisar as alterações estruturais em amostras de biomassa lignocelulósica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DA SILVA, A. S. A., TEIXEIRA, R. S. S., DE OLIVEIRA MOUTTA, R., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE BARROS, R. D. R. O., FERRARA, M. A., & DA SILVA BON, E. P. (2013). Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol

production. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, 47-88.

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

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

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

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

FREUDENBERG, K. (1965). Lignin: its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols. **Science**, 148(3670), 595-600.

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

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

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

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

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

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

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

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

MELATI, R. B., SHIMIZU, F. L., OLIVEIRA, G., PAGNOCCA, F. C., DE SOUZA, W., SANT'ANNA, C., & BRIENZO, M. (2019). Key Factors Affecting the Recalcitrance and Conversion Process of Biomass. **BioEnergy Research**, 12(1), 1-20.

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

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

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

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

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

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

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

SHIMIZU, F. L., MONTEIRO, P. Q., GHIRALDI, P. H. C., MELATI, R. B., PAGNOCCA, F. C., DE SOUZA, W. & BRIENZO, M. (2018). Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. **Industrial crops and products**, 115, 62-68.

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

SIQUEIRA, G., ARANTES, V., SADDLER, J. N., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. (2017). Limitation of cellulose accessibility and unproductive

binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for biofuels**, 10(1), 176.

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

STONE, E. J., HOMAN, E. S., MORRIS, H. F., & FRYE, J. B. (1965, January). Chemical pretreatment of roughages. In **journal of animal science** (vol. 24, no. 3, p. 910).

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

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

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

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

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

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

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

ZHAO, J., XU, F., & LI, Y. (2012). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, 42, 35-53.

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