



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**INFLUÊNCIA ANATÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM PROCESSOS DE
EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSES E USO COMO SUBSTRATO EM
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

RANIERI BUENO MELATI

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.

RIO CLARO/SP

2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**INFLUÊNCIA ANATÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM PROCESSOS
DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSES E USO COMO SUBSTRATO
EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

RANIERI BUENO MELATI

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

620.8 Melati, Ranieri Bueno
M517i Influência anatômica da cana-de-açúcar em processos de
extração de hemiceluloses e uso como substrato em atividade
enzimática / Ranieri Bueno Melati. - Rio Claro, 2018
70 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Biotecnologia. 2. Biomassa. 3. Cana-de-açúcar. 4.
Hemicelulose. 5. Lignina. 6. Xilanase. I. Título.

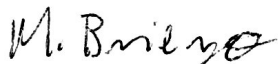
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA ANATÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSES E USO COMO SUBSTRATO EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA

AUTOR: RANIERI BUENO MELATI

ORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

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



Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia



Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 27 de julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Michel Brienzo, pela paciência, dedicação e palavras de incentivo ao me guiar pelos trilhos da ciência.

A meus pais Geraldo (*in memorian*) e Gessi, por toda a dedicação à minha educação e formação.

Aos meus irmãos Ricieri e Micheli, por todo o apoio e incentivo.

À minha futura esposa Priscila, pela paciência, ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

A meus sogros Sérgio e Lucimeire, pelo apoio e acolhida.

A meus amigos, por terem compartilhado um pedaço de suas vidas comigo, e por todo o auxílio no trabalho do dia a dia e companhia nas horas de lazer.

Aos professores, Dr. Fernando Carlos Pagnocca e Dr. Jonas Contiero, por terem cedido seus espaços de pesquisa em partes fundamentais deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 1642526

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui, meus mais sinceros agradecimentos.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

RESUMO

Materiais como o bagaço de cana-de-açúcar, são fartos na natureza e representam fontes renováveis para a extração de moléculas de interesse econômico, como as hemiceluloses. Entretanto, os métodos de extração dessas macromoléculas precisam ser melhor desenvolvidos para aplicação industrial. Deste modo, o objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de extração de hemicelulose com alto rendimento e pureza utilizando frações da biomassa de cana-de-açúcar: folha e colmo: entrenó, nó e fração externa. Foram avaliadas duas estratégias: uma prévia deslignificação da biomassa; e deslignificação da hemicelulose extraída de material não deslignificado. As hemicelulose extraídas foram avaliadas como substrato para determinação de atividade enzimática de xilanase. O método de extração de hemicelulose empregou 10g de cada biomassa tratadas com peróxido de hidrogênio em concentrações de 3 e 6% (m/v), em volume reacional de 200mL, por 4h, a 75 rpm, a 25°C. Após a reação, o pH foi corrigido com HCl 6 mols/L até 6, e cerca de 4 lavagens com etanol foram aplicadas. As reações de deslignificação das biomassas ocorreram em condições específicas para cada reagente: clorito de sódio (5, 10 e 20% m/m a 80°C/1 a 3h), peróxido de hidrogênio (5, 10 e 20% m/m a 25°C/4h) e sulfito de sódio (5,10 e 20% m/m a 121°C/30 min). A deslignificação da hemicelulose seguiu a mesma metodologia da deslignificação da biomassa, no entanto com concentração de 10% do reagente de deslignificação. A atividade enzimática de xilanase, foi realizada com extrato comercial utilizando as hemiceluloses extraídas e deslignificadas como substrato. As hemiceluloses extraídas foram monitoradas quanto a sua solubilidade e condutividade em solução. Os resultados de extração com 3 e 6% de peróxido mostraram valores entre 7 a 29% de rendimento. Os teores de lignina residual se mostraram coerentes com a literatura, ficando entre 4 a 10%. A deslignificação da biomassa previamente a extração de hemicelulose apresentou melhores resultados, rendendo entre 26,22% a 47,09%, com teor de lignina residual de 0,6% a 17,09%. A deslignificação da hemicelulose apresentou melhores resultados com o emprego de peróxido de hidrogênio, com redução de 58,44% do teor inicial de lignina. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas com as hemicelulose provenientes da biomassa deslignificada com peróxido de hidrogênio 5 e 10% (174,97 e 166,12 UI mL⁻¹). Os testes de solubilidade e pureza (baixa presença de sal) apontam que as hemiceluloses extraídas apresentaram características semelhante ou melhor que a xilana comercial. Na deslignificação das biomassas, o peróxido de hidrogênio foi o reagente que apresentou melhor resultado ao rendimento, pureza e solubilidade da hemicelulose. Este reagente também foi melhor na deslignificação das hemiceluloses, resultando menor teor de lignina residual. Para produzir um substrato para atividade enzimática a estratégia de deslignificação da biomassa previamente a extração de hemicelulose foi mais adequada, apresentando maior atividade enzimática.

Palavras-chave: Biomassa; Cana-de-açúcar; Hemicelulose; Lignina; Xilanase.

ABSTRACT

Materials such as sugarcane bagasse are abundant in nature and represent renewable sources for the extraction of molecules of economic interest, such as hemicelluloses. However, the extraction methods for these macromolecules need to be better developed for industrial application. Thus, the main objective of the work has been the development of a hemicellulose extraction method with high yield and purity using fractions of sugarcane biomass: leaf and stem: internode, node, and external fraction. Two strategies have been evaluated: a prior delignification of the biomass, and the delignification of the hemicellulose extracted from non-delignified material. The extracted hemicellulose has been evaluated as a substrate for the determination of enzymatic activity of xylanase. The hemicellulose extraction method has employed 10g of each biomass treated with hydrogen peroxide in concentrations of 3 and 6% (m/v), in a reaction with volume of 200mL, for 4h, at 75 rpm, at 25°C. After the reaction, the pH has been corrected with HCl 6 mol/L to 6, and about 4 washes with ethanol have been applied. The biomass delignification reactions have occurred under specific conditions for each reagent: sodium chlorite (5, 10, and 20% w/w 80 °C / 1 to 3h), hydrogen peroxide (5, 10, and 20% w/w 25°C/4h), and sodium sulfite (5.10 and 20% w/w 121°C/30 min). The delignification of the hemicellulose has followed the same methodology of delignification of the biomass, however with a concentration of 10% of the delignification reagent. The enzymatic activity of xylanase has been performed with commercial extract using hemicellulose extracted and delignified as substrate. The extracted hemicelluloses have been monitored for their solubility and conductivity in solution. The results of extraction with 3 and 6% peroxide have shown yield values between 7 and 29%. The residual lignin contents have been consistent with the literature, ranging from 4 to 10%. The delignification of the biomass prior to the extraction of hemicellulose presented better results, yielding between 26.22% and 47.09%, with residual lignin contents of 0.6% to 17.09%. The delignification of hemicellulose has presented better results with use of hydrogen peroxide, with reduction of 58.44% of the initial lignin content. The highest enzymatic activities have been obtained with the hemicellulose from the biomass delignified with hydrogen peroxide 5 and 10% (174.97 and 166.12 IU mL⁻¹). The solubility and purity tests (low salt content) indicate that the extracted hemicelluloses have presented characteristics similar to or better than commercial xylan. In the delignification of the biomasses the hydrogen peroxide has been the reagent that has presented better results referring to yield, purity, and solubility of the hemicellulose. This reagent has also been better in the delignification of the hemicelluloses, resulting in lower residual lignin content. To produce a substrate for enzymatic activity the strategy of delignification of the biomass prior to hemicellulose extraction has been more adequate, presenting higher enzymatic activity.

Keywords: Biomass; Sugarcane; Hemicellulose; Lignin; Xylanase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura anatômica do colmo da cana-de-açúcar.....	14
Figura 2 - Estrutura anatômica da cana-de-açúcar	16
Figura 3 - Ligações glicosídicas que formam a cadeia de celulose.....	18
Figura 4 - Esquematização das fibras de celulose e sua estrutura cristalina.	18
Figura 5 - Estrutura química da lignina.	19
Figura 6 - Detalhe dos álcoois que compõem a molécula de lignina: em vermelho, o álcool p - coumaril; em azul, o álcool coniferil; em verde, o álcool sinapil.....	20
Figura 7 - Estrutura dos monossacarídeos da hemicelulose.	22
Figura 8: Estrutura química da xilana.	22
Figura 9 - Esquema mostra as configurações químicas da hemicelulose e suas ligações com a lignina.	24
Figura 10 - Esquema mostra a complexa organização estrutural entre a celulose, hemicelulose e lignina. Essa complexidade está intimamente ligada à dificuldade da separação da hemicelulose entre a lignina e a celulose.....	26
Figura 11 - Esquema de extração de hemicelulose das frações e bagaço de cana-de-açúcar seguindo duas estratégias: prévia deslignificação (A); e deslignificação da hemicelulose extraída (B).....	35
Figura 12 - Resíduo sólido das biomassas após deslignificação parcial com sulfito de sódio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio	50
Figura 13 - Aspecto visual/coloração da hemicelulose extraída com peróxido de hidrogênio e deslignificada com sulfito de sódio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da hemicelulose e rendimento de extração por diferentes métodos. ..	27
Tabela 2 - Rendimento de extração de hemicelulose realizada com peróxido de hidrogênio 6% m/v, e sua solubilidade e condutividade em solução.....	39
Tabela 3 - Rendimento de extração de hemicelulose realizada com peróxido de hidrogênio 3% m/v, e sua solubilidade e condutividade em solução.....	41
Tabela 4 - Caracterização química da hemicelulose extraída das biomassas de cana-de-açúcar parcialmente deslignificadas com sulfito de sódio.	43
Tabela 5 - Caracterização química da hemicelulose extraídas das biomassas de cana-de-açúcar parcialmente deslignificadas com clorito de sódio.....	46
Tabela 6 - Caracterização química da hemicelulose extraída das biomassas da cana-de-açúcar parcialmente deslignificadas com peróxido de hidrogênio.	49
Tabela 7 - Caracterização química dos resíduos ricos em celulose após deslignificação parcial com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, em concentração 20% (m/m).	54
Tabela 8 - Caracterização química dos resíduos ricos em celulose após deslignificação parcial com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, em concentração 20% (m/m). Resultados em % de massa recuperada em relação ao material in natura.	55
Tabela 9 - Deslignificação de hemicelulose extraída de fração externa com peróxido de hidrogênio 6%, e seu teor de lignina residual, solubilidade e condutividade.....	58
Tabela 10 - Determinação de atividade enzimática com xilanase comercial utilizando como substrato as xilanas extraídas da fração externa.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Material lignocelulósico e biomassa da cana-de-açúcar	15
2.2 Celulose	17
2.3 Lignina	18
2.4 Cinzas e extrativos	20
2.5 Hemiceluloses	21
2.6 Métodos de extração da hemicelulose	24
2.7 Xilanases	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar para separação das frações	32
4.1.1 Extração da hemicelulose	32
4.1.2 Caracterização química da hemicelulose	33
4.1.3 Caracterização química da biomassa deslignificada	33
4.1.4 Solubilidade da hemicelulose e condutividade em solução	33
4.2 Estratégias de deslignificação	34
4.3 Determinação de açúcares.....	35
4.4 Atividade enzimática de xilanase.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Extração e caracterização química das hemiceluloses extraídas com peróxido de hidrogênio	37
5.1.1 Extração com peróxido de hidrogênio 6%.....	37
5.1.2 Extração com peróxido de hidrogênio 3%.....	39

5.2. Deslignificação parcial das biomassas de cana-de-açúcar previamente a extração de hemicelulose	41
5.2.1 <i>Deslignificação com sulfito de sódio</i>	41
5.2.2 <i>Deslignificação com clorito de sódio</i>	44
5.2.3 <i>Deslignificação com peróxido de hidrogênio</i>	47
5.3 Caracterização química dos resíduos sólidos parcialmente deslignificados.....	50
5.4 Deslignificação da hemicelulose extraída.....	56
5.5 Atividade enzimática de xilanase utilizando hemiceluloses extraídas	58
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

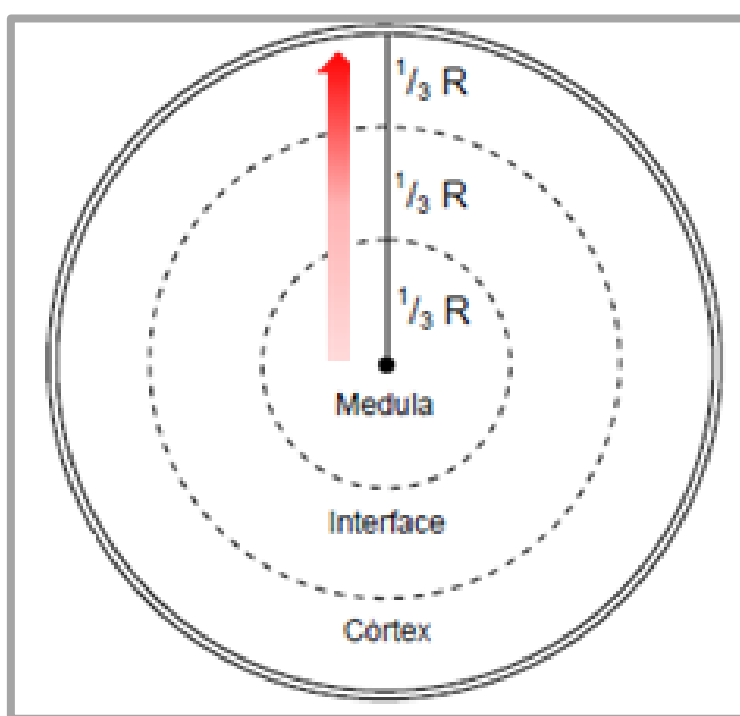
A cana-de-açúcar é uma planta perene de estocagem de sacarose do tipo C4 (uma referência à via na qual o CO₂ é primeiramente organizado em um composto contendo quatro átomos de carbono) pertencente ao gênero *Saccharum*, que se originou na Ásia. A cana-de-açúcar é cultivada em países tropicais e subtropicais no mundo todo, incluindo os maiores produtores, como Brasil (721 milhões de toneladas), a Índia (347 milhões de toneladas), a China (123 milhões de toneladas) e a Tailândia (96 milhões de toneladas) (MILLER et al., 2012). O bagaço é gerado a partir do processo de moagem para a extração da sacarose, enquanto que a palha é gerada na colheita da cana-de-açúcar. O bagaço contém dois tipos de fibras: a fibra da celulose da casca e a medula vascular do caule. A fibra da medula é composta principalmente por células de parênquima e a casca, por células de esclerênquima (MILLER et al., 2012). Essas estruturas distribuídas pelo bagaço deixam o material heterogêneo e com diferentes recalcitrâncias às rotas de conversão biotecnológica. A figura 1 mostra o esquema do colmo de cana-de-açúcar, evidenciando que a recalcitrância à degradação química, física e biológica do material aumenta da medula para o córtex. Estes fatores são os atuais desafios para o uso da biomassa lignocelulósica em processos de biorrefinarias.

Todavia, novas possibilidades estão surgindo para a biomassa lignocelulósica, o que proporcionará uma melhor aplicação dessa matéria-prima, principalmente no uso de sua fração de hemicelulose. O pré-tratamento do bagaço, em condições alcalinas, com temperatura e pressão moderadas, é considerado uma estratégia para a extração da hemicelulose. Na maioria das aplicações é necessário que a hemicelulose esteja com alto grau de pureza, ou seja, com baixo conteúdo de lignina residual. Em algumas aplicações, são necessárias características como alta solubilidade, coloração clara e determinado grau de polimerização. Entretanto, a maioria dos trabalhos relacionados à extração, falham devido ao baixo rendimento e alto teor de lignina residual, e não investigam sua solubilidade. Esses fatores são importantes para a aplicação desse polissacarídeo, por exemplo em processos que envolvem hidrólise enzimática e aplicações nas quais a hemicelulose é matéria-prima, como formação de filme. Existe a necessidade de estudos visando a extração de hemicelulose com características adequadas de processo (alto rendimento) e de aplicação (pureza e solubilidade).

Entre muitas aplicações biotecnológicas, a hemicelulose pode ser empregada nos campos de energia, produtos farmacêuticos e de alimentos. O limitante para o uso da hemicelulose são suas características, o que é uma consequência do método de extração. Um

caminho que pode ser explorado, está relacionado à utilização de espécies de plantas cuja biomassa apresente menor recalcitrância, assim como a utilização de biomassa geneticamente modificada (STUDER et al., 2011). Entretanto, o que foi avaliado neste estudo foi o uso de frações da biomassa para identificar sua influência nos processos de extração de hemicelulose. Consequentemente, evidenciando a existência de frações de menor recalcitrância à extração de hemicelulose. Trabalhos recentes têm apontado que frações do colmo, como entrenó, nó e fração externa respondem diferente a pré-tratamentos e hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2016, 2014; COSTA et al., 2013). Baseado nas propriedades de heterogeneidade e recalcitrância da biomassa, a presente proposta teve como hipótese o emprego de frações da biomassa, podendo identificar frações de mais fácil extração. Outra hipótese foi avaliar estratégias de deslignificação da biomassa antes da extração da hemicelulose, e deslignificar a hemicelulose extraída.

Figura 1 – Esquema da estrutura anatômica do colmo da cana-de-açúcar.



Fonte: Costa et al. (2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Material lignocelulósico e biomassa da cana-de-açúcar

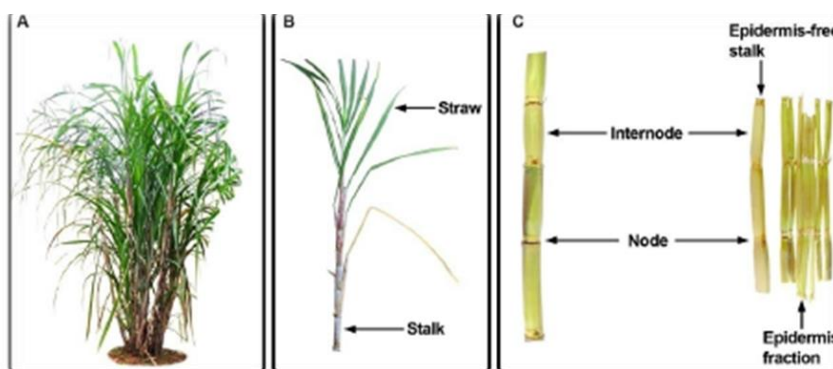
Dentre os mais variados resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura, um que se destaca, principalmente em países tropicais, é o bagaço da cana-de-açúcar (PENG et al., 2009). É um resíduo presente de forma abundante em indústrias de açúcar e álcool em países como Brasil, Índia, Cuba e China (MARTINEZ et al., 2003). Estima-se que a produção de cana-de-açúcar no país em 2018/2019 ficará em torno de 700 milhões de toneladas (CONAB, 2017)). De acordo com Cerqueira et al., 2007, uma tonelada de cana-de-açúcar gera em torno de 140 kg de bagaço e de palha, logo, levando em conta essa previsão, cerca de $1,7 \times 10^8$ toneladas de resíduos serão produzidas. Os resíduos excedentes, que não são utilizados na cogeração de energia, poderiam estar disponíveis para aplicações biotecnológicas, gerando moléculas de maior valor agregado, como derivados da hemicelulose. Logo, por causa da importância do bagaço e palha da cana-de-açúcar como resíduo agroindustrial, há um grande interesse no desenvolvimento de métodos para a produção de biocombustíveis e outros insumos de alto valor agregado que poderiam oferecer também vantagens ambientais e econômicas (ADSUL et al., 2004).

A planta da cana-de-açúcar possui uma grande heterogeneidade morfológica, consistindo em um conjunto de fibras e outros elementos como vasos, parênquima e células epiteliais (SANJUAN et al., 2001). A planta pode ser dividida em colmos, folhas e um sistema de raízes (Figura 2). A estrutura do colmo é heterogênea, composta por articulações longas e cilíndricas (entrenós) intercaladas por pequenos nós (MILLER et al., 2012). A superfície externa do colmo é revestida por cera e impregnada por cutina, a qual é característica da estrutura de epiderme. A epiderme consiste de uma camada única alternada de pequenas e grandes células (MILLER et al., 2012), formando uma forte e densa estrutura cujo conteúdo depende do tipo de planta (XU, 2010). A epiderme é organizada em paredes paralelas cobertas por uma espessa camada impermeável chamada de cutícula (BRIENZO et al., 2014; MILLER et al., 2012). O que é mais importante do ponto de vista da recalcitrância e anatomia é que, próximo à epiderme, existe uma grande concentração de feixes vasculares. Essa estrutura atribui grande recalcitrância a essa região, a qual foi definida como fração externa, englobando a epiderme (BRIENZO et al., 2016). A fração externa é a fração mais recalcitrante da cana-de-

açúcar a processos de pré-tratamento, seguida pelo nó e entrenó (BRIENZO et al., 2014), enquanto que o entrenó é a região de menor recalcitrância (COSTA et al., 2013).

A composição química da biomassa da cana-de-açúcar é complexa e constitui majoritariamente por três compostos estruturais: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polissacarídeo linear composto de unidades de β -1,4-D-glicose, unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares formando uma estrutura cristalina (regiões altamente organizadas) e amorfa (regiões menos organizadas) (LYND et al., 2002). A hemicelulose, diferentemente da celulose, é heterogênea, possuindo em sua composição química quantidades diferenciadas de açúcares como L-ramnose, L-arabnose, D-xilose, D-manose, D-glucose e D-galactose, além de ácido urônicos; e lignina, que dá à parede celular uma maior complexidade (GAO et al., 2014, FENGEL e WEGENER, 1984; DE SOUZA et al., 2013). No caso do bagaço da cana-de-açúcar, sua constituição gira em torno de 35 a 55 % de celulose, 16 a 36 % de hemicelulose e 14 a 27 % de lignina (MELATI et al., 2017). Essas macromoléculas são de difícil separação/isolamento na sua forma pura, devido a sua organização e recalcitrância natural (PENG et al., 2009; SANT'ANNA et al., 2014). Dentre essas frações lignocelulósicas, a hemicelulose tem recebido muita atenção nos últimos anos devido a sua importância na conversão da biomassa em combustível, como o etanol e outros produtos de alto valor agregado, utilizando estratégias químicas e biológicas para sua conversão (PENG et al., 2009). Entre os produtos de alto valor agregado derivados da hemicelulose citam-se: xilo-oligossacarídeos (XOS), xilitol, hidrogel, curativos e substitutos para a pele humana, filmes para embalagem biodegradável, encapsulação de drogas, substituto para gordura em queijos, aditivos na produção de papel, substituto para gelatina como em gomas alimentares, aditivos na indústria têxtil e de cosméticos, produção de novos biomateriais como o glucagel, etc (EBRINGEROVÁ, 2006).

Figura 2 - Estrutura anatômica da cana-de-açúcar.



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

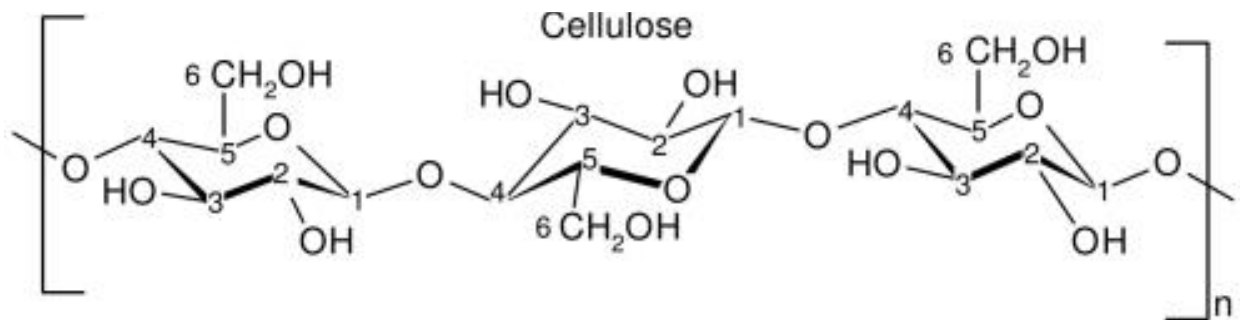
2.2 Celulose

A celulose é o polissacarídeo renovável mais abundante no planeta e é composta por uma cadeia de homopolissacarídeos, formada por unidades de anidroglicose, unidas por ligações do tipo β - 1,4 - D - glicose (Figura 3), que compõem uma estrutura cristalina, devido às suas extensas ligações intra e intermoleculares de hidrogênio, que facilitam sua agregação em fibrilas (Figura 2) (PU et al., 2008). As microfibrilas de celulose têm regiões altamente organizadas, e regiões menos organizadas, definidas como regiões cristalinas e amorfas, respectivamente. A celulose nativa é uma estrutura polimórfica, definida como celulose I, sendo que alguns tratamentos químicos/térmicos podem convertê-la em polimorfos II, III e IV. A celulose nativa é encontrada como duas fases cristalinas, conhecidas como I α e I β (ATALLA e VANDER HART, 1984).

A média aproximada das massas moleculares das celulosas de bagaço de cana-de-açúcar é de cerca de 157.800 a 168.400 g mol⁻¹ e o tamanho das fibras de celulose varia de 1,0 a 1,5 mm (DoHaA do Governo Australiano, 2004). Uma unidade de celulose, conhecida como fibrila elementar, sofre automontagem, de modo a formar microfibrilas, que podem ser englobadas por matrizes de hemiceluloses, para produzir macrofibras, criando resistência à degradação química e enzimática (RAGAUSKAS e BEZERRA, 2016).

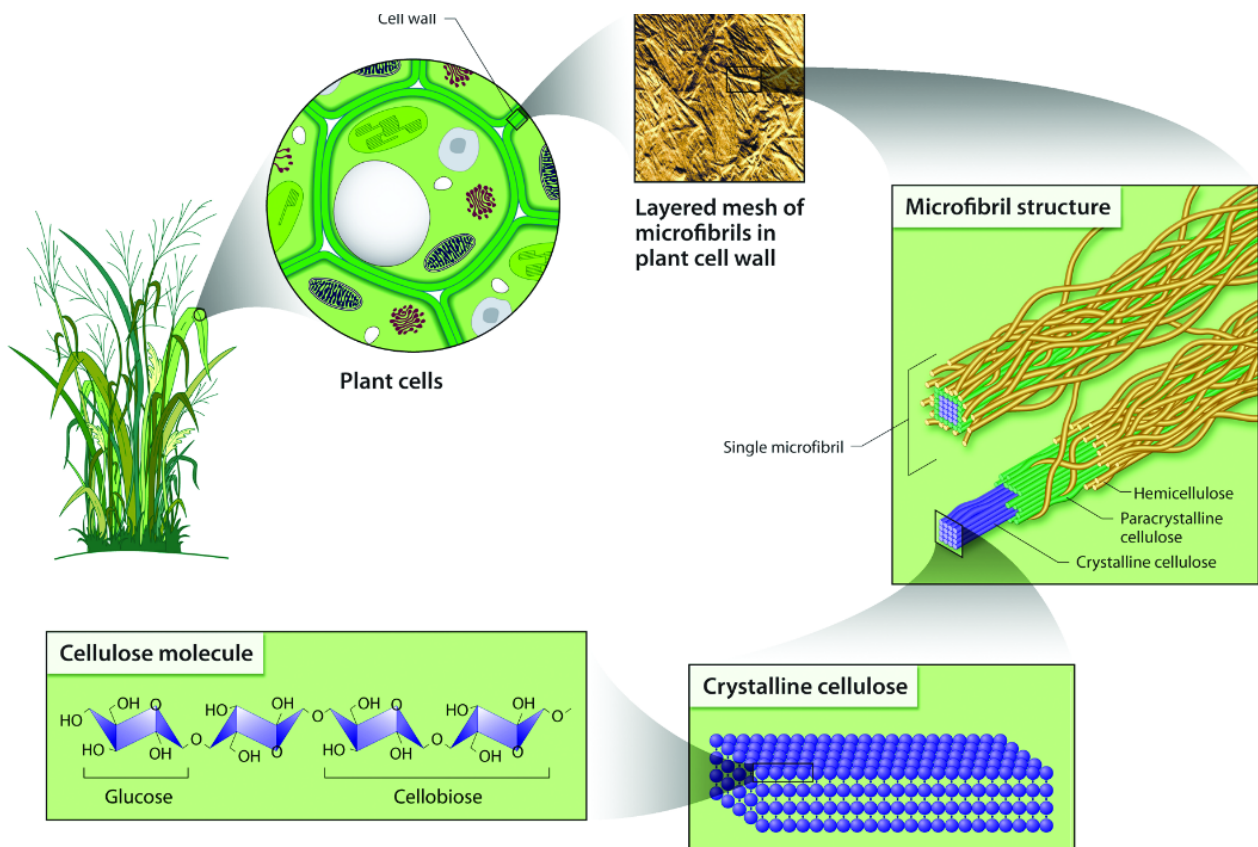
A média do grau de polimerização de celulose do bagaço de cana-de-açúcar varia de 974 a 1039 monômeros de glicose (BIAN et al., 2014). O grau de polimerização refere-se à quantidade de monômeros de glicose presentes no polímero, além de poder influenciar na eficiência da hidrólise enzimática. A estrutura natural da celulose é primariamente resistente à hidrólise enzimática como resultado de sua cristalinidade altamente organizada e também seu alto grau de polimerização, além da celulose possuir a característica de ser insolúvel em água (SANT'ANNA, et al., 2014).

Figura 3 - Ligações glicosídicas que formam a cadeia de celulose.



Fonte: Gurunathan et al. (2015).

Figura 4 - Esquemática das fibras de celulose e sua estrutura cristalina.



Fonte: Rose e Bennett (1999).

2.3 Lignina

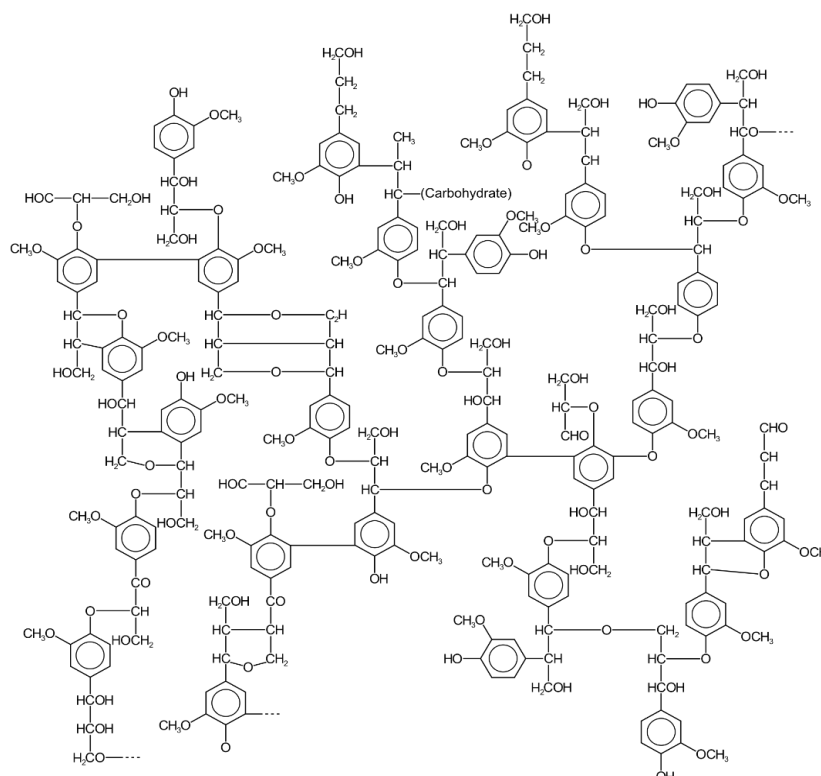
A lignina é conhecida como a macromolécula aromática mais abundante na natureza. É uma macromolécula com estrutura que apresenta organização amorfa (Figura 5). Sua

biossíntese pode ser considerada como resultado da polimerização de três tipos de unidades fenilpropânicas, como os monolignóis: álcoois p-coumaril, sinapil e coniferil (Figura 6), os quais são responsáveis pela sua forma resistente (RAGAUSKAS e BEZERRA, 2016). Estes monolignóis são a origem das unidades de p-hidroxifenil (H),iringil (S) e lignina guaiacil (G) na macromolécula de lignina (MOGHADDAM et al., 2014).

A massa molecular da lignina do bagaço da cana-de-açúcar tem, em média, 507 - 3.973 g mol⁻¹. A quantidade encontrada na lignina da cana-de-açúcar, é relativamente baixa, em torno de 2,37 % a 4,16 %, no entanto, se analisarmos apenas o bagaço, esse número sobe para 25 % (RAGAUSKAS e BEZERRA, 2016, MELATI et al., 2017).

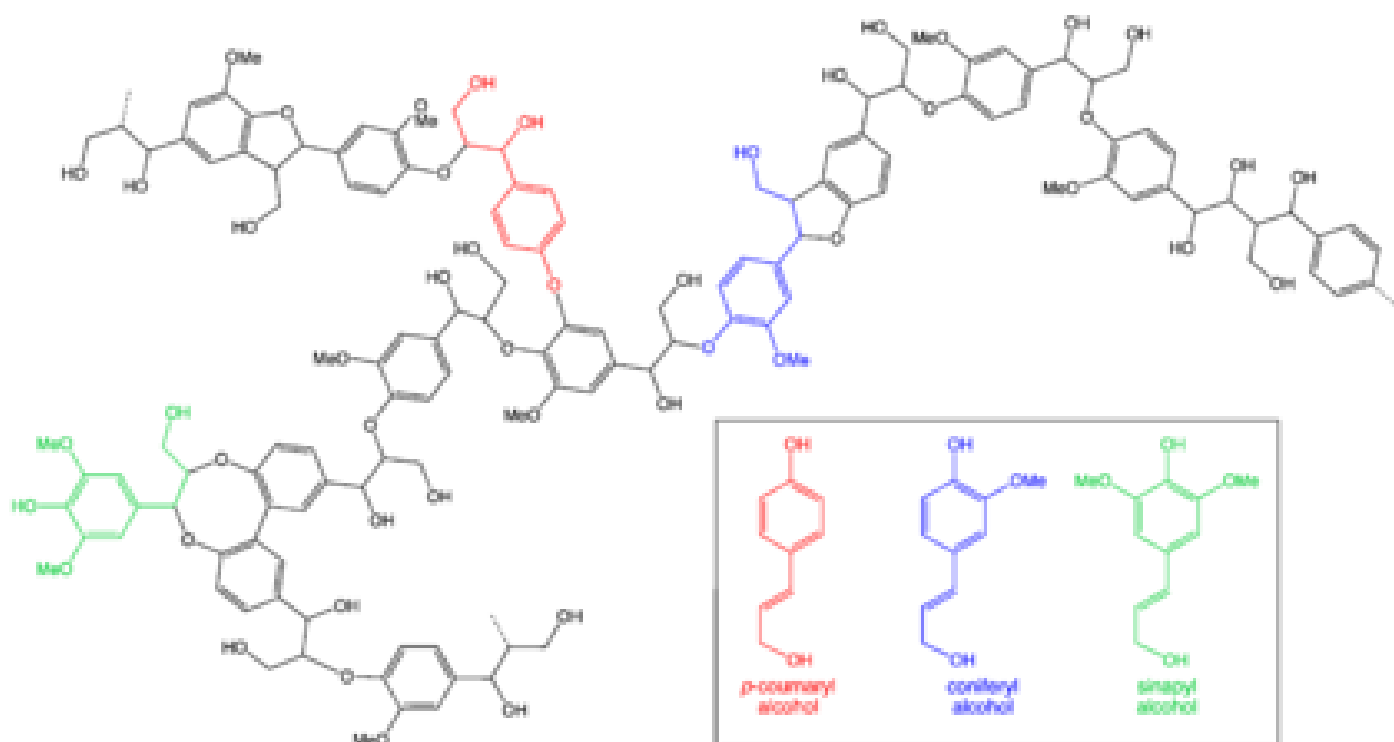
As ligninas do bagaço de cana-de-açúcar são majoritariamente compostas por ligações alquilaril éter, do tipo β -O-4. A lignina tem função estrutural e de proteção na parede celular vegetal, mas a lignina afeta a maioria dos métodos de pré-tratamento do bagaço, bem como a hidrólise enzimática. Assim, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de obter mais informações sobre sua estrutura, a fim de remove-la ou modifica-la usando líquidos iônicos, amônia, ácidos diluídos, entre outros pré-tratamentos (MOGHADDAM et al., 2014; SUN et al., 2004).

Figura 5 - Estrutura química da lignina.



Fonte: Glazer e Nikaido (1995).

Figura 6 - Detalhe dos álcoois que compõem a molécula de lignina: em vermelho, o álcool p - coumaril; em azul, o álcool coniferil; em verde, o álcool sinapil.



Fonte: adaptado de Zakzeski et al. (2010) e Boerjan et al. (2003).

2.4 Cinzas e extrativos

Um dos resíduos da queima do bagaço de cana-de-açúcar, após seu uso como cogenerador de combustível ou energia, junto a outras contaminações presentes nas usinas, são as cinzas do. Essas cinzas são da cor preta e contêm uma densidade de 2,39 g cm⁻³ com partículas irregulares. Contém cerca de 87,8 % de areia com partículas maiores que 63 µm, 11,5 % de fendas com partículas entre 2 e 63 µm, 0,7 % de argila com pelo menos 2 µm e 10,32 % de matéria orgânica (RAGAUSKAS e BEZERRA, 2016).

No Brasil, a geração de cinzas de bagaço de cana-de-açúcar é estimada em cerca de 2,5 milhões de toneladas por ano e são majoritariamente utilizadas como fertilizantes de solo (FARIA et al., 2012). Nos últimos anos, estudos sobre possíveis aplicações tecnológicas e econômicas das cinzas foram desenvolvidos. As cinzas do bagaço são ricas em sílica e, portanto, podem ser utilizadas para outras finalidades, como matéria-prima cerâmica, aditivo para concreto e agregados finos em argamassa (RAGAUSKAS BEZERRA, 2016).

Os extrativos no bagaço da cana representam de 2,3 a 10,5 % da composição química do material. Eles são hidrofóbicos e podem ser exemplificados por ácidos graxos, ceras, proteínas, entre outros. Um estudo relatou que cerca de 0,9 % dos extrativos de acetona continham cerca de 140 mg k⁻¹ de ácidos n-oleosos, 700 mg k⁻¹ de n-aldeídos e 330 mg k⁻¹ de n-álcoois graxos (JOSÉ et al., 2015). Para fins de análises químicas, os extrativos são geralmente removidos do bagaço.

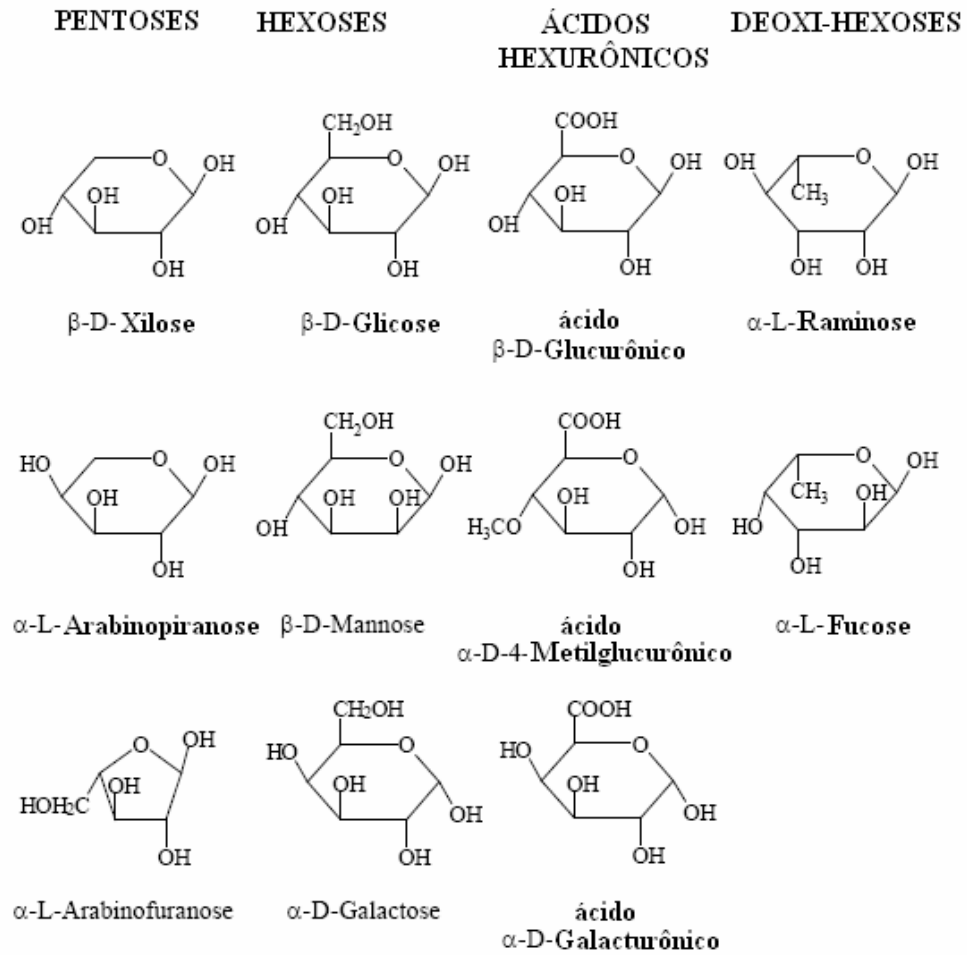
2.5 Hemiceluloses

As hemiceluloses compõem o segundo polissacarídeo renovável mais abundante do planeta, ficando atrás apenas da celulose (SUN et al., 2001; PENG et al., 2009). São classificadas como polissacarídeos heterogêneos, encontrados em grandes quantidades em madeiras e plantas perenes, formando, junto à celulose e à lignina, a parede celular vegetal (PENG et al., 2009). No entanto, as hemiceluloses estão intimamente associadas às celuloses via conexões físicas e ligações de hidrogênio, enquanto que, em relação às ligninas, elas estão unidas por ligações covalentes, que é caracterizada pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons entre átomos, sendo elas principalmente ligações do tipo R(radical)-benzil e éter (FREUDENBERG, 1965; PENG et al., 2009).

Em geral, as hemiceluloses são polissacarídeos constituídos por cerca de 80 a 200 unidades de resíduos de açúcar de baixa massa molecular. A fórmula química geral das hemiceluloses é (C₅H₈O₄)_n, e são classificadas entre pentoses e hexoses (CAI e PASZNER, 1988). Dentre as pentoses, destacam-se: D-xilose, L-arabinose e L-ramnose; enquanto que entre as hexoses são mais comuns os seguintes açúcares: D-glicose, D-manose e D-galactose. Hemiceluloses também podem conter ácidos urônicos, sendo mais importantes os ácidos 4-O-metil-D-glucurônico e D-galacturônico (Figura 7) (TIMELL, 1964).

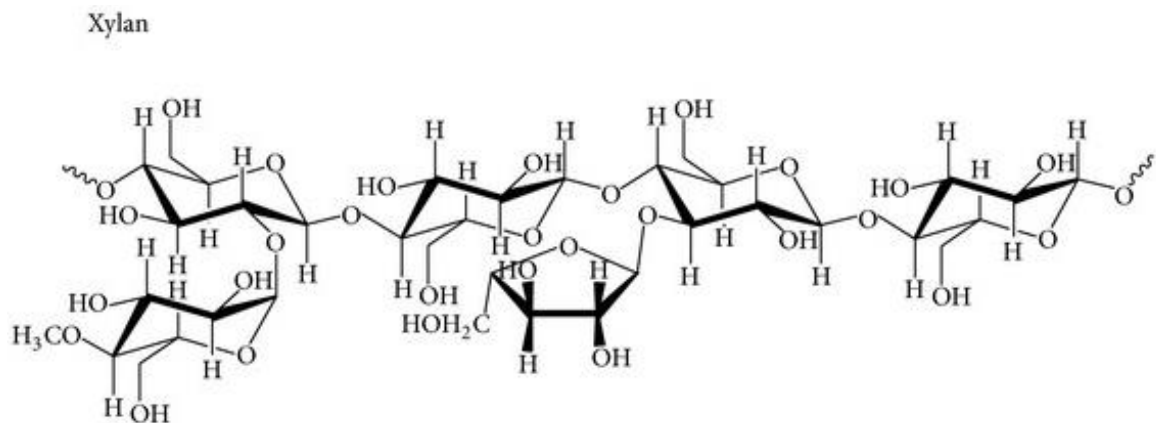
A hemicelulose mais abundante em plantas anuais é a arabinoxilana, que contém resíduo D-xilopiranosil conectado por ligações glicosídicas de β-(1-4). A hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar é definida como L-arabino-(4-O-metil-D-glucurona)-D-xilana (BRIENZO et al., 2009; SUN et al., 2004). Ligados a elas, como cadeias de unidades simples, nas posições C-2, C-3 ou ambas, estão resíduos de α-L-arabinofuranose e α-D-ácido glucurônico (ou seu derivado 4-O-metil) (MACGREGOR e FINCHER, 1993; PENG et al., 2009). **A xilana (Figura 8)**, que é de ocorrência natural, contém grupos O-acetil localizados em alguns dos grupos hidroxila, nos carbonos 2 ou 3, na sua cadeia principal (PENG et al., 2009).

Figura 7 - Estrutura dos monossacarídeos da hemicelulose.



Fonte: Fengel e Wegener (1984).

Figura 8: Estrutura química da xilana.



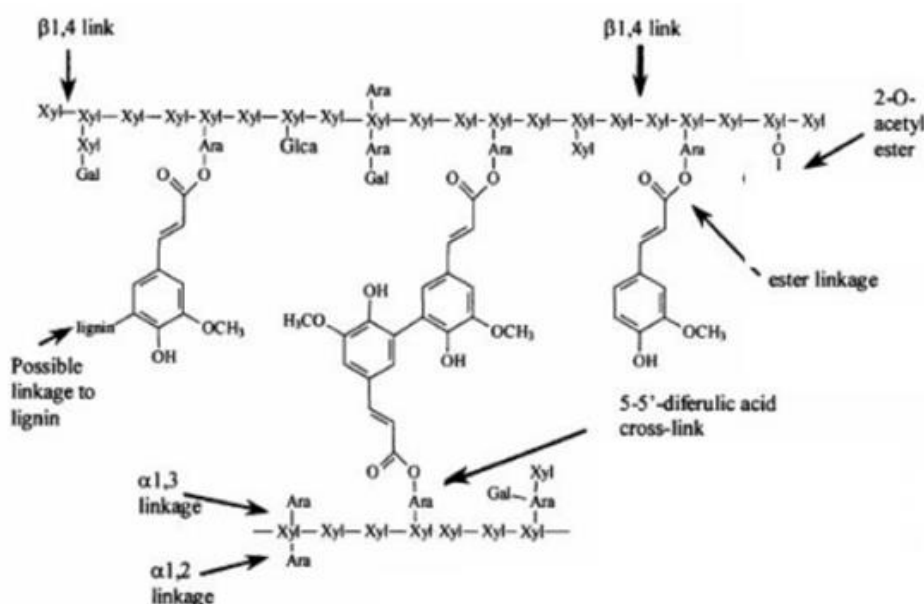
Fonte: Lee et al. (2014).

Ao contrário da celulose, a hemicelulose não é quimicamente homogênea e sua composição apresenta grande variação de proporção e conteúdo, dependendo da espécie, tipo de tecido, estágio de crescimento e condições ambientais e fisiológicas (FENGEL e WEGNER, 1984; BRIENZO, 2010; BRIENZO et al., 2014). Existe uma grande variedade no conteúdo e composição da hemicelulose nos talos, folhas, raízes e casca. Por exemplo, a hemicelulose do trigo apresenta diferentes graus de substituição entre os tecidos. A relação arabinose/xilose é igual a 1, quando se analisa a parte externa do grão (pericarpo), enquanto que a parte interna apresenta baixo grau de substituição (0,3) (BRILLOUET e JOSELEAU, 1987). A xilana é o polissacarídeo principal encontrado nas hemiceluloses de madeiras duras, enquanto que a manana prevalece nas madeiras moles (GAO et al., 2013). A hemicelulose apresenta uma estrutura amorfa e hidrofílica e, portanto, pode ser mais facilmente removida de paredes celulares do que a celulose (Figura 9). A xilose e os xilo-oligômeros são frequentemente os principais produtos obtidos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da hemicelulose, podendo ser utilizados como açúcares fermentescíveis para geração de etanol, por exemplo (GAO et al., 2013).

Outros produtos de valor agregado ou compostos intermediários, tais como o xilitol, o furfural e o ácido levulínico, utilizados para a produção de químicos e polímeros, também podem ser gerados a partir de hemicelulose através de abordagens catalíticas apropriadas (ADEN et al., 2004; ALONSO et al., 2010). Outros autores sugeriram que o conteúdo, bem como a composição da hemicelulose, podem afetar também a recalcitrância da parede celular (YORK e O'NEILL, 2008). Acredita-se que as interações entre as microfibras da hemicelulose e da celulose, bem como as ligações de lignina-carboidrato, são capazes de impedir o ataque das enzimas (CHUNDAWAT et al., 2011; HSU, 1996). As *Arabidopsis* transgênicas, com menor conteúdo de grupos metil nas cadeias laterais de glucuronoxilana, liberaram mais xilose que o tipo de controle selvagem em condições de menor severidade após a hidrólise enzimática (URBANOWICZ et al., 2012).

Logo, devido à importância da hemicelulose na conversão de biomassa em termos de produção de grandes rendimentos de extração e como matéria-prima para produtos de valor agregado, um método eficiente de extração e análise desse material é de extrema importância para extrair hemicelulose de interesse comercial (alto grau de pureza e solubilidade), tornando viável sua produção.

Figura 9 - Esquema mostra as configurações químicas da hemicelulose e suas ligações com a lignina.



Fonte: Toole et al. (2007).

2.6 Métodos de extração da hemicelulose

Métodos que visam à recuperação de macromoléculas da biomassa, como a lignina e a hemicelulose, tem como objetivo aumentar a solubilização desses compostos através de sua extração ou despolimerização ou modificação química (HELMERIUS et al., 2010). Como as hemiceluloses estão firmemente ligadas à lignina e à celulose na parede celular, há uma certa dificuldade em separá-las sem que haja uma mudança significativa em suas estruturas (Figura 10) (BRIENZO et al., 2009; SUN et al., 2004). Para essa finalidade, alguns pré-tratamentos são aplicados, utilizando reagentes químicos, físicos e também biológicos.

Especificamente para a extração da hemicelulose, há uma vasta variedade de pré-tratamentos químicos disponíveis (Tabela 1) (HELMERIUS et al., 2010; YOON et al., 2008; AL-DAJANI e TSCHIRNER, 2008; KENEALY et al., 2006; MOSIER et al., 2005; SUN e CHENG, 2002). O uso de água ou de um diluente alcalino antes de uma extração mais concentrada remove a xilana com cadeias mais ramificada. O uso de peróxido em meio alcalino provoca a remoção do conteúdo de acetil da cadeia de xilana (BRIENZO et al., 2009). O meio alcalino quebra as ligações α -éter da lignina (das unidades fenólicas), solubilizando a molécula associada, que pode ser uma cadeia de hemiceluloses. O meio alcalino também cliva ligações éster, os quais incluem grupos acetil e ácidos ferúlico e diferúlico, ligando as cadeias de xilana

com a lignina. O bagaço da cana-de-açúcar com alto conteúdo de acetil é positivo para a liberação de XOS por meio de pré-tratamentos, tais como a autohidrólise e a explosão a vapor. Esses pré-tratamentos sem a adição de catalisador desempenham-se bem com biomassa com alto conteúdo de grupos acetil, fragmentando a xilana em XOS e xilose.

Além dos métodos químicos de extração de hemicelulose a partir de materiais lignocelulósicos, alguns métodos físicos podem também ser usados (REN et al., 2006). A utilização do tratamento com vapor (PULS et al., 1985), a irradiação de micro-ondas (AZUMA et al., 1986) e a sonicação (SUN et al., 2004) também são utilizados para o mesmo fim. Esses pré-tratamentos, no entanto, estão sempre associados à extração alcalina, que é crucial para melhorar os resultados de fatores como solubilidade dos componentes e das reações químicas dos mesmos (REN et al., 2006; LUNDQVIST et al., 2002). Por outro lado, não são economicamente viáveis para aplicação em escala industrial.

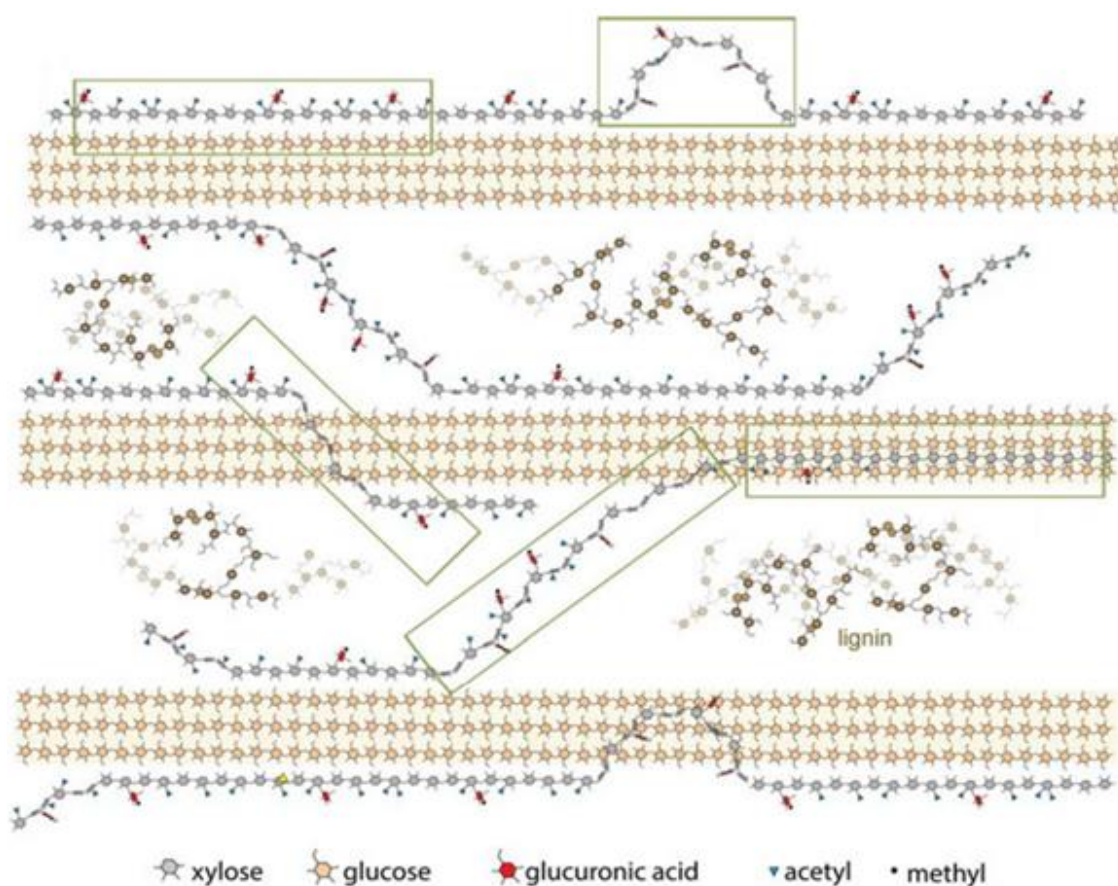
Atualmente, a extração de hemicelulose enfrenta dificuldades técnicas e econômicas para produção em larga escala. Alguns trabalhos têm como objetivo essa viabilidade, mas falham na quantidade de reagentes e no baixo rendimento de extração (CELEBIOGLU et al., 2012), e impurezas como sais, proteínas e lignina (JACQUEMIN et al., 2015). Entretanto, mais importante do que o rendimento da extração, algumas aplicações necessitam de uma hemicelulose com propriedades específicas: grau de polimerização, solubilidade, cor, ramificações e impurezas (lignina residual). Existe potencial comercial para a hemicelulose para diversas aplicações como produção de xilo-oligossacarídeos (XOS), xilitol, hidrogel, curativos e substitutos para a pele humana, filmes para embalagem biodegradável, encapsulação de drogas, substituto para gordura em queijos, etc (EBRINGEROVÁ, 2006). Existe também necessidade técnica para pesquisa, por exemplo, na determinação de atividade enzimática de xilanases. Algumas empresas estão descontinuando a comercialização de xilana de birch e beechwood (exemplo, Sigma Aldrich¹), as quais eram utilizadas para atividade enzimática. Existe a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia para extrair hemicelulose com características apropriadas para determinação de atividade enzimática.

Considerando que o bagaço de cana-de-açúcar é hoje uma das principais matérias primas, é importante que a hemicelulose dessa biomassa seja utilizada como substrato para a determinação de atividade de xilanase e em cultivo para induzir a produção desta enzima. Muitos trabalhos com bagaço de cana-de-açúcar apresentam a hemicelulose com alto

¹ Empresa Sigma Aldrich descontinua a produção e comercialização de xilanas:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=xylan&interface=All&N=0> &mode
=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product

rendimento de extração, porém com alto conteúdo de lignina (BRIENZO et al., 2009; XU et al., 2006); por outro lado, a hemicelulose extraída mesmo com baixo rendimento ainda apresenta lignina residual (BANERJEE et al., 2014; SUN et al., 2004). A aceitação da hemicelulose e sua composição são fatores relacionados à sua aplicação. Certo conteúdo de lignina não é impeditivo da produção de XOS por hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2010), mas provavelmente é para algumas aplicações como atividade enzimática, formação de filme/hidrogel, adição à polpa celulósica (LAIANE et al., 2016), confecção de pele artificial e encapsulação de drogas.

Figura 10 - Esquema mostra a complexa organização estrutural entre a celulose, hemicelulose e lignina. Essa complexidade está intimamente ligada à dificuldade da separação da hemicelulose entre a lignina e a celulose.



Fonte: Busse-Wicher et al. (2016).

Tabela 1 - Composição da hemicelulose e rendimento de extração por diferentes métodos.

Composição hemicelulose (% , massa seca)											
Xil	Ara	Gal	Man	Ram	Glu	Ácidos urônicos	Lignina	Massa Molecular (g/mol)	Rendimento (%)	Extração	Referência
50.4	4.4	*	*	*	3.9	4.4	10.0	21100	52.0	Peróxido em meio alcalino (2%, m/v), 20°C, 4h.	Brienzo et al., 2009
74.9	6.0	*	*	*	6.4	5.2	9.6	21100	60.8	Peróxido em meio alcalino (6%, m/v), 60°C, 16h.	Brienzo et al., 2009
78.0	5.8	*	*	*	5.4	6.5	10.4	22185	94.0	Peróxido em meio alcalino (4%, m/v), sulfato de magnésio (0.25 % m/m), 40°C, 10h.	Brienzo et al., 2009
93.2	5.6	0.2	0.4	0.2	0.5	2.3	6.1	40770	*	Tratamentos sucessivos com água, NaOH 1 e 3%, 50°C durante 3h, precipitação com etanol 15%.	Peng et al., 2009
91.0	6.4	1.3	0.3	0.1	1.1	2.1	4.5	86720	*	Tratamentos sucessivos com água, NaOH 1 e 3%, 50°C durante 3h, precipitação com etanol 30%.	Peng et al., 2009
87.0	7.8	1.1	nd	Nd	3.3	1.7	2.2	77140	*	Tratamentos sucessivos com água, NaOH 1 e 3%, 50°C durante 3h, precipitação com etanol 60%.	Peng et al., 2009
82.0	9.3	0.7	1.0	3.0	4.1	4.8	3.1	35200	55.5	1 M NaOH, 20°C, 18h	Xu et al., 2006
81.0	9.8	0.5	1.1	4.9	2.6	5.8	2.7	35820	59.1	1 M NaOH, 30°C, 18h	Xu et al., 2006
78.0	11.6	0.3	1.4	6.5	2.2	5.6	2.4	37430	62.1	1 M NaOH, 40°C, 18h	Xu et al., 2006
43.1	25.1	2.7	4.0	0.7	9.8	2.1	13.3	6500	3.0	Autohidrólise, 170°C, 15 min.	Banerje et al., 2014
69.0	12.1	1.4	1.1	0.1	9.7	1.7	6.3	22500	8.1	Autohidrólise, 200°C, 15 min.	Banerje et al., 2014
78.8	4.6	1.0	0.6	0.1	3.1	3.2	7.2	27900	14.9	Material extraído por autohidrólise por 15 min, 170°C, e H ₂ O ₂ 3%, sulfato de magnésio 0.25%, 40°C, 12h.	Banerje et al., 2014
83.4	5.7	0.9	0.4	0.2	3.0	3.4	3.9	12100	12.2	Material extraído por autohidrólise por 15 min, 200°C, e H ₂ O ₂ 3%, sulfato de magnésio 0.25%, 40°C, 12h.	Banerje et al., 2014
55.2	10.7	7.6	4.1	1.8	20.4	7.0	9.6	7380	4.1	Extração por água 55°C, 2h.	Sun et al., 2004
68.6	12.7	1.9	*	*	7.3	3.5	0.7	23340	9.6	Extrações sucessivas do bagaço tratado com 0.5 M NaOH, H ₂ O ₂ 0,5%, 55°C, 2h.	Sun et al., 2004
76.5	14.7	3.0	0.3	1.0	13.0	4.8	4.2	38890	9.6	Extrações sucessivas do bagaço tratado com 0.5 M NaOH, H ₂ O ₂ (0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 and 3%), 55°C, 2h.	Sun et al., 2004
81.3	11.9	1.7	0.5	0.5	4.0	3.5	5.1	45370	12.0	0.5 M NaOH a 55°C, 2 h do bagaço tratado com água.	Sun et al., 2004
43.1	4.4	0.2	0.3	0.1	0.5	1.7	0.7	6500	3.0	Mínimo	
93.2	25.1	7.6	4.1	6.5	20.4	7.0	13.3	86720	94.0	Máximo	
74.8	9.7	1.7	1.3	1.6	5.9	4.0	6.0	33026	32.6	Média	

Legenda da tabela: Ram: ramnose; Ara: arabinose; Xil: xilose; Man: manose; Glu:glucose; Gal: galactose. * Dados não fornecidos. Fonte: elaborado pelo autor.

2.7 Xilanases

As enzimas possuem um papel importante na produção de vários produtos, com ênfase nos processos biocatalíticos, aplicados nas indústrias alimentícias e de bebidas. As vantagens de se usar enzimas é a grande especificidade de ação, condições simples para a catálise de reações e diversidade de processos passíveis de serem realizados em relação a catalisadores químicos. A desvantagem do uso das enzimas na aplicação industrial se deve ao alto custo para isolar e purificar, além de sua recuperação do meio reacional no final do processo catalítico (MORANA et al., 2006). A possibilidade de adquirir enzimas por fontes microbianas é outra característica importante, levando a uma grande disponibilidade, comparativamente a outras fontes de enzimas, como tecidos animais (PSZCZOLA, 2001). Dentre os micro-organismos que produzem enzimas de interesse comercial, os fungos do gênero *Aspergillus* se destacam. Eles pertencem à família das Aspergillaceae, classe Ascomycetes e a subclasse Euscomycetae (CARVALHO, 2013). São denominados fungos filamentosos superiores pois possuem estrutura mais complexa do que os demais fungos e se diferenciam dos demais por produzirem esporos sexuais, os ascósporos, contidos nos ascos (PELCZAR et al., 1997). Utilizam como fonte de carbono, preferencialmente, carboidratos simples como a glicose, mas também podem consumir sacarose, maltose, amido e celulose. Substâncias inorgânicas como amônia, alguns nitratos ou substâncias orgânicas como peptona, sulfatos e fosfatos, podem ser fontes de nitrogênio. Em menor quantidade, esses fungos requerem, alguns oligoelementos como ferro, zinco, manganês, cobre, cálcio e vitaminas para o seu crescimento. (TRABULSI et al., 1999). Por sua vez, os ascomycetes realizam um papel ecológico muito importante pois são capazes de degradar matéria orgânica, como restos de animais e ainda mais importante, vegetais, que possuem materiais resistentes como celulose, lignina e hemiceluloses (PELCZAR et al., 1997).

Os materiais lignocelulósicos, estão sendo usados cada vez mais como fontes de carbono renováveis e representam a principal proporção da biomassa de plantas terrestres (BOUDET et al., 2003; SANCHEZ, 2009). Esses materiais possuem em sua composição as já citadas celuloses, hemiceluloses e lignina, os quais sofrem o processo de hidrólise enzimática por micro-organismos, como os do gênero *Aspergillus*, liberando carboidratos que são utilizados como fontes de energia e carbono. Esse processo degradativo é de fundamental importância biológica e industrial. A biomassa lignocelulósica inclui resíduos agrícolas como palhas, cascas, caules, hastes, bagaços de cana-de-açúcar, madeiras decíduas e coníferas, resíduos da indústria de polpa e papel, resíduos de plantas herbáceas, entre outros sendo utilizados como substratos e/ou fontes de carbono para induzirem a produção de diversas enzimas como

celulases, amilases, proteases e xilanases (SAHA, 2003). Em relação a aplicação das xilanases, segundo Biely (1985), há uma divisão em duas categorias: uma associada à polissacaridases (por exemplo, celulases) e outra livre de celulase. Atualmente, uma das principais aplicações das xilanases e outras enzimas é no pré- branqueamento da polpa de celulose na indústria de papéis. Existem algumas teorias que o tratamento com xilanases tem função de remover a xilana precipitada da superfície da polpa (ocorrida durante o cozimento), mas não está totalmente esclarecida, a maneira exata ainda de como as xilanases agem nos processos de branqueamento. Outra aplicação do complexo xilanolítico é no processamento de fibras vegetais, como o cânhamo ou o linho na indústria têxtil (PRADE, 1995). As xilanases são componentes de formulação de ração animal, juntamente com glucanase, pectinase, celulase, protease, amilase, fitase, galactosidase e lipase. Elas quebram arabinoxilanas presentes na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto. Se a xilanase é acrescentada na ração contendo milho e sorgo, ambos são alimentos de baixa viscosidade, ela melhora a digestão dos nutrientes na parte inicial do trato digestivo, resultando em uma melhora no uso de energia. A ação conjunta com as glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases melhoram a digestibilidade da mistura alimentar (POLIZELI et al., 2005).

Na indústria alimentícia, as xilanases podem ser usadas junto com alfa-amilase que leva à produção de maltose, por exemplo, na panificação, aumentando a maciez e a textura da massa e do miolo e mantendo o pão fresco por mais tempo. Por outro lado, a amilase maltogênica e a xilanase dão estabilidade à massa, enquanto a protease altera a elasticidade e a textura do glúten e melhora a cor e o sabor do pão (MUSSATTO et al., 2007). As xilanases vem sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam 2 a 3 % (m/m) da farinha de trigo, e absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases (arabinoxilanas) à farinha leva à liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume, melhorando a estrutura de miolo e textura (CAMACHO; AGUILAR, 2003). Além disso, uma grande quantidade de arabinoxilooligossacarídeos pode ser benéfico à saúde, pois influencia o funcionamento do intestino delgado, melhorando a digestão e absorção dos açúcares; proteção contra as doenças cardiovasculares; prevenção de câncer colo retal e auxilia no aumento do bolo fecal e esvaziamento intestinal periódico nas evacuações (MENEZES; DURRANT, 2008). Nas fábricas de biscoitos, a xilanase é recomendada na fabricação de cream-crackers e wafers, melhorando a textura, palatibilidade e uniformidade (POLIZELLI et al., 2005). As xilanases

também são utilizadas na clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na liquefação de frutas e mucilagem de café (WONG et al., 1988).

Técnicas avançadas de biologia molecular permitiram outras aplicações das xilanases. Segundo Ganga et al., (1999), uma levedura recombinante do vinho foi construída com gene para xilanase de *Aspergillus nidulans* xlnA, resultando em um vinho com melhor aroma de frutas que o convencional. Durante a fabricação da cerveja, a parede celular da cevada é hidrolisada permitindo a quebra do amido. No entanto, há a liberação de longas cadeias de arabinoxilanas, que aumentam a viscosidade podendo deixar a cerveja turva. Assim, as xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanas a oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e, conseqüentemente, eliminando a turbidez da cerveja (PRODUCTS AND SOLUTIONS NOVOZYMES, 2008). A xilanase e a xilana são pouco usadas na indústria farmacêutica. A xilanase foi algumas vezes empregada com complexo de enzimas (hemicelulases, proteases e outras) em suplementos alimentares, mas poucos produtos medicinais possuem essa formulação (POLIZELLI et al., 2005). Já os produtos da hidrólise da xilana, como a xilose, podem ser transformados em combustíveis líquidos (etanol), solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria. A primeira etapa é a deslignificação da hemicelulose que é material rico em xilana, seguido da hidrólise pela ação das xilanases e hemicelulases, produzindo açúcares como a xilose. Na etapa seguinte os produtos são fermentados, principalmente por levedura (*Pichia stipitis* e *Candida shehatae*) produzindo xilitol ou etanol (SREENATH; JEFFRIES, 2000). Como pôde ser visto, as xilanases apresentam grande importância econômica pois estão presentes em diversas áreas da produção industrial.

E uma vez que a produção de xilana comercial está sendo descontinuada pelas empresas do ramo (ex: Sigma Aldrich), é importante analisarmos se as hemiceluloses obtidas pelos processos de extração utilizados nesse trabalho, apresentam boa qualidade a fim de serem utilizadas como substratos de ação para as xilanases de interesses comerciais.

3 OBJETIVOS

Avaliar a influência das frações da biomassa de cana-de-açúcar na extração da hemicelulose e avaliar uma metodologia de extração com processos de deslignificação da biomassa.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho de metodologias de extração de hemicelulose nas diferentes biomassas da cana-de-açúcar: folhas e colmo (nó, entrenó e fração externa), e bagaço integral;
- b) Avaliar uma metodologia de extração de hemicelulose avaliando estratégias de prévia deslignificação da biomassa de cana-de-açúcar;
- c) Avaliar uma metodologia de deslignificação da hemicelulose extraída da biomassa de cana-de-açúcar;
- d) Avaliar as hemiceluloses extraídas como substrato para determinar atividade enzimática;
- e) Determinar o teor de lignina das hemiceluloses extraída das diferentes biomassas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar para separação das frações

A cana-de-açúcar (folha, colmo e bagaço) foi fornecida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) da cidade de Piracicaba/SP, considerando a variedade de canas-de-açúcar plantada no estado de São Paulo. As frações do colmo foram separadas em externa (contendo a epiderme), entrenó e nó, como reportado na literatura (BRIENZO et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2011). A separação foi manual, com um corte a 2 mm da extremidade para remoção da fração externa. O colmo, livre de fração externa, foi fracionado em nó e entrenó. As frações foram prensadas para remoção da sacarose, lavadas com água destilada e secas em estufa a 50 °C. As amostras foram moídas e selecionadas em peneira de 20 mesh, submetidas à remoção de extrativos em soxhlet, com etanol e água, por 6 h cada. As amostras foram secas em estufa a 50 °C e armazenadas em frascos plásticos.

4.1.1 Extração da hemicelulose

A extração da hemicelulose foi realizada em triplicatas de 10 g (massa seca) cada, com as frações da cana (folha e colmo: entrenó, nó e fração externa), com frações peneiradas do bagaço proveniente da indústria e com o bagaço integral. A reação para extração da hemicelulose foi feita com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em concentrações de 6 % e 3 % m/v, adicionando-se solução 5 M de hidróxido de sódio (NaOH), até atingir pH de 11,6. O Erlenmeyer foi avolumado até 200mL com água deionizada e agitada em shaker em cerca de 75 rpm, a 25 °C, por 4 horas. Após esse período, as amostras foram neutralizadas com ácido clorídrico (HCl) 5 M, até pH entre 5~6. Depois de neutralizadas, as amostras foram incubadas a 50 °C para concentração e redução de volume para cerca de 1/3. Ao chegar em cerca de 50mL de volume, as amostras foram precipitadas com etanol 95 % 3 volumes. Após cerca de 24 horas, a fração líquida foi separada do material precipitado (hemicelulose), sendo o sobrenadante descartado e uma nova lavagem com etanol 70 % foi realizada. Esse procedimento foi realizado por três vezes, a fim de evitar a formação de sais nas amostras. Após as lavagens, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por cerca de 72 h. O material extraído (hemicelulose) foi pesado, e armazenado em minis-placa de Petri, para posterior análises.

4.1.2 Caracterização química da hemicelulose

A hemicelulose extraída foi caracterizada quanto a sua composição química, hidrolisando aproximadamente 300 mg de hemicelulose, adicionando 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/m); a reação ocorreu a 45 °C por 7 minutos, sendo interrompida com adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos (BRIENZO et al., 2009; GOUVEIA 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 um peso 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. 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).

4.1.3 Caracterização química da biomassa deslignificada

A biomassa deslignificada foi caracterizada quanto a sua composição química, hidrolisando aproximadamente 300 mg de material, adicionando 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/m); a reação ocorreu a 30 °C por uma hora, sendo interrompida com adição de 84mL de água destilada. Essa mistura foi autoclavada a 121 °C por uma hora (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 um peso 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. 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).

4.1.4 Solubilidade da hemicelulose e condutividade em solução

A solubilidade da hemicelulose foi determinada de acordo com o método de Bailey (1992). O método consistiu em preparar uma solução de xilana 1% em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A solução foi aquecida até atingir o ponto de ebulição 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 10000 xg por 15 min para separação do material insolúvel, o qual foi seco em estufa a 60 °C até massa constante.

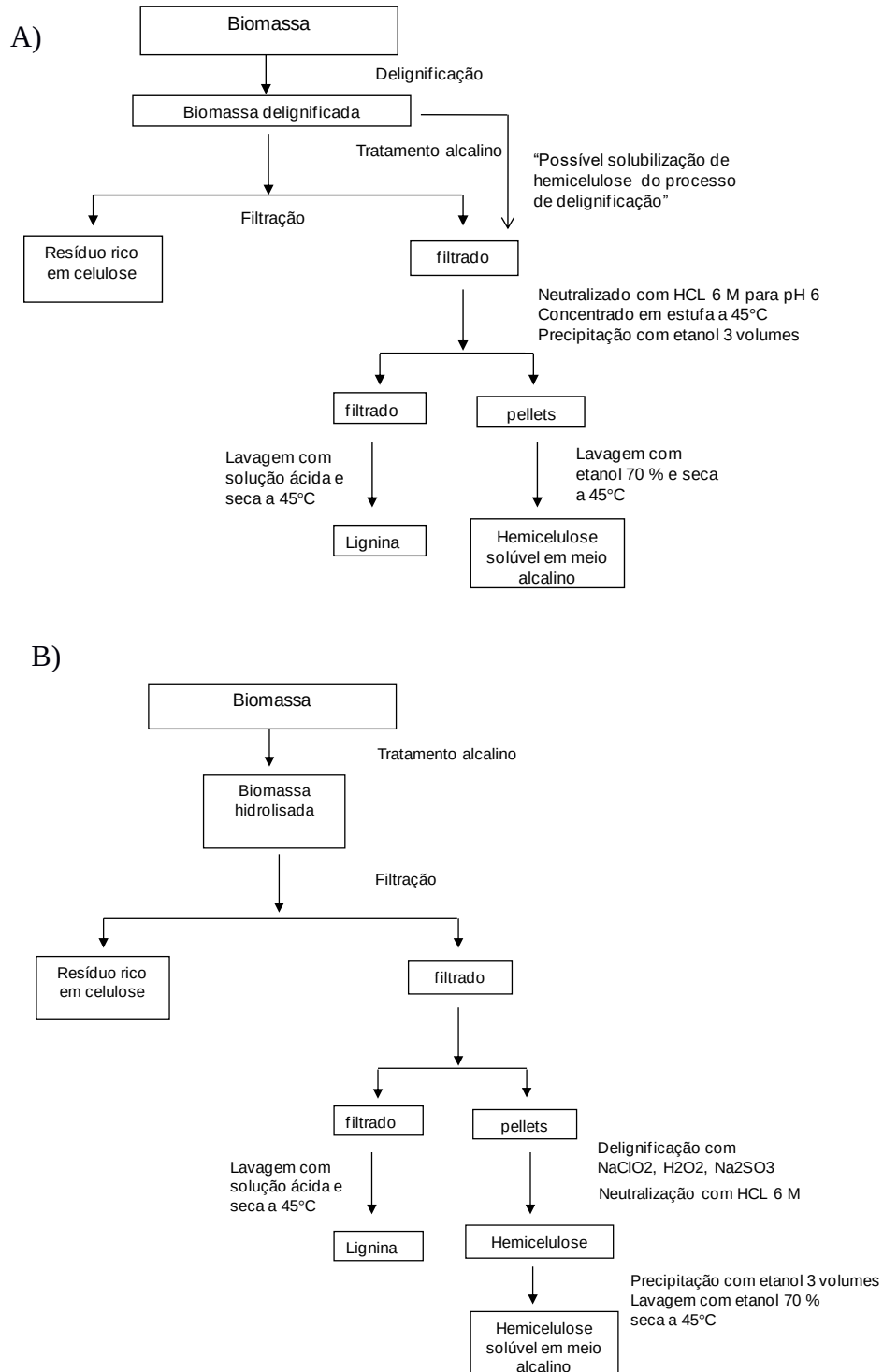
A condutividade da solução de xilana 1 % e solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 foi medida em condutivímetro, a fim de verificar a formação de sal nas hemiceluloses extraídas.

4.2 Estratégias de deslignificação

A deslignificação foi realizada com reagentes específicos para lignina, como clorito de sódio (NaClO_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sulfito de sódio (Na_2SO_3) em meio alcalino.

Duas estratégias foram avaliadas: i) uma etapa de deslignificação da biomassa da cana-de-açúcar antes da extração de hemicelulose com H_2O_2 ; ii) uma etapa de tratamento da hemicelulose isolada para deslignificação usando NaClO_2 , H_2O_2 e Na_2SO_3 (Figura 11). Os reagentes de deslignificação foram aplicados em diversas condições. O clorito de sódio foi comparado com processos de deslignificação (SIQUEIRA et al., 2011), o peróxido em branqueamento de polpa celulósica (LIU, 2003) e o sulfito em pré-tratamento de biomassa (MENDES et al., 2015). As reações ocorreram em condições específicas para cada reagente: clorito de sódio: 5, 10 e 20 % m/m a 80 °C por 3 horas, utilizando 10 gramas de material, em volume reacional de 200 mL em meio líquido com água deionizada; peróxido de hidrogênio 5, 10 e 20 % m/m a 25 °C por 4 horas, também em volume de 200 mL em meio líquido com água deionizada; sulfito de sódio 5, 10 e 20 % m/m em temperatura de 121 °C/30 min, em volume de 200 mL no meio líquido com água deionizada. Após os processos de deslignificação, as amostras foram lavadas em água corrente até o pH ficar igual à mesma, filtradas e a parte sólida colocada para secar em estufas a 50 °C. Após livres de umidade, foi realizada a extração de hemicelulose padrão. No caso da deslignificação da hemicelulose extraída, após aplicação dos tratamentos, as amostras foram lavadas com etanol, seguindo mesma metodologia da extração de hemiceluloses. Posteriormente, elas foram secas e levadas para caracterização química. Em relação a essas estratégias, foram determinados o rendimento de extração, recuperação de massa, teor de lignina residual, composição em açúcares, além dos valores obtidos em testes de condutividade e solubilidade.

Figura 11 - Esquema de extração de hemicelulose das frações e bagaço de cana-de-açúcar seguindo duas estratégias: prévia delignificação (A); e delignificação da hemicelulose extraída (B).



Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 Determinação de açúcares

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas por CLAE, utilizando 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 M, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em filtro de seringa de 0,22 µm.

4.4 Atividade enzimática de xilanase

A atividade enzimática de xilanase foi determinada seguindo método descrito por Bailey, Biely e Poutanen (1992). A quantificação de açúcares redutores liberados a partir da xilana, foi realizada pelo método do ácido-3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de xilana (materiais extraídos e xilana comercial de birchwood – Sigma Aldrich) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubada a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Posteriormente resfriamento, realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Um controle para cada amostra foi também preparado, adicionando-se o reagente DNS antes do extrato enzimático. A absorbância destes controles foi descontada das respectivas amostras.

A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 e 2 mg/mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e caracterização química das hemiceluloses extraídas com peróxido de hidrogênio

Os rendimentos de extração de hemiceluloses de diferentes frações de biomassa de cana-de-açúcar estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Assim como valores de lignina residual no material e respectivas medidas de condutividade e solubilidade. Estes ensaios utilizaram peróxido de hidrogênio em concentração de 6 % m/v (Tabela 2) e 3 % m/v (Tabela 3), segundo protocolo de otimização de extração de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2009).

5.1.1 Extração com peróxido de hidrogênio 6 %

Partindo da premissa de que a metodologia de extração de hemicelulose estudada, foi previamente otimizada para o bagaço da cana-de-açúcar, os resultados obtidos provenientes das demais frações mostraram-se equivalentes/comparáveis. Em relação à extração realizada com peróxido de hidrogênio 6 % m/v, a fração externa e a folha apresentaram rendimentos de extrações semelhantes em relação ao bagaço, com médias de 29,70 e 24,16 %, respectivamente, contra 23,9 % do bagaço (Tabela 2). O entrenó e o nó, apesar de resultarem em médias um pouco menores em relação ao bagaço (18,6 e 22,63 %, respectivamente), apresentaram rendimentos semelhantes aos obtidos por Brienzo et al. (2009). Outros trabalhos mostram resultados semelhantes em relação à quantidade de hemicelulose extraída das frações de cana-de-açúcar, como Moraes Rocha et al., 2015, que obtiveram média de 27,6 % de extração de hemicelulose.

As hemicelulose extraídas com 6 % m/v de H_2O_2 apresentaram valores de lignina residual coerentes com os apresentados por Brienzo et al., 2009, entre 4,6 a 14,1 %. Seguindo a metodologia otimizada para o bagaço, o resultados obtidos variaram do mínimo de 4,78 % para o entrenó até o máximo de 8,56 % para a folha, tendo o bagaço como controle, o qual resultou em média de 7,26 % (Tabela 2). Pode ser observado que quanto menor a % de lignina, maior a eficácia do tratamento na extração de hemicelulose. Logo, pode-se observar que todas as frações resultaram em intervalo/faixa de rendimento encontrado por Brienzo et al., 2009.

Uma das preocupações com a extração de hemicelulose é evitar a formação de sal, o que pode ocorrer na etapa de neutralização do meio de extração (pH 11,6) com ácido clorídrico. A verificação de uma possível formação de sal foi realizada por medida de condutividade. Espera-se que quanto maior o valor obtido de condutividade, mais sais poderiam estar presentes nas amostras. Como a ideia do processo de extração foi reduzir ao máximo a concentração de sal no material extraído, a fim de obter uma hemicelulose com alto grau de pureza, os resultados foram comparados ao valor do tampão acetato de sódio 5mM e pH 4,8 (como sendo um padrão interno), o qual apresentou condutividade 10,46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C. Também como comparação, a solução de xilana comercial (birchwood - Sigma-Aldrich) nas mesmas condições apresentou condutividade de 12,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C. O menor valor encontrado foi na solução de hemicelulose proveniente da fração externa, com média de 18 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, e a maior condutividade na solução de hemicelulose do bagaço, com média de 19,86 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 2). Os valores de mínimo e máximo são próximos, e se comparados à xilana comercial, que supostamente tem uma pureza maior, não apresentou discrepância entre os resultados obtidos.

Outra preocupação com a extração de hemicelulose é a sua solubilidade, a qual pode influenciar em algumas das suas aplicações. Para os testes de solubilidade, a xilana comercial de birchwood (Sigma-Aldrich), foi utilizada como padrão de controle, para fins de comparação com as hemiceluloses extraídas nesse trabalho. Com uma solubilidade de 69,7 %, a xilana comercial mostrou-se abaixo dos valores obtidos pelas hemiceluloses extraídas nesse trabalho (Tabela 2 e 3). Comparativamente, a solubilidade da hemicelulose da fração externa foi a menor encontrada, com média de 80,67 %, enquanto a hemicelulose da folha foi a que apresentou maior solubilidade, com 94,10 %. No entanto, todas as outras frações apresentaram solubilidades acima dos 90 %, demonstrando que as hemiceluloses extraídas com peróxido 6 % m/v, aliadas aos resultados de condutividade, possuem qualidade desejáveis para aplicações, uma vez que apresentam pureza e solubilidade elevadas.

Tabela 2 - Rendimento de extração de hemicelulose realizada com peróxido de hidrogênio 6 % m/v, e sua solubilidade e condutividade em solução.

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Condutividade ($\mu\text{S/cm}$ a 25 °C)</i>	<i>Solubilidade (% m/v)</i>
<i>Bagaço</i>	23,9 ± 0	7,26 ± 0	19,86 ± 0,27	93,75 ± 0,78
<i>Entrenó</i>	18,67 ± 9,47	4,78 ± 4,56	19,58 ± 0,40	92,23 ± 1,07
<i>Nó</i>	22,63 ± 5,20	8,47 ± 3,19	19,45 ± 0,94	93,77 ± 1,97
<i>Fração externa</i>	29,70 ± 3,25	6,04 ± 1,67	18,00 ± 0,40	80,67 ± 4,93
<i>Folha</i>	24,17 ± 2,18	8,53 ± 1,59	18,62 ± 1,42	94,10 ± 1,19
<i>Xilana de Birchwood</i>	*	*	12,04	69,70
<i>Tampão acetato de sódio pH 4,8</i>	*	*	10,46	*

* Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor

5.1.2 Extração com peróxido de hidrogênio 3%

Foi avaliado o efeito da redução da concentração de peróxido de hidrogênio em 50 % (3 % m/v) na extração de hemicelulose das biomassas de cana-de-açúcar. Os experimentos seguiram as mesmas condições dos ensaios anteriores: 4 horas em agitação a 75 rpm, a 25 °C, e posterior lavagens com etanol para precipitação do material e redução de sal nas amostras.

A diminuição da concentração do reagente levou a uma redução de material extraído em quase 3 vezes para todas as frações, exceção feita ao entrenó, do qual foi extraída hemicelulose em um rendimento apenas 4 % menor em relação às condições iniciais de extração (H_2O_2 a 6 %) (Tabelas 2 e 3). A justificativa para essa diminuição de rendimento em relação à concentração utilizada primariamente, pode ser dada pela diminuição na quantidade de reagente, que se mostrou insuficiente para romper a recalcitrância do material e das suas frações (BRIENZO et al., 2014, SANT' ANNA et al., 2014). Uma vez que se diminuiu a severidade do tratamento, o mesmo não se mostrou adequado para o objetivo de extração de hemicelulose com alto rendimento. Porém, observou-se que o entrenó se mostrou menos recalcitrante que as demais frações, com maior rendimento de extração de hemicelulose (Tabela 3).

As hemiceluloses extraídas com peróxido de hidrogênio 3% m/v apresentaram valores de lignina residual maiores do que aqueles apresentados para o tratamento com concentração de peróxido de hidrogênio 6 % (Tabela 2). Os teores de lignina residual variaram de 7,54 %

para a hemicelulose do bagaço até 12,19 % para hemicelulose da folha (Tabela 3). Apesar disso, os valores encontram-se dentro do intervalo reportado por Brienzo et al., 2009, em metodologia otimizada para extração de hemicelulose para o bagaço, e Moraes Rocha et al., 2015, que reportaram média de 7,38 % de lignina residual, também para bagaço. Uma hipótese para esse aumento é que, com a severidade do tratamento reduzida pela metade, a lignina não foi quebrada e solubilizada adequadamente, levando a um aumento no seu conteúdo no material extraído e consequentemente não houve melhora no processo de extração de hemicelulose.

Em relação aos testes de condutividade e solubilidade, a premissa foi a mesma da extração realizada com peróxido de hidrogênio 6 % m/v. O valor mínimo e máximo de condutividade, foram obtidos com a hemicelulose da fração externa com 15,22 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, e da folha, com 18,86 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, respectivamente (Tabela 3). Valores esses, melhores até do que os encontrados na extração com peróxido de hidrogênio 6% m/v que apresentou como melhor resultado, 18 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 2) para a hemicelulose da fração externa e muito próximo ao da xilana comercial, que apresentou condutividade de 12,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C.

A solubilidade das hemiceluloses extraídas com 3% de peróxido de hidrogênio foi superior ao da xilana comercial, que apresentou 69,7 %. Entretanto, as hemicelulose extraídas com 3 % apresentaram menor solubilidade em comparação as extraídas com 6 % m/v de peróxido de hidrogênio (Tabelas 2 e 3). O melhor resultado encontrado, foi com a hemicelulose da folha, com solubilidade de 89,70 %, enquanto a menor solubilidade foi obtida com a hemicelulose extraída da fração externa, com 52,20 % (Tabela 3). Através desses resultados de condutividade e solubilidade pode-se inferir que as hemiceluloses extraídas com peróxido de hidrogênio 3 % m/v, apresentam boa pureza e solubilidade, excetuando-se a extraída da fração externa, que apresentou solubilidade menor do que a xilana comercial.

Tabela 3 - Rendimento de extração de hemicelulose realizada com peróxido de hidrogênio 3 % m/v, e sua solubilidade e condutividade em solução.

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Condutividade ($\mu\text{S/cm}$ a 25 °C)</i>	<i>Solubilidade (% m/v)</i>
<i>Bagaço</i>	7,20 $\pm$ 0,57	7,54 $\pm$ 2,02	16,60 $\pm$ 1,24	70,15 $\pm$ 11,38
<i>Entrenó</i>	14,60 $\pm$ 0,99	9,77 $\pm$ 0,98	17,86 $\pm$ 0,46	87,90 $\pm$ 4,80
<i>Nó</i>	8,80 $\pm$ 0,99	7,68 $\pm$ 3,96	17,26 $\pm$ 0,36	76,25 $\pm$ 5,16
<i>Fração externa</i>	8,35 $\pm$ 3,75	10,49 $\pm$ 1,76	15,22 $\pm$ 0,35	52,20 $\pm$ 0,57
<i>Folha</i>	10,80 $\pm$ 0,14	10,80 $\pm$ 6,95	18,86 $\pm$ 1,00	89,70 $\pm$ 0,85
<i>Xilana de Birchwood</i>	*	*	12,04	69,70
<i>Tampão acetato de sódio pH 4,8</i>	*	*	10,46	*

* Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2. Deslignificação parcial das biomassas de cana-de-açúcar previamente a extração de hemicelulose

Os próximos três tópicos foram dedicados aos resultados dos ensaios de extração de hemicelulose realizados com prévia deslignificação, utilizando concentrações distintas de sulfito de sódio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio. As biomassas da cana-de-açúcar submetidas a deslignificação e posterior extração de hemicelulose foram o bagaço, entrenó, nó, fração externa e folha. Foram determinados o rendimento de extração, recuperação de massa, teor de lignina residual, composição em açúcares, além dos testes de condutividade e solubilidade.

5.2.1 Deslignificação com sulfito de sódio

Na extração de hemicelulose do material previamente deslignificado com sulfito de sódio 5 % (m/m), ocorreu mais extração de material do que o esperado, com valores variando entre 56,26 % até 79,02 % (Tabela 4). Esses valores assemelham-se a os encontrados por Silva, 2016, que reportaram rendimentos (de materiais/sólidos) entre 75 a 88 %. Uma vez que para a hemicelulose, espera-se algo entre 30 a 35 % de rendimento, considerando o teor de hemicelulose no material (BRIENZO et al., 2009), os valores foram mais altos. Deste modo, é provável que tenha ocorrido a formação de sal no meio junto à hemicelulose, durante a etapa

de neutralização, como reportado na literatura (FIGUEIREDO et al., 2017). A extração de hemicelulose realizada após deslignificação da biomassa com sulfito de sódio 10 % m/m, resultou em valores entre 9,14 a 33,60 % (Tabela 4), ficando mais próximo dos valores apresentados na literatura (BRIENZO et al., 2009). As extrações de hemicelulose dos materiais deslignificados com 20 % (m/m) de sulfito de sódio, apresentaram a menor amplitude/variação, com rendimentos em torno de 12,54 a 16,19 % (Tabela 4).

As extrações de hemiceluloses realizadas com as biomassas deslignificadas com sulfito de sódio 10 e 20 %, apresentaram redução na lignina residual, variando de 2,47 a 11,8 % (Tabela 4). No entanto, as extrações dos materiais previamente deslignificados com 5% do reagente sulfito de sódio apresentaram valores altos de lignina, como por exemplo, a hemicelulose extraída do entrenó, que apresentou cerca de 24% de lignina residual. Por outro lado, a hemicelulose extraída do nó previamente deslignificado, apresentou cerca de 5,63 % de lignina residual. A hemicelulose extraída do bagaço deslignificado com sulfito de sódio apresentou 17,64 % de lignina residual, o que é um conteúdo relativamente alto, comparando com os valores de 8 a 13 % obtidos por Mendes et al. (2015). Aumentar o tempo de reação e concentração de reagentes poderia ser uma alternativa para diminuir o teor de lignina residual.

A solubilidade das hemiceluloses provenientes de todos os tratamentos realizados mostraram-se melhores que a xilana comercial, tendo como valor mínimo, 70,30 % de solubilidade do entrenó deslignificado com 20 % de sulfito de sódio, e valor máximo de 95,70 % de solubilidade da fração externa deslignificada com 5 % de sulfito de sódio (Tabela 4).

A condutividade das soluções de hemicelulose provenientes de todos os tratamentos ficaram próximas ao do controle. As amostras de hemiceluloses das biomassas deslignificadas com sulfito de sódio 10 % (m/m), apresentaram valores menores do que o tampão: 8,22 a 9,32 46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, contra 10,46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 4). As hemiceluloses extraídas dos materiais deslignificados com sulfito de sódio 5%, apresentaram os maiores valores de condutividade: de 18,26 46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C para o bagaço até 21,17 46 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C a (Tabela 4), o que se supõe uma maior quantidade de sal nessas amostras, evidenciado também pela já citada quantidade de material extraído (FIGUEIREDO et al., 2017). Para as amostras de hemicelulose cujas biomassas foram deslignificadas com sulfito de sódio 20 %, os resultados ficaram próximos ao da xilana comercial (12,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C), com uma condutividade de 10,50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C para a hemicelulose do entrenó até 13,95 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C para a do bagaço, contra 12,07 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização química da hemicelulose extraída das biomassas de cana-de-açúcar parcialmente deslignificadas com sulfito de sódio.

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Sulfito de sódio (% m/m)</i>	<i>Rendimento de extração (%)</i>	<i>Glucana (%)</i>	<i>Xilana (%)</i>	<i>Arabinana (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Ácido Acético (%)</i>	<i>Condutividade (μS/cm a 25 °C)</i>	<i>Solubilidade (% m/v)</i>
<i>Bagaço</i>	5 %	68,17 ± 0,30	*	*	*	17,64 ± 0,75	*	18,26 ± 0,57	93,9 ± 0,42
	10 %	20,87	32,42	31,78	3,05	4,55	0,77	8,60	76,70
	20 %	14,30	3,10	8,15	1,13	11,87	0,16	13,95	92,00
<i>Entrenó</i>	5 %	61,58 ± 0,37	*	*	*	24,01 ± 1,80	*	21,17 ± 0,36	94,15 ± 0,21
	10 %	9,14	39,88	65,80	4,03	8,22	0,26	8,83	84,30
	20 %	12,54	11,11	21,26	2,58	5,52	0,22	10,50	70,30
<i>Nó</i>	5 %	56,26 ± 9,80	*	*	*	5,63 ± 0,30	*	20,40 ± 0,74	93,75 ± 0,35
	10 %	23,38	14,70	26,19	2,99	5,29	0,17	8,22	86,70
	20 %	16,19	3,16	10,18	1,16	9,96	0,28	13,29	87,20
<i>Fração externa</i>	5 %	79,02 ± 0,94	*	*	*	18,06 ± 0,86	*	21,05 ± 0,10	95,70 ± 0,50
	10 %	33,60	33,87	66,90	3,51	2,47	0,43	9,32	78,60
	20 %	14,43	5,16	23,08	1,07	15,86	0,24	11,35	75,90
<i>Folha</i>	5 %	*	*	*	*	*	*	*	*
	10 %	21,24	27,84	67,40	4,06	5,28	0,00	8,87	84,20
	20 %	15,34	2,96	5,74	1,36	15,39	0,24	12,26	81,30
<i>Xilana de Birchwood</i>	*	*	*	*	*	*	*	12,04	69,70
<i>Tampão acetato de sódio pH 4,8</i>	*	*	*	*	*	*	*	10,46	*

* Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2 Deslignificação com clorito de sódio

A extração de hemicelulose do bagaço previamente deslignificado com clorito de sódio em concentrações de 5, 10 e 20 % (m/m) apresentou rendimento de 11,10, 29,07 e 12,37 %, respectivamente (Tabela 5). A hemicelulose extraída da fração externa do material parcialmente deslignificado com clorito de sódio 10 %, foi a que apresentou melhor rendimento de extração de hemicelulose, com valor de 31,26%. Por outro lado, a hemicelulose do entrenó parcialmente deslignificado com clorito de sódio 5 %, foi o que apresentou o menor rendimento de extração de hemicelulose, apenas 2,45 % (Tabela 5). Os resultados de rendimento de extração de hemicelulose do material parcialmente deslignificado com clorito de sódio ficaram em um intervalo de valores entre 26 % a 31 % no bagaço de cana-de-açúcar. Outro trabalho reportou valores entre 21 e 28 % de extração de hemicelulose para diversas biomassas, como pinheiro, álamo e um tipo de gramínea chamada Switchgrass, cuja biomassa é tratada com propósito de geração de energia na Europa para (GENG et al., 2018). Uma ressalva é que os trabalhos da literatura quantificaram a hemicelulose removida do material (com base na composição química do resíduo rico em celulose após o tratamento de deslignificação). Por outro lado, o presente trabalho quantifica a hemicelulose solubilizada.

Os resultados referentes ao teor de lignina na hemicelulose da biomassa deslignificada com clorito de sódio, portam-se parcialmente coerentes com o já encontrado na literatura. Referente ao bagaço, encontra-se valores próximos aos 9 % de lignina (SIQUEIRA et al., 2013). No trabalho realizado, os valores para bagaço são 9,48, 20,88 e 7,09 %, respectivamente aos tratamentos realizados com clorito de sódio 5, 10 e 20 % m/m (Tabela 5). Já o menor valor de lignina, ficou com a hemicelulose do entrenó deslignificado com clorito de sódio 5 %, com cerca de 3,94 % (Tabela 5).

A condutividade das soluções de hemicelulose de todas as frações/biomassas parcialmente deslignificadas com clorito de sódio 5 %, apresentaram valores na faixa dos 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, superior ao valor encontrado para a xilana comercial: 12,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 5). No entanto, para todas as demais soluções de xilanas provenientes de diferentes condições de deslignificação, os valores de condutividade ficaram abaixo do valor da solução de xilana comercial, com média em torno de 7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 5).

Os testes de solubilidade referentes às hemiceluloses extraídas do material previamente deslignificado com clorito de sódio, apresentaram resultados superiores à xilana comercial (69,7 %) em todos os tratamentos realizados, e com as hemiceluloses extraídas de todas as biomassas da cana-de-açúcar (Tabela 5). O menor resultado encontrado, foi na hemicelulose

extraída da fração externa deslignificada com clorito de sódio 20 % (m/m), com valor de 74,40 % de solubilidade. Já o maior resultado encontrado, foi também na hemicelulose da fração externa, no entanto, do material lignocelulósico deslignificado com clorito de sódio 5 % m/m. O valor obtido para ela foi de 91,4 % de solubilidade. A fim de comparação, a xilana comercial apresentou apenas 69,7 % de solubilidade (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização química da hemicelulose extraídas das biomassas de cana-de-açúcar parcialmente deslignificas com clorito de sódio.

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Clorito de sódio (% m/m)</i>	<i>Rendimento de extração (%)</i>	<i>Glucana (%)</i>	<i>Xilana (%)</i>	<i>Arabinana (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Ácido Acético (%)</i>	<i>Condutividade ($\mu\text{S/cm}$ a 25 °C)</i>	<i>Solubilidade (% m/v)</i>
Bagaço	5 %	11,10 $\pm$ 0,03	*	*	*	9,48 $\pm$ 0,16	*	19,73 $\pm$ 0,84	89,9 $\pm$ 4,38
	10 %	29,07	33,38	54,55	5,017	20,88	1,90	6,87	84,80
	20 %	12,37	11,25	15,66	3,10	7,09	0,40	8,44	75,30
Entrenó	5 %	2,45 $\pm$ 0,04	*	*	*	3,94 $\pm$ 0,13	*	20,36 $\pm$ 0,80	84,05 $\pm$ 1,06
	10 %	6,53	21,14	56,90	2,35	7,88	1,96	5,47	89,60
	20 %	18,86	9,89	17,31	2,44	9,03	0,59	8,73	77,10
Nó	5 %	12,00 $\pm$ 0,06	*	*	*	14,64 $\pm$ 0,60	*	20,37 $\pm$ 0,64	84,05 $\pm$ 1,06
	10 %	11,45	22,08	52,34	2,71	14,49	1,92	7,45	86,80
	20 %	13,30	6,64	22,08	2,17	16,79	0,50	7,50	75,60
Fração externa	5 %	6,35 $\pm$ 0,01	*	*	*	6,32 $\pm$ 0,76	*	20,04 $\pm$ 0,20	91,4 $\pm$ 0,57
	10 %	31,26	26,83	43,94	4,99	6,54	2,08	6,87	87,70
	20 %	24,17	10,15	12,06	2,29	16,11	0,80	9,38	74,40
Folha	5 %	*	*	*	*	*	*	*	*
	10 %	21,19	29,52	48,99	4,70	9,24	0,81	7,15	81,50
	20 %	10,74	5,63	15,92	4,64	6,86	0,19	8,54	80,90
Xilana de Birchwood	*	*	*	*	*	*	*	12,04	69,70
Tampão acetato de sódio pH 4,8	*	*	*	*	*	*	*	10,46	*

*Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor

5.2.3 Deslignificação com peróxido de hidrogênio

Em relação à deslignificação da biomassa realizada com peróxido de hidrogênio, os rendimentos de extração de hemicelulose foram baixos para as frações com peróxido de hidrogênio 5 % m/m, com mínimo de 3,38 % e máximo de 10,31 % (Tabela 6). No entanto, para as frações deslignificadas com peróxido 10 e 20 % (m/m), os resultados de extração de hemicelulose foram melhores. Para a deslignificação da biomassa realizada com peróxido de hidrogênio 10 %, o menor valor encontrado de rendimento de extração de hemicelulose, foi com o nó, apresentando 26,22 %. O maior rendimento de extração de hemicelulose foi com a folha deslignificada com peróxido de hidrogênio 10 %, com 40,53 % (Tabela 6). Para as frações de biomassa deslignificadas com peróxido de hidrogênio 20%, o menor resultado de extração de hemicelulose foi o do bagaço, com 12,13 %, enquanto que o maior foi com o entrenó, com 47,09 % (Tabela 6). Esses resultados de rendimento de extração de hemicelulose ficaram acima do esperado, em especial para o bagaço, uma vez que resultados encontrados na literatura apontam rendimento na faixa dos 11 % (DA COSTA CORREIA et al., 2013), 36 % a menos do que o máximo reportado nesse trabalho.

Em relação à deslignificação da biomassa com peróxido de hidrogênio, os resultados de lignina da hemicelulose extraída, comparados com a literatura, se mostraram também coerentes, com valores variando de 0,6 % para a hemicelulose do nó deslignificado com peróxido de hidrogênio 5 %, até 17,6 % para a hemicelulose da folha deslignificada com peróxido de hidrogênio 20 % (Tabela 6). Excetuando-se esse último valor máximo de lignina obtido, todos os outros mostraram-se coerentes (Tabela 6) com o apresentados na literatura, que apresentam valores de 7 a 10 %, aproximadamente (DA COSTA CORREIA et al., 2013).

Nos testes de solubilidade, os valores obtidos nas hemiceluloses extraídas após deslignificação da biomassa com peróxido de hidrogênio, variaram de no máximo 94 % para a hemicelulose do nó tratado após deslignificação da biomassa com peróxido de hidrogênio 20% m/m até o mínimo de 74,40 %, encontrado na hemicelulose do bagaço do mesmo tratamento. Esses valores são superiores aos encontrados para a xilana comercial, que apresentou solubilidade de 69,7 %. Logo, evidenciando que as amostras obtidas por extração, são mais solúveis que a xilana comercial. Os resultados de condutividade mostraram valores menores que o da xilana comercial também, em sua

maioria, com valores variando entre 6,76 a 9,74 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 6). A exceção ficou por conta dos valores obtidos nas hemiceluloses extraídas após deslignificação com peróxido de hidrogênio 5 %, que apresentou entre 15 a 17 % $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 8). Para efeito de comparação, a condutividade da xilana comercial ficou em 12,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C (Tabela 6). Logo, mesmo os maiores resultados, ainda ficaram próximos à xilana comercial, o que mostra, junto aos valores de solubilidade, que essa hemicelulose tem uma boa qualidade.

Tabela 6 - Caracterização química da hemicelulose extraída das biomassas da cana-de-açúcar parcialmente deslignificadas com peróxido de hidrogênio.

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Peróxido de hidrogênio (% m/m)</i>	<i>Rendimento de extração (%)</i>	<i>Glucana (%)</i>	<i>Xilana (%)</i>	<i>Arabinana (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Ácido Acético (%)</i>	<i>Condutividade (μS/cm a 25 °C)</i>	<i>Solubilidade (% m/v)</i>
Bagaço	5 %	3,38 ± 0,02	*	*	*	3,27 ± 0,06	*	17,15 ± 0,41	86,20 ± 1,06
	10 %	27,58	38,48	66,38	3,94	3,40	2,19	7,95	87,30
	20 %	12,13	9,05	13,37	2,73	10,43	0,25	8,08	74,40
Entrenó	5 %	8,23 ± 0,01	*	*	*	9,60 ± 0,68	*	17,88 ± 1,77	87,30 ± 0,57
	10 %	29,20	33,12	57,01	3,10	7,15	2,20	6,76	89,90
	20 %	47,09	11,66	31,41	5,68	14,34	0,51	8,67	81,70
Nó	5 %	10,31 ± 0,30	*	*	*	0,60 ± 0,08	*	16,57 ± 0,04	92,60 ± 0,50
	10 %	26,22	23,20	51,45	2,70	6,86	1,94	6,40	88,10
	20 %	37,27	24,19	11,25	5,98	3,14	0,68	7,23	94,00
Fração externa	5 %	5,58 ± 0,04	*	*	*	7,45 ± 0,17	*	15,9 ± 3,00	73,80 ± 1,06
	10 %	26,33	45,91	45,91	2,55	10,41	1,94	7,64	82,60
	20 %	33,56	14,79	21,40	4,06	11,72	0,52	9,34	79,80
Folha	5 %	*	*	*	*	*	*	*	*
	10 %	40,53	53,80	53,80	5,37	10,14	1,90	7,40	85,10
	20 %	24,12	4,43	16,94	4,96	17,09	0,16	9,74	74,80
Xilana de Birchwood	*	*	*	*	*	*	*	12,04	69,70
Tampão acetato de sódio pH 4,8	*	*	*	*	*	*	*	10,46	*

* Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Caracterização química dos resíduos sólidos parcialmente deslignificados

Os dados apresentados nessa seção são referentes à caracterização química dos resíduos sólidos após os ensaios de deslignificação. A figura 12 ilustra a aparência da biomassa após deslignificação com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, nas concentrações de 20 % (m/m). Essa concentração foi escolhida por ser a condição mais “severa” em relação a todos os processos de deslignificação. A tabela 7 mostra os rendimentos obtidos em recuperação de massa, quantidade de açúcares e teores de lignina, pós deslignificação.

Figura 12 - Resíduo sólido das biomassas após deslignificação parcial com sulfito de sódio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio



Legenda: frações deslignificadas com clorito de sódio 20%: 1 – folha, 2 – entrenó, 3 – fração externa, 4 – bagaço, 5 – nó; frações deslignificadas com sulfito de sódio 20%: 6 – folha, 7 – entrenó, 8 – fração externa, 9 – bagaço, 10 – nó; frações deslignificadas com peróxido de hidrogênio 20%: 11 – folha, 12 – entrenó, 13 – fração externa, 14 – bagaço, 15 – nó.

Para as deslignificações da biomassa realizadas com peróxido de hidrogênio 20 %, pode-se observar uma recuperação de massa do resíduo sólido rico em celulose, que variou de 53,70 % para o entrenó a 76,60 % para o bagaço. Em relação ao clorito de sódio, os valores de recuperação de massa variaram de 52,80 % para o nó até 60,20 % para a

folha, o que foi melhor do que os encontrados por Geng et al., 2018 para pinheiro, álamo e switchgrass, que ficaram entre 36 a 43 %. Já para as deslignificações feitas com sulfito de sódio, esses valores ficaram entre 70,30 % para o entrenó e 81,90 % para o bagaço (Tabela 7). De acordo com esses dados, pode-se inferir que os resultados de recuperação encontrados para o sulfito de sódio foram melhores, sendo superiores aos do peróxido de hidrogênio e clorito de sódio, que se mostraram parecidos entre si.

O teor de glucana nos materiais deslignificados variou pouco, para as três condições aplicadas. Para o peróxido de hidrogênio, esses resultados variaram de 64,82 % para a folha até 73,26 % para o entrenó. Já com o clorito de sódio, os valores de glucana ficaram entre 64,82 % para a folha e 74,76 % para a fração externa. Por fim, o sulfito de sódio apresentou variação de 58,84 % no nó até 67,57 % no entrenó (Tabela 7). De maneira geral, a quantidade de glucana se mostrou maior nas biomassas deslignificadas com clorito de sódio, no entanto, a diferença em relação ao peróxido de hidrogênio não foram significativas, mas todas as frações de todos as deslignificações apresentaram valores maiores de glucana do que os reportados para o material *in natura* (38 % a 43 %) (MASARIN et al., 2011; MELATI et al., 2017).

Os resultados de xilana e arabinana mostram as quantidades de hemiceluloses nas biomassas após os processos de deslignificação. A variação para o peróxido de hidrogênio foi de 31,47 % para o entrenó até 34,46 % para o nó. Em relação ao clorito de sódio, os valores de hemicelulose ficaram entre 33,03 % na folha, e 37,73 % no bagaço. Para o sulfito de sódio, esses valores ficaram entre 34,45 % para a folha e 38,72 % para o nó (Tabela 7). De modo geral, os valores de hemicelulose se mantiveram quase constantes, com pouca variação entre as amostras. No entanto, é possível destacar que as deslignificações com sulfito de sódio apresentaram uma melhor preservação da hemicelulose se comparado aos outros dois reagentes. Comparado com os valores esperados para o material *in natura*, 25 % a 32 % (MASARIN et al., 2011), os resultados encontrados para o material deslignificado foram semelhantes, o que demonstra que esses reagentes não agiram de forma efetiva na solubilização de hemiceluloses, o que supostamente poderia alterar os rendimentos de extração.

O conteúdo de lignina para essas biomassas são importantes, uma vez que esses ensaios tratam-se de deslignificação. Os resultados de lignina residual para o peróxido de hidrogênio variaram de 7,47 % até 15,24 %, para o entrenó e nó, respectivamente. Para a deslignificação com clorito de sódio, a lignina residual variou de 5,40 % a 11,62 %,

respectivamente. Para a fração externa e folha, foram determinados valores inferiores, sendo assim melhores, aos encontrados na literatura, que ficaram entre 0,3 a 1,4 % (GENG et al., 2018). E em relação à deslignificação realizada com sulfito de sódio, os valores encontrados de lignina residual ficaram entre 1,23 % para a fração externa até 14,42 % para o entrenó (Tabela 7). A fim de comparação, os valores esperados de lignina para o material *in natura* variam de 17 a 24 %, o que mostra, de acordo com a tabela 7, que todos os ensaios de deslignificação, em especial com clorito de sódio, foram eficazes na remoção de lignina do material para posterior extração.

Os resultados reportados a seguir, referem-se à porcentagem de massa de glucana, xilana e lignina encontrados nos materiais tratados, comparados ao material *in natura* (Tabela 8). Logo, quanto maior o valor encontrado, demonstra que o tratamento realizado removeu menos componentes do material em questão, enquanto que, quanto menor o valor encontrado, maior é a remoção do material em questão.

O teor de glucana recuperada nos materiais deslignificados variou pouco para as três condições aplicadas. Para o peróxido de hidrogênio, esses resultados variaram de 85,66 % para a folha até 100 % para a fração externa. Já em relação o clorito de sódio, os valores de glucana ficaram entre 75,58 % para a folha até 100 % para a fração externa. Por fim, o sulfito de sódio apresentou variação de 86,24 % na folha até 100 % nas demais frações (Tabela 8). De maneira geral, a quantidade de glucana conservada no material se mostrou maior nas biomassas deslignificadas com sulfito de sódio, no entanto, a diferença em relação às outras frações não foram significativas.

Os resultados de xilana mostram as quantidades de hemiceluloses conservadas nas biomassas após os processos de deslignificação. A variação para o peróxido de hidrogênio foi de 55,06 % para o nó até 100 % para o bagaço. Em relação ao clorito de sódio, os valores de hemiceluloses ficaram entre 55,06 % para o nó, a 100 % no bagaço. Para o sulfito de sódio, esses valores ficaram entre 78,70 % para a fração externa até 100 % para o bagaço (Tabela 8). De modo geral, os valores de hemicelulose se mantiveram quase constantes, com pouca variação entre as amostras. No entanto, é possível destacar que as deslignificações com sulfito de sódio apresentaram uma melhor preservação da hemicelulose se comparado aos outros dois reagentes.

O conteúdo de lignina para essas biomassas são ainda mais importantes e relevantes, uma vez que esses ensaios tratam-se de deslignificação. Os resultados de lignina residual, preservados no material após a deslignificação da biomassa, para o

peróxido de hidrogênio variaram de 18,18 % até 34,84 %, para o entrenó e fração externa, respectivamente. Para a deslignificação com clorito de sódio, a lignina residual variou de 19,05 % a 24,48 %, para o bagaço e a folha, respectivamente. E em relação à deslignificação realizada com sulfito de sódio, os valores encontrados de lignina residual ficaram entre 5,80 % para a fração externa até 45,91 % para o entrenó (Tabela 8). Os valores encontrados demonstram que os tratamentos realizados, foram eficazes para a remoção de lignina nos substratos utilizados, mostrando ainda que a glucana sofre pouca ou nenhuma solubilização. Em relação às xilanas, elas apresentam uma maior solubilização, no entanto, a conservação no material ainda é maior do que 55 %.

Tabela 7 - Caracterização química dos resíduos ricos em celulose após deslignificação parcial com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, em concentração 20 % (m/m).

<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Reagente de deslignificação 20 % (m/m)</i>	<i>Recuperação de massa (%)</i>	<i>Glucana (%)</i>	<i>Xilana (%)</i>	<i>Arabinana (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Ácido Acético (%)</i>
<i>Bagaço</i>	Peróxido de hidrogênio	76,60	66,90	31,99	3,31	8,41	0,10
	Clorito de sódio	57,80	72,12	34,37	3,36	7,53	0,03
	Sulfito de sódio	81,90	60,67	32,71	3,71	10,46	0,02
<i>Entrenó</i>	Peróxido de hidrogênio	53,70	73,26	28,77	2,70	7,47	0,00
	Clorito de sódio	54,60	72,21	31,35	3,34	8,79	0,00
	Sulfito de sódio	70,30	67,57	32,71	3,86	14,42	0,05
<i>Nó</i>	Peróxido de hidrogênio	55,90	68,67	31,18	3,28	15,24	0,00
	Clorito de sódio	52,80	69,22	32,94	3,86	10,90	0,12
	Sulfito de sódio	74,00	58,84	33,70	5,02	9,75	0,07
<i>Fração externa</i>	Peróxido de hidrogênio	65,11	66,70	30,28	3,54	8,33	0,56
	Clorito de sódio	54,80	74,76	32,60	3,34	5,40	0,00
	Sulfito de sódio	71,30	66,87	32,12	3,48	1,23	0,03
<i>Folha</i>	Peróxido de hidrogênio	68,20	64,82	29,17	4,21	13,78	0,00
	Clorito de sódio	60,20	64,82	28,62	4,41	11,62	0,00
	Sulfito de sódio	72,50	61,34	29,29	5,16	13,85	0,00

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 8 - Caracterização química dos resíduos ricos em celulose após deslignificação parcial com peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, em concentração 20 % (m/m). Resultados em % de massa recuperada em relação ao material in natura.

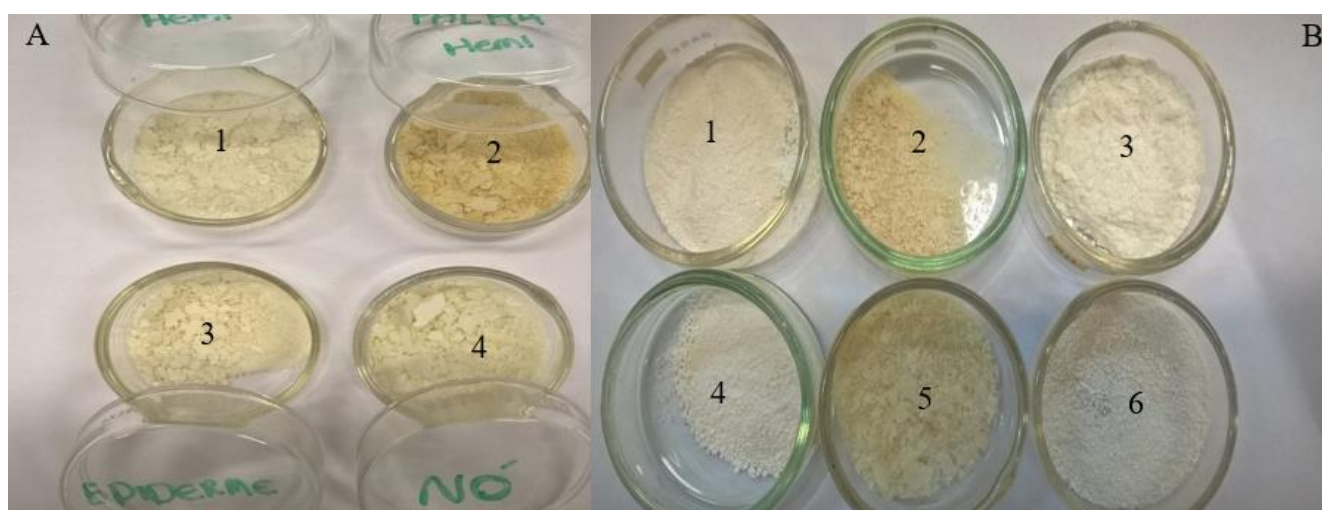
<i>Biomassa de cana-de-açúcar</i>	<i>Reagente de deslignificação 20 % (m/m)</i>	<i>Recuperação de massa (%)</i>	<i>Glucana (%)</i>	<i>Xilana (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>
<i>Bagaço</i>	Peróxido de hidrogênio	76,6	100,00	100,00	27,71
	Clorito de sódio	57,8	98,58	100,00	19,05
	Sulfito de sódio	81,9	100,00	100,00	37,23
	In natura	*	100,00	100,00	100,00
<i>Entrenó</i>	Peróxido de hidrogênio	53,7	86,18	62,35	18,18
	Clorito de sódio	54,6	86,40	69,23	21,81
	Sulfito de sódio	70,3	100,00	93,12	45,91
	In natura	*	100,00	100,00	100,00
<i>Nó</i>	Peróxido de hidrogênio	55,9	95,76	55,06	32,20
	Clorito de sódio	52,8	91,02	55,06	21,97
	Sulfito de sódio	74,0	100,00	78,80	27,27
	In natura	*	100,00	100,00	100,00
<i>Fração externa</i>	Peróxido de hidrogênio	65,1	100,00	67,70	34,84
	Clorito de sódio	54,8	100,00	61,51	19,35
	Sulfito de sódio	71,3	100,00	78,70	5,80
	In natura	*	100,00	100,00	100,00
<i>Folha</i>	Peróxido de hidrogênio	68,2	85,66	78,35	32,87
	Clorito de sódio	60,2	75,58	67,72	24,48
	Sulfito de sódio	72,5	86,24	83,46	34,97
	In natura	*	100,00	100,00	100,00

*Dados não obtidos. Fonte: elaborado pelo autor

5.4 Deslignificação da hemicelulose extraída

Com o objetivo de reduzir o teor de lignina residual nas hemiceluloses obtidas foi empregado uma estratégia de deslignificação da xilana. Neste estudo foi utilizada a hemicelulose extraída da fração externa da cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio 6%. Esta hemicelulose foi escolhida por ter apresentado um melhor rendimento geral nos demais ensaios: extração de hemicelulose com 6 % de peróxido, e nas deslignificações das biomassas realizadas com sulfito de sódio, peróxido de hidrogênio e clorito de sódio, anteriores à extração. Os agentes de deslignificação empregados foram peróxido de hidrogênio, clorito de sódio e sulfito de sódio, em concentração de 10 % (m/m). Esta concentração de agente deslignificante foi escolhida por ter apresentado melhor resultado nos ensaios de deslignificação das biomassas de cana-de-açúcar (Tabelas 4,5 e 6). A figura 13 ilustra a hemicelulose antes e depois da deslignificação, A e B, respectivamente. É possível observar que a coloração do material se torna mais claro de acordo com a redução da quantidade de lignina. Ressalta-se que não foi encontrado na literatura estudos de deslignificação de hemicelulose.

Figura 13 - Aspecto visual/coloração da hemicelulose extraída com peróxido de hidrogênio e deslignificada com sulfito de sódio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio.



Legenda: **A:** 1 - hemicelulose do bagaço; 2 - hemicelulose da folha; 3 - hemicelulose da fração externa; 4- hemicelulose do nó. **B:** 1 e 4 - hemicelulose deslignificada com clorito de sódio; 2 e 5 - hemicelulose deslignificada com sulfito de sódio; 3 e 6: hemicelulose deslignificada com peróxido de hidrogênio.

A recuperação de massa na deslignificação da hemicelulose realizada com sulfito de sódio 10 % (m/m) com 78,4 % foi a maior, sendo a menor com clorito de sódio 10 % m/m 87,08 % (Tabela 9). Em relação aos teores de lignina inicial e residual, o peróxido de hidrogênio resultou em melhor deslignificação, com redução de 58,44 % do teor inicial de lignina para o teor de lignina residual, caindo dos iniciais 6,04 % para 2,51 %. Os ensaios de deslignificação com clorito de sódio e sulfito de sódio apresentaram resultados de lignina residual semelhantes, com 5,52 % e 5,82 %, respectivamente. Em relação ao teor inicial de lignina, que apresentou resultado de 6,04 %, os ensaios com clorito de sódio e sulfito de sódio não se mostraram eficientes como os realizados com peróxido de hidrogênio (Tabela 9).

A solubilidade das hemicelulose deslignificadas apresentaram valores próximos, sendo o material tratado com peróxido de hidrogênio a mais solúvel, com 95,95 % de solubilidade, seguido pelo clorito de sódio com 95,05 % e o sulfito de sódio com 94,2 % (Tabela 9). Logo, a solubilidade das hemiceluloses deslignificadas foram superiores ao da xilana comercial (69,70 %), e às hemiceluloses não deslignificadas (80,67 %).

Uma vez que as hemiceluloses foram precipitadas novamente com etanol, poderia ocorrer a formação de sal, sendo então determinada a condutividade em solução. A hemicelulose deslignificada com peróxido de hidrogênio apresentou 13,68 uS/cm a 25 °C, enquanto que a deslignificada com clorito de sódio apresentou 13,57 uS/cm a 25 °C. A hemicelulose deslignificada com sulfito de sódio apresentou um valor maior, com 20,67 uS/cm a 25 °C (Tabela 9). No entanto, nenhuma das soluções de hemicelulose ficaram discrepantes do valor da solução de xilana comercial, que foi de 12,04 uS/cm a 25 °C. Salienta-se que a formação de sal pode ser resolvida com o processo de lavagem com etanol, sendo desejável a redução do número de lavagens por questões de custos operacionais (FIGUEIREDO et al., 2017).

Tabela 9 - Deslignificação de hemicelulose extraída de fração externa com peróxido de hidrogênio 6 %, e seu teor de lignina residual, solubilidade e condutividade.

Reagente de deslignificação (10 %, m/m)	Recuperação de massa (%)	Lignina inicial (%)	Lignina residual (%)	Solubilidade (%)	Condutividade (uS/cm a 25 °C)
Peróxido de hidrogênio	79,03 ± 6,35	6,04 ± 1,67	2,51 ± 0,28	95,95 ± 3,32	13,68 ± 0,13
Clorito de sódio	87,08 ± 3,41	6,04 ± 1,67	5,52 ± 0,43	95,05 ± 0,21	13,57 ± 0,13
Sulfito de sódio	78,4 ± 9,48	6,04 ± 1,67	5,82 ± 0,69	94,2 ± 0,71	20,67 ± 0,05
Xilana de Birchwood	*	*	*	69,70	12,04
Tampão acetato de sódio pH 4,8	*	*	*	*	10,46

*Dados não determinados. Fonte: elaborado pelo autor.

5.5 Atividade enzimática de xilanase utilizando hemiceluloses extraídas

Os resultados obtidos nas atividades enzimáticas realizadas com xilanase comercial estão apresentados na tabela 10. Para esses ensaios, utilizou-se o extrato enzimático Celluclast (Novozymes). Os substratos utilizados foram as hemiceluloses da fração externa obtidas nesse trabalho.

Dentre os resultados obtidos, excetuando-se as hemiceluloses que passaram por deslignificação com clorito de sódio 10% e sulfito de sódio 10 % (58,30 e 84,60 UI mL⁻¹, respectivamente), todas as outras apresentaram atividade enzimática maior do que a xilose comercial (106,37 UI mL⁻¹). Destaca-se as hemiceluloses cujos substratos sofreram prévia deslignificação com peróxido de hidrogênio 5 e 10 % (174,97 e 166,12 UI mL⁻¹), que apresentaram uma atividade enzimática maior. Era esperado que, com uma maior quantidade de lignina, a atividade enzimática poderia diminuir, devido à maior dificuldade de ação da enzima no substrato. A cadeia de xilana provavelmente está protegida em algumas regiões pela lignina. Outro efeito negativo que poderia ter ocorrido pela presença de lignina é a adsorção improdutiva, indisponibilizando enzima para a reação. No entanto, as maiores atividades foram determinadas com os substratos com maior quantidade de lignina (Tabela 10). Os teores de lignina neste estudo parecem não terem afetado a determinação de atividade enzimática.

A cadeia de xilana apresenta certa complexidade na sua hidrólise, necessitando uma grande diversidade de enzimas xilanolíticas/acessórias, com diferentes especificidades, características físicas, químicas e bioquímicas para sua completa hidrólise (POLIZELI et al., 2005). De acordo com Gonçalves et al. (2012), os principais fatores que influenciam a eficiência da hidrólise da xilana são o comprimento da molécula e o seu grau de substituição. Por outro lado, uma característica aqui estudada que pode influenciar a atividade é a solubilidade. Esta característica foi melhor para as xilanas obtidas neste trabalho do que a comercial. Provavelmente, este fator tenha contribuído para obter melhor atividade enzimática comparando com a comercial.

Tabela 10 - Determinação de atividade enzimática com xilanase comercial utilizando como substrato as xilanas extraídas da fração externa.

<i>Procedência</i>	<i>UI mL⁻¹</i>	<i>Teor de lignina (%)</i>
Xilana comercial – Sigma Aldrich	106,37 ± 10,46	*
3% peróxido de hidrogênio	143,11 ± 18,67	10,49 ± 1,76
6% peróxido de hidrogênio	138,23 ± 11,55	6,04 ± 1,67
Da biomassa deslignificada com 5% peróxido de hidrogênio	174,97 ± 17,30	7,45 ± 0,17
Da biomassa deslignificada com 10% peróxido de hidrogênio	166,12 ± 23,14	10,41
Hemicelulose deslignificada com 10 % peróxido de hidrogênio	136,87 ± 21,56	2,51 ± 0,28
Hemicelulose deslignificada com 10% clorito de sódio	58,30 ± 30,34	5,52 ± 0,43
Hemicelulose deslignificada com 10% sulfito de sódio	84,60 ± 11,57	5,82 ± 0,69

* Dados não determinados Fonte: elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÕES

As extrações de hemicelulose com peróxido de hidrogênio com concentrações de 3 e 6 % demonstrou que a redução de reagente influencia diretamente a quantidade de material extraído. Uma exceção foi observada para a biomassa de entrenó, que não apresentou diminuição significativa de rendimento. Uma suposição para esse resultado, está ligado ao fato dessa fração ser menos recalcitrante que as demais em estudo. Logo, diante desses resultados, se a extração com peróxido de hidrogênio 3 % for realizada apenas com entrenó, ganha-se em economia de reagente, tornando o processo de extração menos oneroso.

Avaliando todos os processos de deslignificação das biomassas para posterior extração de hemicelulose, pode-se afirmar que, considerando todos os parâmetros avaliativos da extração (rendimento sem e com prévia deslignificação, teor de lignina, solubilidade, condutividade): o peróxido de hidrogênio foi o reagente que apresentou maior remoção de lignina; as hemiceluloses foram melhor conservadas, em relação a teores de açúcares, com as deslignificações realizadas com peróxido de hidrogênio; os melhores rendimentos de extração de hemicelulose foram reportados nas deslignificações realizadas com peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos nesse trabalho, também demonstram que a melhor estratégia é realizar a extração de hemicelulose sem deslignificar a biomassa e, posteriormente realizar a deslignificação do material extraído, obtendo assim, melhor custo-benefício nos processos de extração e qualidade da hemicelulose.

Em relação aos resíduos sólidos obtidos após a deslignificação das biomassas, conclui-se que a recuperação de massa foi maior nas frações deslignificadas com sulfito de sódio. A remoção de lignina foi melhor nas frações deslignificadas com clorito de sódio. E, os açúcares se mostraram mais conservados nas frações deslignificadas com sulfito de sódio.

As hemicelulose extraídas apresentaram-se apropriadas para determinação de atividade enzimática de xilanase. As hemiceluloses extraídas da biomassa previamente deslignificadas com peróxido de hidrogênio em concentrações de 5% e 10% apresentaram melhores resultado de atividade enzimática. Os teores de lignina residual na hemicelulose parecem não terem influenciado na atividade da xilanase, talvez um efeito suprimido pela alta solubilidade das hemicelulose.

REFERÊNCIAS

- ADEN, A.; WERP, T.; PETERSEN, G.; BOZELL, J.; HOLLADAY, J.; WHITE, J.; JONES, S. **Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. DEPARTMENT OF ENERGY WASHINGTON DC, 2004.
- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- AL-DAJANI, W. W.; TSCHIRNER, U. W. Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part I: alkaline extraction. **Tappi J**, v. 7, n. 6, p. 3-8, 2008.
- ALMEIDA, M. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013. 35p. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em conservação e manejo de recursos naturais, Cascavel, 2013.
- ALONSO, D. M.; BOND, J. Q.; DUMESIC, J. A. Catalytic conversion of biomass to biofuels. **Green Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1493-1513, 2010.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise (USA)**, 1980.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. **Science**, v. 223, n. 4633, p. 283-285, 1984.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT. The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in Australia Bundaberg, Australia, 6-7, 2004.
- AZUMA, J.; KATAYAMA, T.; KOSHIJIMA, T. < Original> Microwave Irradiation of Lignocellulosic Materials: VIII. Microwave Irradiation of the Neutral Fraction (CIM) of Pine Bjorkman LCC. 1986.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BANERJEE, P. N.; PRANOVICH, A.; DAX, D.; WILFOR, S. Non-cellulosic heteropolysaccharides from sugarcane bagasse–Sequential extraction with pressurized hot water and alkaline peroxide at different temperatures. **Bioresource technology**, v. 155, p. 446-450, 2014.
- BIAN, J., PENG, F., PENG, X. P., XIAO, X., PENG, P., XU, F., & SUN, R. C. Effect of [Emim] Ac pretreatment on the structure and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulose. **Carbohydrate polymers**, v. 100, p. 211-217, 2014.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.286- 290, 1985.

BIGELIS, R. Primary metabolism and industrial fermentations. Gene manipulations in fungi. **New York: Academic Press**, p. 357-401, 1985.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; & BAUCHER, M. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.

BOUDET, A.M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plantm Science**, v.8, p.576-581, 2003.

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

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-1205, 2010.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009.

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, n. 2, p. 253-262, 2015.

BRIENZO, Michel et al. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1454-1465, 2014.

BRIENZO, Michel. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BRILLOUET, J.M.; JOSELEAU, J.P. Investigation of the structure of a heteroxylans from the outer pericarp (Beeswing bran) of wheat kernel. **Carbohydrate Research**, v. 159, p. 109–126, 1987.

BUSSE-WICHER, M., GRANTHAM, N. J., LYCZAKOWSKI, J. J., NIKOLOVSKI, N., & DUPREE, P. Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 74-78, 2016.

CAI, Z. S.; PASZNER, L. Salt catalyzed wood bonding with hemicellulose. **Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v. 42, n. 1, p. 11-20, 1988.

CAMACHO, N.A.; AGUILAR, O.G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 104, n. 3, p. 159-172, 2003.

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

CARVALHO, L. I. C. ASPERGILLUS E ASPERGILOSE – DESAFIOS NO COMBATE DA DOENÇA. Universidade Fernando Pessoa - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Porto, p. 43. 2013.

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

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 1. Brasília: Conab, 2017.

COSTA, T. H.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T. O.; MILAGRES, A. M.; FERRAZ, A. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202-211, 2013.

DA COSTA CORREIA, J. A., JÚNIOR, J. E. M., GONÇALVES, L. R. B., & ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. **Bioresource technology**, v. 139, p. 249-256, 2013.

DALE, B. E.; WYMAN, C. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005.

DE FIGUEIREDO, F. C., CARVALHO, A. F. A., BRIENZO, M., CAMPIONI, T. S., & de OLIVA-NETO, P. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource technology**, v. 228, p. 164-170, 2017.

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

DE SOUZA, A. P.; LEITE, D. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In: **Macromolecular Symposia**. WILEY-VCH Verlag, 2005. p. 1-12.

FADEL, M. Production Physiology of cellulases and β -glycosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid-state fermentation conditions. *J. Biol. Sci.*, 1(5), p.401- 411, 2000.

FARES, K.; RENARD, C. M.; CREPEAU, M. J.; THIBAUT, J. F. Characterization of hemicelluloses of sugar beet roots grown in Morocco. **International journal of food science & technology**, v. 39, n. 3, p. 303-309, 2004.

FARIA, K. C. P.; GURGEL, R. F.; HOLANDA, J. N. F. Recycling of sugarcane bagasse ash waste in the production of clay bricks. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p. 7-12, 2012.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 506-508, 2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, v. 613, p. 1960-82, 1984

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

GANGA, M.A.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 47, n. 3, p.171-178, 1999.

GAO, X.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Fast hemicellulose quantification via a simple one-step acid hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 1088-1096, 2014.

GAO, X.; ZENG, J.; HELMS, G.; CHEN, S. Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10848-10857, 2013.

GLAZER, A. W., NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. San Francisco: W. H. Freeman, p. 340. 1995.

GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; PAES LEME, A. F.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource technology**, v. 119, p. 293-299, 2012.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. D.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GURUNATHAN, T., MOHANTY, S., NAYAK, S. K. A Review of the Recent Developments in Biocomposites Based on Natural Fibres and Their Application Perspectives. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 77, p. 1–25, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.**, 58, p.137-161, 1996.

HELMERIUS, Jonas et al. Impact of hemicellulose pre-extraction for bioconversion on birch Kraft pulp properties. **Bioresource technology**, v. 101, n. 15, p. 5996-6005, 2010.

HIMMEL, M. E.; JEOH, T. ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; ADNEY, W. S.; JOHNSON, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112-122, 2007.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HSU T. A. Pretreatment of biomass. **Handbook on bioethonal production and utilization**. Washington, DC: Taylor & Francis, 1996.

JACQUEMIN, L.; MOGNI, A.; ZEITOUN, R.; GUINOT, C.; SABLAYROLLES, C.; SAULNIER, L.; PONTALIER, P. Y. Comparison of different twin-screw extraction conditions for the production of arabinoxylans. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 86-94, 2015.

JIN, A. X.; REN, J. L.; PENG, F.; XU, F.; ZHOU, G. Y.; SUN, R. C.; KENNEDY, J. F. Comparative characterization of degraded and non-degradative hemicelluloses from barley straw and maize stems: Composition, structure, and thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 609-619, 2009.

JOSÉ, C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, Á. T.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322-338, 2015.

KENEALY, W. R.; HOUTMAN, C. J.; LAPLAZA, J.; JEFFRIES, T. W.; HORN, E. G. Pretreatments for converting wood into paper and chemicals. **Materials, Chemicals, and Energy from Forest Biomass**, New York, p. 392–408, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. London: **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, vol. 56, p. 1-24, 1997.

LEE, C.; TENG, Q.; HUANG, W.; ZHONG, R.; YE, Z. H. Down-regulation of PoGT47C expression in poplar results in a reduced glucuronoxylan content and an increased wood digestibility by cellulase. **Plant and cell physiology**, v. 50, n. 6, p. 1075-1089, 2009.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: **Sarvier**, 2014.

LERAYER, A. Biotecnologia na Indústria de Alimentos. Pesquisadora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Laticínios, Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas e Conselheira do CIB. Apresentação Técnica, Conselho de informações sobre biotecnologia. Disponível em: <http://www.cib.org.br>. Acesso em 08/03/2017.

LIU, S. Chemical kinetics of alkaline peroxide brightening of mechanical pulps. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 2229 – 2244, 2003.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265–275.

LUNDQVIST, J.; TELEMAN, A.; JUNEL, L.; ZACCHI, G.; DAHLMAN, O.; TJERNELD, F. Sta lbrand, H., 2002. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 29-39.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B. Carbohydrates of the barley grain. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. **Barley: chemistry and technology**. American Association of Cereal Chemists (AACC), 1993.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I.; FELIPE, M. G. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1677-1683, 2003.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C.; BARBOSA, M. H.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; & MILAGRES, A. M. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.

MELATI, R.B.; SCHMATZ, A.A.; BRIENZO, M.; CONTIERO, J.; PAGNOCCA, F.C. Sugarcane Bagasse: Production, Composition, Properties, and Feedstock Potential. **Production Systems, Uses, and Economic Importance**, p. 1-38, 2017.

MENDES, F. M., HEIKKILÄ, E., FONSECA, M. B., MILAGRES, A. M., FERRAZ, A., & FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 60-67, 2015.

MENDES, F. M.; FONSECA, M. B.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. Anatomic and ultrastructural characteristics of different regions of sugar cane internodes affect their response to alkaline-sulfite pretreatment and material recalcitrance. **Energy & Fuels**, 2015.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.

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

MILLER, J. D.; GILBERT, R. A.; ODERO, D.C. **Sugarcane botany: a brief view**, 2012. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/sc034>> Acesso em 12 fev. 2016.

MINAMI, P. S. (2003). Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico Das Micoses, Copyright, **Editora Manole Brasil**, pp. 47-50.

MOGHADDAM, L., ZHANG, Z., WELLARD, R. M., BARTLEY, J. P., O'HARA, I. M., & DOHERTY, W. O. Characterisation of lignins isolated from sugarcane bagasse pretreated with acidified ethylene glycol and ionic liquids. **biomass and bioenergy**, v. 70, p. 498-512, 2014.

MORANA, A.; MANGIONE, A.; MAURELLI, L.; FIUME, I.; PARIS, O.; CANNIO, R.; ROSSI, M. Immobilization and characterization of a thermostable - xylosidase to generate a reusable biocatalyst. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 1205-1213, 2006.

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, n. 6, p. 673-686, 2005.

MURRAY, P. R., ROSSENTHAL, K. S. e PFALLER, M. A. (2006). **Microbiologia: Médica**, 5ª edição, Elsevier Editora Ltda, pp. 770-773.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulasas em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 19, n. 1, p. 78-81, 1988.

OOSTERVELD, A.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 2, p. 185-197, 2000.

PELCZAR, M.J. et al. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Vol. 1. 2ª. Ed. **Makron Books**, 1997.

PENG, Feng; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n.5, p. 577 - 591, 2005.

POLIZELI, M.L.T.M.; ANDRADE, S.V.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem.** v. 39, p. 1931-1938, 2004.

POLIZELLI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005

PRADE, R.A. Xylanases, from biology to biotechnology. **Biotechnol. Gen. Engin. Rev.**, v. 13, p. 101-131, 1995.

PRODUCTS AND SOLUTIONS NOVOZYMES. Disponível em: <http://www.novozymes.com>. Acesso em: 17 mar. 2017.

PSZCZOLA, D.E. From soybean to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technol.**, v.55, p. 54-64, 2001.

PU, Y.; ZHANG, D.; SINGH, P. M.; & RAGAUSKAS, A. J. The new forestry biofuels sector. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 58-73, 2008.

PULS, J.; POUTANEN, K.; KORNER, H. U.; VIIKARI, L. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 416-423, 1985.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK JR. W. J.; HALLET, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

REN, J. L.; LIU, C. F., XU, F., LIU, J. J., SUN, J. X., & SUN, R. C. 2006 - LIU, C. F.; REN, J. L.; XU, F.; LIU, J. J.; SUN, J. X.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose obtained from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5742-5748, 2006.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. Tese (Doutorado em Físico-Química) - IQSC, USP, São Carlos-SP, 2000.

ROSE, J. K. C. and BENNETT, A. B., Cooperative Disassembly of the Cellulose-Xyloglucan Network of Plant Cell Walls: Parallels Between Cell Expansion and Fruit Ripening, **Trends Plant Sci.** 4, 176-83 (1999).

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 205-211, 2004.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SAHA, B. Purification and properties of an extracellular -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource technology**, v. 90, p. 33- 38, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANJUAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v. 59, n. 6, p. 447-450, 2001.

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

SCOPES, R. K. Protein purification: principles and practice. 3a ed. **New York: Springer-Verlag**, 380 p. 1994.

SILVA, Daniele Sporck Gonçalves da. **Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual**. 2016. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-06022017-101817/>>. Acesso em: 2017-12-02.

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, n. 1, p. 1, 2011.

SIQUEIRA, G., VÁRNAI, A., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399-402, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. In: **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, 2010.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresour. Technol.**, v. 72, n.3, p. 253-260, 2000.

STUDER, M. H.; DEMARTINI, J. D.; DAVIS, M. F.; SYKES, R. W.; DAVISON, B.; KELLER, M.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 15, p. 6300-6305, 2011.

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, n. 2, p. 195-204, 2004.

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 wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 3, p. 263-271, 2002.

SUN, R.; LAWOTHER, J. M.; BANKS, W. B. Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. **Journal of applied polymer science**, v. 60, n. 11, p. 1827-1837, 1996.

SUN, R.; LAWOTHER, J. M.; BANKS, W. B. Isolation and characterization of hemicellulose B and cellulose from pressure refined wheat straw. **Industrial Crops and products**, v. 7, n. 2, p. 121-128, 1998.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TIMELL, T. E. Wood hemicellulose. Part II: **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 19, p. 247-302, 1964.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMTERTZ, O. S., CANDEIAS, J. A. N. (1999). **Microbiologia**. São Paulo: Editora Ateneu, 3a ed. 588p.

URBANOWICZ, B. R.; PEÑA, M. J.; RATNAPARKHE, S.; AVCI, U.; BACKE, J.; STEET, H. F.; DARVILL, A. 4-O-methylation of glucuronic acid in Arabidopsis glucuronoxylan is catalyzed by a domain of unknown function family 579 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 35, p. 14253-14258, 2012.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SANDDLER, J.N. Multiplicity of -1-4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 305- 317, 1988.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

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**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005.

XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. In: SUN, R. C. **Cereal straw as a resource of sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose**, p. 9-47, 2010.

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali-and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 2, p. 253-261, 2006.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.

YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Mango ripening—chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1335-1342, 2005.

YILMAZ CELEBIOGLU, H.; CEKMECELIOGLU, D.; DERVISOGLU, M.; KAHYAOGU, T. Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimisation for industrial processes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 12, p. 2597-2605, 2012.

YOON, H.G.; JUNG, H.; PARK, W.; CHOI, C.; WILSON, D. B.; SHIN, D. H.; KIM, Y. J. Effect of sodium hydroxide treatment of bacterial cellulose on cellulase activity. **Cellulose**, v. 15, n. 3, p. 465-471, 2008.

YORK, W. S.; O'NEILL, M. A. Biochemical control of xylan biosynthesis—which end is up?. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 258-265, 2008.

YUAN, T. Q.; XU, F.; HE, J.; SUN, R. C. Structural and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasound-assisted extractions of partially delignified fast-growing poplar wood through organic solvent and alkaline solutions. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 5, p. 583-593, 2010.

ZAKZESKI, J.; BRUIJNINCX, P. C.; JONGERIUS, A. L.; WECKHUYSEN, B. M. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552-3599, 2010.