

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA  
(MESTRADO)**

---

**Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial  
da lignina e a sacarificação enzimática**

**GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo.

**Rio Claro**

**2018**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA  
(MESTRADO)**

---

**Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial  
da lignina e a sacarificação enzimática**

**GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO**

**Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo**

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

**Rio Claro**

**2018**

547.758 Azevedo, Gabriel Oliveira de  
A994p Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a  
área superficial da lignina e a sacarificação enzimática /  
Gabriel Oliveira de Azevedo. - Rio Claro, 2018  
79 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Enzimas. 2. Cana-de-açúcar. 3. Lignina. 4.  
Pré-tratamento ácido diluído. 5. Deslignificação. 6. Hidrólise  
enzimática. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial da lignina e a digestibilidade enzimática

**AUTOR: GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO**

**ORIENTADOR: JONAS CONTIERO**

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

  
Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

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

Dr. CELSO BARBOSA DE SANT'ANNA FILHO

Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida / Instituto Nacional de Metrologia (Videoconferência)

  
Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2018

Título alterado para: "Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial da lignina e a sacarificação enzimática"

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Michel Brienzo, pela paciência e dedicação em me guiar pelos trilhos da ciência.

A meus pais Amauri e Roseli, por terem sido minha inspiração até os dias de hoje.

A minha namorada Michele, pela paciência e por me acompanhar durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Aos professores, Fernando Pagnocca, Jonas Contiero, Márcia Braga e Maria Aparecida Marin Morales, por terem cedido seus espaços de pesquisa em partes fundamentais deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Bioetanol e o papel da biomassa lignocelulósica.....	9
2.2 Heterogeneidade da biomassa de cana-de-açúcar .....	11
3. LIGNINA.....	14
3.1 Definição e Função .....	14
3.2 Impacto da lignina em processos biotecnológicos .....	17
3.3 Determinação de lignina.....	19
3.4 Aplicações tecnológicas da lignina.....	22
4. PRÉ-TRATAMENTOS .....	25
4.1 Pré-tratamento ácido .....	25
4.2 Pré-tratamento por explosão de vapor .....	27
4.3 Pré-tratamento com clorito de sódio - deslignificação.....	28
5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	30
6. OBJETIVOS.....	35
7. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
7.1 Separação das frações .....	36
7.2 Pré-tratamento com ácido diluído .....	36
7.3 Deslignificação branda com clorito de sódio (NaClO <sub>2</sub> ) após pré-tratamento com ácido .....	36
7.4 Determinação da Atividade enzimática.....	37
7.5 Hidrólise enzimática das amostras .....	38
7.6 Composição química dos materiais.....	38
7.7 Preparo do corante Azure B, determinação da absortividade molar e padronização de parâmetros .....	39
7.8 Determinação da superfície exposta ou área superficial da lignina (ASL) e área superficial específica da lignina (ASEL).....	39
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
8.1 Pré-tratamento ácido diluído.....	41
8.2 Deslignificação branda com clorito de sódio do material pré-tratado com ácido.....	43
8.3 Composição química das biomassas de cana-de-açúcar .....	46
8.4 Área de superfície da lignina .....	54
8.4.1 Padronização do tempo, temperatura e agitação na adsorção do corante Azure B em material lignocelulósico. ....	54

8.4.2 Área superficial da lignina (ASL) e específica (ASEL) nas biomassas de cana-de-açúcar pré-tratadas.....	56
8.5 Hidrólise enzimática das biomassas de cana-de-açúcar .....	63
9. CONCLUSÃO .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## Resumo

O aproveitamento de resíduos é uma das questões amplamente discutidas no cenário ambiental e econômico no mundo todo. O desenvolvimento de tecnologias que possam dar destinos apropriados a resíduos que seriam descartados de forma imprópria, pode também movimentar a economia com produção de energia e moléculas de valor agregado. O bagaço de cana-de-açúcar é um destes resíduos, utilizado atualmente para a cogeração de energia, agora se apresenta, graças a novas tecnologias desenvolvidas, como uma matéria-prima então empregado para a produção de etanol, polímeros entre outros compostos que possuem valor agregado. Alguns desafios, no entanto, precisam ser superados, a lignina, um dos componentes dessa biomassa como é uma barreira a ação de enzimas que realizam a hidrólise dos polissacarídeos presentes nesse material. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de pré-tratamentos e seu impacto em diferentes frações da biomassa de cana-de-açúcar. Dois diferentes pré-tratamentos foram empregados, um com ácido sulfúrico diluído (5, 10 e 20 % m/m, a 121°C/30 min), seguindo de uma deslignificação branda com clorito de sódio (30 % m/m, a 70°C/1 h). A área superficial da lignina foi determinada o corante catiônico Azure B em solução de 0,1 g/ml. Hidrólises enzimática (15 FPU/g por 24 h – Cellic Cetec 2 – Novozymes) foi aplicada nos materiais para avaliar o rendimento em glicose. O pré-tratamento ácido diluído removeu até 40% da hemicelulose de todas as frações em estudo. A deslignificação branda com clorito de sódio diminui o teor de lignina nos materiais, originando um material rico em celulose. O corante Azure B permitiu determinar a superfície ocupada pela lignina após o pré-tratamento ácido, e a residual após a deslignificação. A fração e condição com maior área superficial total de lignina foi a folha pré-tratada com ácido a 5 % com 52 m<sup>2</sup>/g de material. A fração externa apresentou a maior área superficial específica (240 m<sup>2</sup>/g) após a aplicação de deslignificação. Os resultados indicam que a redução na área superficial da lignina impacta positivamente no rendimento em glicose de hidrólise enzimática

**Palavras chave:** cana-de-açúcar, lignina, pseudo-lignina, pré-tratamento ácido diluído, deslignificação, hidrólise enzimática

## Abstract

The reutilization of residues is a contemporary question in the environmental and economic scenario in the world. The development of technologies that could give proper destination to residues that would be discarded, could as well generate income by producing energy and chemical molecules of economic interest. The sugarcane bagasse is one of these sub products, used mostly for energy generation through its burning, presents itself now as an alternative to the production of biofuels due to the development of new strategies and technologies. Some challenges remain nonetheless, lignin, one of lignocellulosic biomass main components acts like a barrier, blocking the interaction between enzymes and the polysaccharides. In this context, the present study aimed to show the effect of two distinct pretreatments and their combination and its impacts in the lignocellulosic biomass digestibility. The pretreatments employed were dilute sulfuric acid (5, 10 and 20 % w/w, at 121°C/30 min), followed by a delignification with sodium chlorite (30 % w/w at 70°C/ 1 h). The lignin surface area was determined by the cationic dye Azure B in solution of 0.1 g/mL. Enzymatic hydrolysis (15 FPU/g for 24 h – Cellic Ctec 2 - Novozymes) of the material was employed to assess the glucose yield. The dilute acid pretreatment removed part of the hemicellulose in all fractions in study. The delignification with sodium chlorite reduced the lignin content in all samples, consequently increasing the overall glucan content. The Azure B dye detected the lignin surface area after the dilute acid pretreatment, and its remaining area after the delignification. The fraction with highest surface area was the leaves pretreated with 5% of diluted acid, resulting in 52 m<sup>2</sup>/g of material. The external fraction showed the highest specific surface area with 240 m<sup>2</sup>/g of lignin after the delignification procedure. The results of enzymatic hydrolysis and lignin surface area imply that the reduction of lignin surface area results in an increase in enzymatic hydrolysis for all fractions in study.

Keywords: sugarcane, lignin, pseudo-lignin, dilute acid pretreatment, delignification, enzymatic hydrolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

O resíduo fibroso resultante da remoção do “suco” da cana-de-açúcar (sacarose), e sua maceração é chamado de bagaço de cana-de-açúcar, um dos resíduos de agricultura mais abundantes no planeta (FERNANDES et al., 2017). Diversas aplicações deste resíduo estão descritas como estudo na literatura, as quais vão desde a produção de papel, até a produção de biocombustíveis (LOH et al., 2013). Estratégias de utilização do bagaço para a geração de energia, principalmente na forma de biocombustíveis líquidos vêm sendo estudadas ao longo dos anos. A possibilidade de gerar energia sustentável associado com o baixo custo do bagaço, o tornam um alvo para o desenvolvimento de novas tecnologias nesta área (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Porém, o material lignocelulósico é recalcitrante e precisa de pré-tratamento para modificar sua estrutura.

Os constituintes principais do bagaço são: celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, sendo os três primeiros constituintes os presentes em maior quantidade. A alta composição em polissacarídeos favorece a sua aplicação em reações de hidrólise gerando carboidratos simples, os quais são empregados em fermentações para geração de produtos, sendo o principal o etanol (REZENDE et al., 2011). De forma semelhante a outras plantas, os polissacarídeos presentes no bagaço são formados por celulose e hemicelulose, imersos em uma matriz de lignina. A lignina é um composto fenólico amorfo, resistente a ataques enzimáticos e degradação, sendo considerado o principal elemento responsável pela recalcitrância da parede celular a hidrólise enzimática da celulose (HIMMEL et al., 2007; ISIKGOR et al. 2015).

Para diminuir a recalcitrância do material lignocelulósico, a qual é devida a composição química em combinação as propriedades físico-químicas (BRIENZO et al., 2015), e aumentar a taxa de conversão enzimática da celulose e hemicelulose a carboidratos simples, diversos pré-tratamentos vem sendo estudados (KUMAR; SHARMA, 2017; KUMAR et al., 2009). Os diferentes pré-tratamentos possuem diferentes características e maneiras de ação distintas, levando, portanto, a diferentes alterações na composição e estrutura do material lignocelulósico. Os pré-tratamentos podem diminuir a cristalinidade e grau de polimerização da celulose, remover parte do conteúdo de lignina ou hemicelulose, ou modificar a estrutura da lignina (KUMAR; SHARMA, 2017). Os pré-tratamentos podem afetar a celulose, levando a

despolimerização parcial, dependendo da sua severidade (ZENG et al., 2014). Alguns pontos negativos são possíveis perdas de carboidratos por degradação, com produção de inibidores enzimáticos ou compostos que afetam negativamente o processo subsequente de fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os pré-tratamentos físico-químicos mais utilizados na indústria do etanol são a explosão a vapor, os pré-tratamentos de ácido diluído, e os alcalinos, sendo que os efeitos causados por cada um destes variam. Os pré-tratamentos ácidos são considerados mais eficientes e econômicos se comparados com os pré-tratamentos alcalinos ou oxidativos, e são capazes de solubilizar a hemicelulose (na forma de monossacarídeo) e uma pequena fração da lignina. Portanto, é um pré-tratamento bastante utilizado como método de separação de hemicelulose quando seu objetivo é obter um hidrolisado rico em xilose. Pré-tratamentos que utilizam substâncias alcalinas como hidróxido de sódio são capazes de solubilizar hemicelulose e lignina, além de contribuir com melhora na digestão enzimática das fibras de celulose (REZENDE et al., 2011). Por fim, o pré-tratamento por explosão a vapor modifica a estrutura do material lignocelulósico, levando a altas taxas de liberação de glicose por hidrólise enzimática. Porém, este pré-tratamento ocasiona a formação de alguns compostos inibitórios do processo de fermentação (LASER et al., 2002; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Devido aos impactos negativos no rendimento de hidrólise enzimática causados pela presença de lignina (barreira física e adsorção improdutivo de enzimas), sua remoção ou modificação se faz necessária para a conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis. Neste contexto, o presente estudo analisou a área superficial referente a lignina total, levando em consideração a ocorrência de depósitos de lignina sobre o material após a aplicação dos pré-tratamentos ácido diluído e sua combinação deslignificação branda com clorito de sódio. As análises foram baseadas na estimativa da área superficial da lignina (total e específica) através da adsorção do corante Azure B. De forma complementar, a adsorção de corante foi relacionada com a composição química do material (lignina residual total) e rendimento em glicose na hidrólise enzimática.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Bioetanol e o papel da biomassa lignocelulósica**

Uma das melhores alternativas para a redução do uso de combustíveis fósseis são os biocombustíveis. O processo da fotossíntese é responsável por permitir que água, energia solar e CO<sub>2</sub> sejam assimilados em moléculas orgânicas que podem ser usadas como fonte de energia (ISIKGOR et al., 2015). Dados de 2015 mostram que cerca de 9,6 % do total de combustíveis produzidos mundialmente são provenientes do uso de biomassa e outros resíduos não relacionados (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2017).

Os biomateriais provenientes dos constituintes principais da parede vegetal de gramíneas e madeira são comumente denominados de materiais lignocelulósicos. Estes materiais possuem em sua composição elementos orgânicos como carboidratos dispostos na forma de polissacarídeos, tais como a celulose e hemicelulose. Outros compostos orgânicos aromáticos formam a lignina, e alguns compostos presentes em menor quantidade como extrativos, cinzas, proteínas e pectina (USMANI et al., 2017).

O emprego de materiais lignocelulósicos vem crescendo com o passar dos anos através do desenvolvimento de novos produtos e materiais, especialmente aqueles com potencial de reduzir o uso de derivados de petróleo, ou substituí-los completamente. Os custos ambientais da extração do petróleo e as questões sociais e econômicas relacionadas a este favorecem as características positivas da aplicação da biomassa no desenvolvimento de materiais que substituam os derivados de petróleo. Dentre os pontos positivos podemos citar o baixo custo ambiental, tendo em vista que o impacto causado pelo cultivo de biomassa é potencialmente menor do que o custo ambiental possível causado pela extração do petróleo, o seu custo reduzido, e a ampla disponibilidade (USMANI et al., 2017).

Para a produção de bioetanol em larga escala a partir de biomassa lignocelulósica se faz necessário o uso de um material com elevado conteúdo de carboidratos. Alguns exemplos clássicos já utilizados nas técnicas de produção de bioetanol e outros biocombustíveis são a cana-de-açúcar, comumente utilizada na forma do próprio suco (sacarose), e o amido proveniente do milho (FERNANDES et al., 2017). Para aproveitar ao máximo todas as frações da biomassa, o desenvolvimento de uma biorrefinaria integrada, onde todos os subprodutos podem

ser reaproveitados para fins econômicos surge como uma prática plausível para diminuir os custos da produção de etanol de segunda geração (CHEALI et al., 2015).

Para aumentar a produção de etanol, sem aumentar a produção de sacarose e amido, o que resultaria no aumento da área plantada de cana-de-açúcar e milho, novas fontes de açúcar fermentável vêm sendo exploradas como por exemplo os materiais celulósicos, ou lignocelulósicos presentes nas paredes celulares das plantas. Dentre os materiais lignocelulósicos, o mais comumente produzido no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. Este tipo de substrato é amplamente utilizado no Brasil (ROCHA et al., 2015a), sendo que a estimativa para a safra 2017/2018 seja de aproximadamente 646 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, e uma produção estimada de 26,12 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2017). Com alto potencial de queima, este bagaço é utilizado principalmente para geração de energia elétrica necessária para o funcionamento das usinas, podendo uma parte inclusive a ser vendida para distribuição. Mas apesar da amplitude de aplicações, boa parte deste subproduto ainda não é aproveitada (ROCHA et al., 2015a). Para o Brasil ainda há um problema recente, a partir de 2008 o investimento de capital na indústria de açúcar e etanol têm estagnado, e este fator combinado com as condições climáticas adversas, além do aumento no preço da expansão da produção de cana-de-açúcar, que se dá principalmente devido a falta de espaço para cultivo na região sudeste, além de que as melhores terras para o cultivo dessa variedade já estarem ocupadas, forçando a expansão a ocorrer na direção de terras menos férteis (DRABIK et al., 2015).

O bagaço de cana-de-açúcar é composto majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina, e outros compostos que aparecem em menor quantidade como extrativos e cinzas. Dentre os três principais componentes, a celulose corresponde a maior parcela da biomassa total do bagaço, com cerca 42 %, enquanto a Hemicelulose corresponde a cerca de 28 %, por fim a lignina corresponde a cerca de 25 % da composição química total do bagaço (ROCHA et al., 2012b).

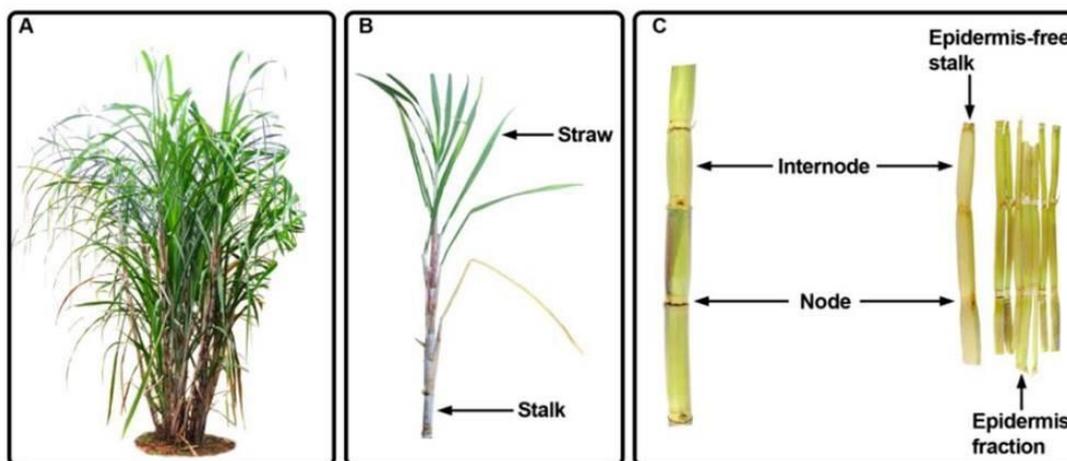
A celulose é o componente mais abundante dentre a biomassa global, presente em todas as paredes celulares de tecidos vegetais, e é encontrada como um polissacarídeo linear composto de unidades de glicose ligadas por meio de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. A hemicelulose é também abundante na biomassa, a composição da hemicelulose varia de planta para planta, sendo composta por

monômeros dextrogiros de xilose, manose, glicose ou galactose, formando um polissacarídeo ramificado com grupos pendentes (CHEN, 2014). A lignina é um composto exclusivo de gimnospermas e angiospermas, é o componente da parede celular mais heterogêneo de todos, sendo que sua composição pode variar entre as células de um mesmo tecido, é composta principalmente de álcool p-coumaril, coniferil e sinapil. O bagaço de cana-de-açúcar oferece outras vantagens quando comparado a outros materiais lignocelulósicos como a palha de arroz e a palha de trigo, devido a seu baixo teor de cinzas (CARDONA et al., 2010).

## **2.2 Heterogeneidade da biomassa de cana-de-açúcar**

Uma dificuldade em se trabalhar com resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar é a sua heterogeneidade. A cana-de-açúcar é composta de três principais sistemas, raízes, folhas e caule, que também pode ser chamado de colmo (BRIENZO et al., 2014). O colmo é uma estrutura comprida que tem função de sustentar as folhas da planta, é segmentado em nós e entrenós. O nó é a porção onde as folhas se ligam ao colmo, geralmente são mais curtos e densos, enquanto que os entrenós são mais compridos. A figura 1 apresenta a divisão em frações da cana-de-açúcar (A), separada primariamente em palha e colmo (B), e suas subdivisões em nó, entrenó e epiderme (C). Um corte transversal nos entrenós mostrara que essa região é composta por diferentes tecidos, a epiderme, o córtex e a medula. A figura 2 apresenta por microscopia de varredura a morfologia diversa do nó e entrenó, destacando em vermelho as regiões dos feixes vasculares. A epiderme é a porção mais externa, e apresenta dois tipos de células, podendo ser constituída de apenas uma única camada, ou de múltiplas camadas de células, estas estando organizadas de duas formas diferentes, as longas e as curtas, que se ordenam de forma intercalada (BRIENZO et al., 2014).

Figura 1. Divisão em frações da cana-de-açúcar. A: planta inteira. B: Stalk corresponde ao caule e Straw corresponde a folha. C: Internode corresponde ao entrenó, node corresponde ao nó, epidermis-free stalk corresponde a porção do caule livre de epiderme e epidermis fraction corresponde a fração externa (contendo epiderme).



Fonte: SANT'ANNA et al., 2014.

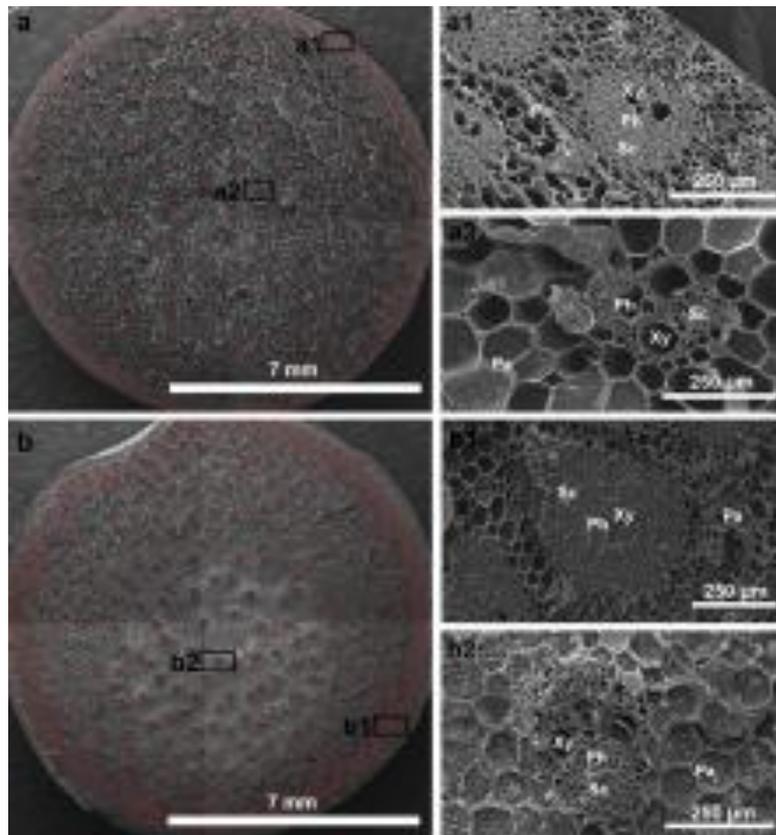
As folhas por sua vez são compostas por duas estruturas principais, a bainha e o limbo. As bainhas das folhas de cana-de-açúcar geralmente encobrem uma longa porção do entrenó, e as vezes, até mais de um. O limbo corresponde a parte laminar da folha, que quando observado através de um corte longitudinal apresenta 3 regiões distintas: A epiderme, que similar ao colmo protege os tecidos mais internos da folha, além de possuir estômatos que realizam as trocas gasosas. O mesofilo é composto principalmente por células fotossintetizantes. E por fim, também similar ao colmo, as folhas apresentam um conjunto de feixes vasculares em seu interior, que distribuem nutrientes e água para as células (RAVEN et al., 2005).

Deste modo, o bagaço é composto por várias frações/tecidos do colmo da cana-de-açúcar, caracterizando-o como um material heterogêneo. As folhas da cana-de-açúcar são, atualmente, foco de estudos para conversão em bioetanol. Como matéria-prima, esta não seria complexa se não fosse misturada com ponteiros de colmo durante a colheita. Assim, o bagaço e palha (mistura de folha e pontas de colmo) da cana-de-açúcar são materiais heterogêneos, compostos por diferentes

tecidos/frações, o que contribui para sua recalcitrância (SANT'ANNA, SOUZA e BRIENZO, 2014). Esta recalcitrância tem inviabilizado processos industriais de produção de biocombustíveis e moléculas de alto valor agregado.

A recalcitrância é impulsionada pela grande variação nos componentes químicos da biomassa lignocelulósica, a qual garantem a biomassa diferentes propriedades físico-químicas que acarretam impactos nos processos de pré-tratamento e modificação da sua estrutura. Entre essas propriedades podemos citar o tamanho de partícula, o qual está diretamente relacionado com a superfície de contato e conseqüentemente transferência de massa. Um material mais particulado, ou seja, com menor tamanho de partícula, é mais facilmente atacado pelos agentes químicos e biológicos, e com o aumento da superfície de contato total, aumenta também a velocidade de reações químicas (CAI et al., 2017).

Figura 2. Corte transversal de (a) entrenó e (b) nó. Em destaque (a1,a2,b1,b2), os feixes vasculares.



Fonte: BRIENZO et al., 2016.

### **3. LIGNINA**

#### **3.1 Definição e Função**

A lignina é uma macromolécula amorfa que atua na planta provendo rigidez e integridade estrutural, sendo responsável por aderir as células umas às outras, tornando o tecido resistente (HOLLADAY et al., 2007; GHAFAR; FAN, 2014). Essa macromolécula desempenha um papel fundamental nas plantas, conferindo também suporte mecânico aos tecidos, garantindo a adesão das fibras. A lignina é responsável por diminuir a permeabilidade das células do vaso de xilema, contribuindo para o transporte de água e nutrientes ao longo da planta. Uma das características importante para o desenvolvimento da planta, é a proteção contra ataques de microrganismos e suas enzimas (GHAFAR; FAN, 2014).

A lignina foi descrita em 1838, por Anselme Payen, como uma substância rica em carbonos responsável por englobar a celulose dentro dos tecidos das árvores (SJÖSTRÖM, 1993). De fato, a lignina é uma macromolécula de estrutura complexa a qual varia de acordo com a origem da biomassa. A lignina é basicamente formada por diferentes estruturas com anéis aromáticos, ligados entre si por ligações covalentes entre carbonos e carbono-oxigênio (HOLLADAY et al., 2007). As ligações entre os compostos ou precursores que formam a lignina configuram uma rede de ligações que confere uma característica tridimensional a macromolécula.

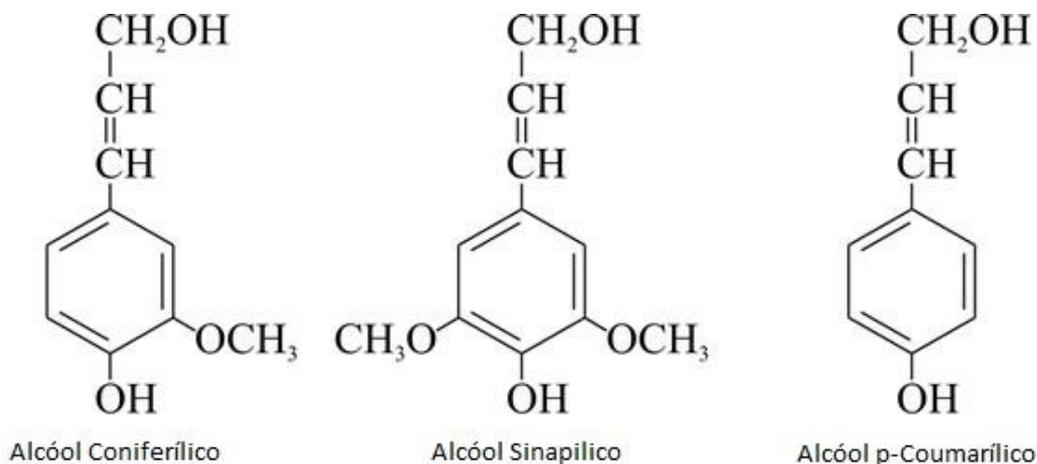
A lignina é um composto único dentre os componentes da biomassa, devido a sua estrutura aromática, não reage como carboidratos ou óleos vegetais, é quimicamente e estruturalmente mais complexa. Apesar dos desafios, existem diversas aplicações biotecnológicas para esta macromolécula, como a produção de biocombustíveis, produção de moléculas de interesse industrial como fibras de carbono e também a produção de químicos diversos como aromáticos (HOLLADAY et al., 2007). A lignina também pode ser aplicada para geração de flocculantes empregados para a remoção de corantes catiônicos em meio líquido (FANG et al., 2010). Esta macromolécula ainda pode ser adicionada a compostos biotecnológicos para modificar suas propriedades como cristalinidade e hidrofobicidade (CHUNG et al., 2013).

A história da pesquisa em lignina começou há mais de 100 anos, quando os pesquisadores da época buscavam meios de remover esse componente da madeira

para obter uma celulose mais pura para a produção de papel. Durante esse período, e até a pouco tempo, a lignina foi tratada como um produto sem importância. Porém, diversos estudos da sua função biológica, além da sua composição química, caracterizaram a lignina como uma molécula de interesse biotecnológico (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2009; HEITNER et al., 2016). Os monolignóis, álcoois precursores da lignina, são compostos de uma cadeia lateral com três carbonos acoplada a um anel fenólico (EUDES et al., 2012). A quantidade de lignina presente no material varia de acordo com a espécie, sendo que para o bagaço de cana-de-açúcar cerca de 25 % de lignina (ROCHA et al., 2012b). Para plantas do gênero *Phragmites* (gramínea) a lignina chega a ser cerca de 20 % da composição da planta (JUNG et al., 2015). Para o capim elefante, outra gramínea, a composição de lignina é de aproximadamente 24 % (SANTOS et al., 2018). A quantidade de lignina presente pode variar entre plantas da mesma espécie cultivadas em locais diferentes, como no caso de *Miscanthus sinensis* cultivadas em duas regiões distintas da Coreia do Sul, onde observou-se uma diferença de 10 % em massa seca em lignina (JUNG et al., 2015).

Os precursores das moléculas de lignina são principalmente três, o ácido para-cumárico, para-cumaroyl-CoA e o para-cumaraldeído (LABEEUW et al., 2015), que participam das vias bioquímicas do fenilpropano, levando a formação dos “monômeros” (Figura 3) de lignina que são os monolignóis: p-coumaril, p-coniferil e p-sinapil (RAGAUSKAS et al., 2014).

Figura 3. Monolignóis, os precursores da molécula de lignina. Da esquerda para a direita as estruturas dos álcoois: Coniferílico, Sinapílico e p-Coumarílico.



Adaptado de: WHETTEN et al., 1998.

Os três monômeros precursores da macromolécula de lignina são incorporados na forma dos fenilpropanóides: para-hidroxifenil, guaiacil e siringil. Estas estruturas se arranjam tridimensionalmente formando a macromolécula de lignina, um material heterogêneo de estrutura irregular (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2009; RAGAUSKAS et al., 2014).

A biosíntese da macromolécula de lignina ocorre de forma irregular na parede celular, os fenilpropanóides (4-hidroxifenil, guaiacil e siringil) são transportados até a periferia da célula e incorporados na parede celular através de ações de enzimas oxidativas, levando a produção de radicais desses fenilpropanóides que se ligam entre si, formando a macromolécula de lignina.

Todos os genes relacionados a síntese de monolignóis estão descritos na literatura e muitos destes foram modificados ou regulados para influenciar na produção de lignina, como no caso do ferulato-5-hidroxilase, o gene F5H, e o caffeic-acid-O-metiltransferase, o COMT. É comum observar que diversos genes relacionados a síntese da lignina são alvos de estudos de biologia molecular (SIMMONS et al., 2010).

A lignina de plantas pode ser dividida em três tipos, a madeira mole (softwood) ou coníferas, a madeira dura (hardwood) e a lignina de gramíneas (PEARL, 1967). As coníferas possuem um elevado conteúdo de lignina se comparado a angiospermas do tipo madeira dura, chegando a até 35 % de massa seca total.

As coníferas também são consideradas mais difíceis de manipular e, portanto, tem sido utilizada principalmente para a produção de carvão, isso se dá devido a proporção elevada de fenilpropanóides do tipo guaiacil, em relação a ligninas do tipo siringil, o que leva a formação de uma lignina mais densa, graças ao maior número de ligações de carbono (carbono-carbono) que a molécula de guaiacil é capaz de acomodar (WAGNER et al., 2015).

A lignina confere ao material lignocelulósico uma característica recalcitrante, principalmente devido à capacidade de ligação com as diversas moléculas constituintes da parede celular (VANHOLME et al., 2010) Deste modo, esforços vem sendo empregados na obtenção de variedades geneticamente modificadas onde o conteúdo de lignina é inferior ao natural (CARROLL; SOMERVILLE, 2009). Apesar de alterações na quantidade de lignina levar a problemas de desenvolvimento da planta,

alterações na composição da lignina parecem não ter nenhum efeito negativo (VANHOLME et al., 2012), o que pode ser explorado para obter variedades com composições químicas favoráveis aos métodos de pré-tratamento atuais. Um dos exemplos dados anteriormente, o gene COMT, quando regulado para expressão baixa leva a produção de um fenótipo com baixo conteúdo de lignina, e estudos feitos com *Panicum virgatum*, a grama comum, levaram a obtenção de variedades com até 14,7 % menos lignina (FU et al., 2010).

A composição em monolignóis pode ser um fator negativo na biodegradação, e conseqüentemente resistente a modificações estruturais por pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos que, de fato, a densidade da lignina está relacionada com o número e tipo de ligações químicas que podem ser realizadas entre os monômeros (MACHINET et al., 2011). Ligninas ricas em grupos guaiacil são mais recalcitrantes do que as ricas em siringil.

### **3.2 Impacto da lignina em processos biotecnológicos**

O uso de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol é uma das estratégias mais promissoras atualmente, já que apenas uma fração (sacarose) da biomassa total dessa planta é aproveitada para a produção de biocombustíveis. Antigamente, cerca de uma década, o bagaço era comumente descartado, sendo considerado como um produto com baixo valor de venda, porém com alto potencial de exploração, principalmente para a produção de etanol de segunda geração (MARABEZI, 2009). Atualmente, parte do bagaço gerado na produção de etanol e açúcar é empregado na cogeração de energia elétrica. Recentemente, parte da palha deixada no campo tem sido recolhida e utilizada na produção de etanol de segunda geração (JÚNIOR; AGUDO, 2009). Apesar de o bagaço ter um emprego na cogeração de energia, ainda existe excedente. E também, existe o interesse em aumentar a produção de etanol, o que volta a atenção para o bagaço e palha como matéria-prima, porém, existe a necessidade de desenvolvimento de tecnologia para tornar o processo competitivo/viável e atrativo.

O emprego da biomassa lignocelulósica em processos de conversão em bioetanol tem barreiras como a sua organização estrutural e composição. A lignina,

por sua característica complexa e estruturalmente resistente a quebra, se apresenta como um entrave na obtenção de celulose/glicose. Ainda, seus derivados gerados nos processos de pré-tratamento podem inibir ação enzimática e microrganismos da etapa de fermentação. A lignina funciona como uma barreira física protegendo a celulose da ação de enzimas hidrolíticas, como as celulases. A lignina está distribuída nos espaços da parede celular, interagindo covalentemente com outras moléculas dessa estrutura, por meio de ligações cruzadas que ocorrem entre a lignina e os componentes da parede celular. Deste modo, a parede celular apresenta uma estrutura mecanicamente resistente. Para contornar esse problema, uma série de pré-tratamentos vêm sendo estudados de forma a remover ou modificar a estrutura da lignina. É importante destacar que a ação dos pré-tratamentos também modifica as propriedades físico-químicas da biomassa, como a acessibilidade à celulose, melhorando a ação enzimática (BRIENZO et al., 2015). Além de barreira física, a lignina causa adsorção das enzimas, de forma irreversível (improdutiva), diminuindo a disponibilidade de enzimas no meio de reação.

A adsorção da enzima depende da estrutura e composição da lignina no substrato, e por esse motivo alguns trabalhos defendem a importância da remoção da lignina, por exemplo, através do pré-tratamento alcalino (ZHAO et al., 2012). Segundo Nakagame et al., (2010) a lignina proveniente de gramíneas possui menor taxa de adsorção de enzimas se comparada a lignina de madeira. Paliativamente, a adição de surfactantes não iônicos parece ajudar a reduzir essa interação improdutiva entre as enzimas e a lignina. Park et al., (1992) examinaram diferentes tipos de surfactantes, comparando os resultados obtidos em reações enzimáticas posteriores. Alguns resultados positivos estão relacionados com a concentração do surfactante utilizado, sendo que para o Tween 20 concentrações até 0,05 % resultaram em maiores taxas de conversão, em torno de 2,7 mg/ml, enquanto que concentrações um pouco mais elevadas como 0,15 % renderam valores próximos de 2,4 mg/ml. A utilização de Tween 80 também se mostrou bastante eficiente para a redução na adsorção improdutiva de enzimas à lignina em material pré-tratado por explosão a vapor. A adição de 1 % em concentração do surfactante não iônico leva a um aumento de cerca de 25 % em rendimento de glicose em comparação com o material hidrolisado sem a adição do surfactante (JIN et al., 2016).

### 3.3 Determinação de lignina

A determinação da quantidade e tipo de lignina presente em uma amostra é um procedimento complexo devido à natureza da matriz lignocelulósica, na qual a lignina está presente interagindo covalentemente com outras macromoléculas, como a celulose, a hemicelulose (MONTIES, 1989).

Os métodos de determinação de lignina podem ser divididos principalmente em dois: os métodos gravimétricos, onde é necessário o isolamento da lignina ou de frações da parede celular (ALLEN, 1989); e os métodos espectrofotométricos, onde a lignina é apresentada em uma forma solúvel a um espectrofotômetro para determinação da absorvância da solução (MORRISON, 1972; BRUCE; WEST, 1989). Há ainda métodos mais recentes de análise, a espectroscopia de refletância no infravermelho próximo e médio, que permite realizar análises em um grande número de amostras em um curto período de tempo, necessitando apenas da moagem do material, ao contrário dos dois primeiros métodos, onde ambos necessitam de um longo tratamento da amostra antes da aplicação da técnica (FOLEY et al., 1998). Além do uso do infravermelho, ainda temos outras técnicas de espectroscopia como a Raman, que se baseia no uso de luz monocromática em uma determinada frequência. Este método possui como característica a habilidade de demonstrar a distribuição espacial dos constituintes da matéria por meio dos sinais obtidos no espectro (COLARES et al., 2015).

Sabe-se que a presença de lignina pode prejudicar a hidrólise do material por diminuir a acessibilidade devido seu impedimento físico (SIPPONEN et al., 2014a). A maioria dos métodos de determinação de lignina são degradativos (ESHKIKI et al., 2007), e por esse motivo se torna impossível a medição da lignina em sua estrutura natural, na superfície acessível do material vegetal. A área superficial de lignina, ou seja, a área total das fibras que estão cobertas por lignina, está relacionada diretamente com a capacidade de conversão por hidrólise enzimática, uma vez que a presença de lignina sobre as fibras e também dentro dos poros impacta negativamente na ação das enzimas (SIPPONEN et al., 2014a). A determinação desta área pode ser realizada pelo emprego de um corante catiônico em solução aquosa, como o Azure B, que possui a capacidade de aderir a moléculas de lignina no material. O corante possui máxima afinidade a lignina em pH próximo de 7, o que condiz com

a constante de dissociação ácida dos monolignóis do tipo guaiacil e siringil que estão entre 7 e 10, portanto quanto mais próximo deste valor se torna o pH da solução, maior a quantidade de lignina dissociada (SIPPONEN et al., 2014b). O Azure B funciona como uma base, removendo o próton do grupo hidroxila no anel fenólico dos monômeros de lignina, ocorre então, a ligação entre o ânion formado no anel aromático e a região protonada do corante (SIPPONEN et al., 2014b).

A área superficial da lignina (exposta) pode ser determinada segundo o método desenvolvido por Sipponen et al., (2014b). Para o entendimento deste método, primeiramente será descrito alguns dos parâmetros considerados na reação e cálculo. A primeira etapa corresponde ao cálculo da capacidade de adsorção em equilíbrio do corante ( $Q_e$ ), dada por:

$$Q_e = \frac{v_0(C_0 - C_e)}{m_{Ad}} \quad (1)$$

Onde  $v_0$  corresponde ao volume da solução de corante,  $C_0$  e  $C_e$ , são respectivamente, as concentrações de corante, em  $mg/mL^{-1}$ , no tempo zero e ao final do ensaio e  $m_{Ad}$  é a massa de adsorvente utilizada. A concentração de corante ( $C_0$  e  $C_e$ ) é calculada pela igualdade  $\frac{C_1}{C_2} = \frac{A_1}{A_2}$ , onde  $C_1$  e  $C_2$  correspondem respectivamente a concentração de corante final e inicial, e  $A_1$  e  $A_2$ , correspondem as absorvâncias medidas em um mesmo comprimento de onda para as duas soluções, sendo que  $A_1$  corresponde a absorvância medida para  $C_1$  enquanto  $A_2$  corresponde ao resultado obtido para  $C_2$ .

Em seguida, o autor utilizou a capacidade de adsorção em equilíbrio ( $Q_e$ ) (Equação 1) para calcular a capacidade máxima de adsorção ( $X_m$ ) utilizando a equação:

$$Q_e = \frac{X_m * A_l * C_e}{A_l * C_e} \quad (2)$$

Nesta equação,  $A_l$  é a constante de equilíbrio de Langmuir e  $C_e$  é a concentração de corante calculada anteriormente no ponto final da reação. Para a continuação dos cálculos, assume-se que o corante Azure B possui geometria esférica e é estimado que a área de superfície coberta pela molécula seja de  $0,66 \text{ nm}^2$ .

A área superficial de lignina (SA) é obtida então pela seguinte equação:

$$SA = b * 1,297 * X_m(3)$$

Na equação 3, a constante 1,297(m<sup>2</sup>/mg) é a área coberta por uma unidade de massa do corante (mg), X<sub>m</sub> é a capacidade máxima de adsorção obtida na equação anterior (3) e b é o fator de correção para adsorção inespecífica, que é dado por:

$$b = 1 - \frac{X_m(CelC)(1-PL)}{X_m(Mat)} (4)$$

Neste caso, equação 4, X<sub>M</sub>(CelC) é a capacidade máxima de adsorção de corante em um substrato celulósico cristalino (Emcocel 50M foi o material utilizado pelo autor), PL é a proporção de lignina no material (Massa de Lignina/Massa de material) e por último, X<sub>m</sub>(Mat) é a capacidade máxima de adsorção para o material a ser analisado.

A área superficial específica da lignina pode também ser calculada por meio de uma equação semelhante a equação 3, apenas substituindo X<sub>m</sub> por X'<sub>m</sub>, que corresponde a capacidade máxima de adsorção dividida pela proporção de lignina (PL) no material. Temos então:

$$SSA = b * 1,297 * X'_m (5)$$

Deste modo, a utilização de corantes catiônicos permite a estimativa da área superficial da fibra a ser coberta pela lignina sem uso de métodos degradativos. Tais métodos, podem vir a modificar a estrutura da macromolécula de lignina, e não informam o quanto de lignina está impactando como barreira física ao acesso à celulose.

Ao final do estudo, o autor apresenta duas equações específicas para bagaço de cana-de-açúcar, que foram desenvolvidas para facilitar o cálculo da área superficial específica e total da lignina para este material.

$$Lignin SA (S_{bg}) = 0.88F_{sbg} \left( \frac{1.55q_e}{305.83} \right) * 397 (6)$$

$$F_{sbg} = 1.3841 - 0.0786x (7)$$

Na equação 6, a constante de valor igual a 0.88 corresponde ao fator para adsorção inespecífica,  $F_{sbg}$  é o fator obtido na equação 7, que corresponde ao fator de correção baseado no conteúdo de lignina da fração sólida, 1.55 é a razão entre a capacidade de adsorção máxima do material e a adsorção no equilíbrio (24h), que é a capacidade de adsorção no equilíbrio obtida da equação 1, 305.83 corresponde a massa molecular do Azure B, por fim 397 corresponde a área coberta por mmol de Azure B.

### **3.4 Aplicações tecnológicas da lignina**

Para processos biotecnológicos, onde os carboidratos são matéria prima, a lignina é vista como um entrave. Por outro lado, para processos de biorefinaria que envolvem o fracionamento da biomassa, a lignina é considerada como uma matéria prima. As principais aplicações em biorefinaria para o uso da lignina é a produção de calor, vapor e energia, onde estes processos já estão muito bem estabelecidos, como exemplo em indústrias de papel e celulose. Porém, existem outras possibilidades a serem consideradas para o uso da lignina, que apesar de se mostrarem desafiadoras, possuem grande potencial tecnológico (HOLLADAY et al., 2007).

A principal aposta para o uso da lignina no desenvolvimento de produtos competitivos está na criação de novos polímeros, ou versões “green” destes polímeros, remetendo a fabricação a partir de matéria-prima renovável. Durante o desenrolar do século passado e até o momento, os polímeros, que são macromoléculas formadas por unidades repetidas (monômeros) de uma mesma molécula, vem substituindo cada vez mais materiais comuns como o metal e o vidro (THAKUR et al., 2014). Apesar das dificuldades em obter lignina em sua forma com alta pureza e pouco modificada, a aplicação de lignina como aditivo em compostos termoplásticos é plausível, podendo alterar as características físicas do material. De fato, a adição de lignina resulta em aumentando da capacidade de torção, elasticidade, entre outras do material (THAKUR et al., 2014).

A molécula de lignina ainda pode ser utilizada para a produção de Hidrogéis, que são, na verdade, redes de polímeros com uma característica intrínseca especial,

não dissolvem facilmente em solventes em baixas concentrações. A lignina é uma molécula de fácil aquisição (dependendo da pureza e grau de modificação), disponível em grandes quantidades considerando os resíduos lignocelulósicos, além de ser biodegradável, atrai a atenção dos desenvolvedores dos produtos baseados em hidrogel, os quais podem ser preparados a partir tanto de lignina obtida em processo Kraft, quanto lignina de processo alcalina (THAKUR; THAKUR, 2015).

Relacionada a produção e enriquecimento de polímeros, moléculas de lignina podem ser utilizadas nos processos de produção de fibras de carbono. Devido a sua baixa relação custo/carbono, é possível que a aplicação deste tipo de fibra na produção de automóveis tome cada vez mais espaço. O uso da lignina neste tipo de processo diminui o impacto ambiental, enquanto aumenta a quantidade de matéria prima disponível, como o aço. O desenvolvimento de fibras de carbono leves, e ainda assim resistentes, deve diminuir a utilização de metais e também de petróleo na indústria automobilística. Cálculos estimam que o consumo de até 84 TWh de energia em forma de gasolina podem ser reduzidos por ano na Suécia com o uso de lignina proveniente de madeira (SCHWEINEBARTH et al., 2015).

A lignina também pode ser utilizada para a produção de outros compostos biodegradáveis de interesse industrial, como o ácido mucônico, polihidroxialcanoato, guaiacol, 3-carboxymuconato, além do ácido beta-cetoadípico (KA) que é um componente principal da via bioquímica dos compostos aromáticos, sendo utilizado para o metabolismo de diversos compostos deste tipo. Este ácido vem sendo utilizado para a síntese de poliamidas e poliésteres, em uma taxa considerável de 2,8 Mt por ano. Essas características conferem ao KA um patamar de aplicabilidade grande, podendo ser utilizado como matéria prima para produção de diversos polímeros, e também de outros compostos químicos como o ácido adípico (OKAMURA-ABE, 2016).

Outras aplicações da lignina envolvem o seu uso como controladores de liberação de fertilizantes e herbicidas, aplicação na criação e desenvolvimento de bioplásticos, nanocompostos e nanopartículas. A lignina também pode ser utilizada como adsorvente em solução, pode ser empregada em dispersantes para aumentar o grau de sacarificação em materiais lignocelulósicos (NORGREN et al., 2014).

Apesar das diversas aplicações potenciais do uso da lignina em processos biotecnológicos, ainda se fazem necessários ajustes e novas pesquisas para o

desenvolvimento de catalizadores e equipamentos. O baixo custo nestes processos é fundamental para tornar viável a sua utilização para a síntese de novos polímeros e outros compostos químicos de interesse industrial.

## 4. PRÉ-TRATAMENTOS

### 4.1 Pré-tratamento ácido

Diversas propriedades da biomassa estão relacionadas com a resistência a ação de agentes externos, portanto se faz necessário a utilização de pré-tratamento para modificar a estrutura do material de forma a tornar os componentes de interesse mais acessíveis (BRIENZO et al., 2017). O pré-tratamento ácido é utilizado para melhorar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico. Este tipo de pré-tratamento é muito utilizado para solubilizar a hemicelulose, na forma de monossacarídeo, e conseqüentemente tornando a celulose no material pré-tratado mais acessível a ação de enzimas (BRIENZO et al., 2017).

O pré-tratamento pode ser feito com ácidos concentrados ou diluídos. Porém, a utilização de ácidos concentrados é menos atrativa para processos de produção de etanol devido a formação de compostos inibidores de ação enzimática e de microrganismos na etapa de fermentação. Além disso, a corrosão do equipamento é um problema a ser considerado, além do alto custo operacional e de manutenção do sistema (MOOD et al., 2013). Os problemas apresentados justificam a razão pela qual pré-tratamento com ácido concentrado não ser uma alternativa interessante do ponto de vista industrial para biomassa lignocelulósica (WYMAN, 1996).

O pré-tratamento com ácido diluído, por outro lado, aparece como uma alternativa melhor para o uso em escala industrial. Este pré-tratamento tem sido muito estudado para pré-tratar diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010; MOOD et al., 2013), incluindo estudos em escala piloto (AGRAWAL et al., 2015; ROCHA et al., 2015b; SHEKIROL et al., 2014). As condições as quais podem ser aplicadas o método variam, desde altas temperaturas, superiores a 160°C e fluxo contínuo com baixas concentrações de sólidos (5 % a 10 %), até baixas temperaturas como 100°C e altas concentrações de sólidos. Porém, é importante notar que a temperatura utilizada no processo é inversamente proporcional ao tempo de permanência em reação (MOOD et al., 2013).

A principal vantagem do pré-tratamento ácido diluído é a solubilização da hemicelulose, levando inclusive a hidrólise da mesma em açúcares fermentáveis. Apesar do processo levar a produção de algumas espécies indesejadas, principalmente compostos que afetam a ação de microrganismos fermentadores

(SAHA et al., 2005), na maioria dos casos as desvantagens do método são muito menores quando comparadas com o pré-tratamento com ácido concentrado (ALVIRA et al., 2010). Como o objetivo do método é expor a celulose para o ataque das enzimas, o ácido diluído ataca a hemicelulose, levando a formação de xilose (e em alguns casos, principalmente em condições severas, a formação de furfural, e outros compostos inibidores da ação de enzimas). A celulose é menos afetada por efeito do pré-tratamento ácido diluído, mas em função da severidade, pode ocorrer liberação de glicose (HSU et al., 2010). A liberação de glucose não é desejável, uma vez que acarreta na diminuição da celulose total disponível para a hidrólise enzimática. Os efeitos do pré-tratamento com ácido diluído na lignina são principalmente alterações na sua estrutura, levando a formação de glóbulos na superfície do material. A lignina é realocada na superfície do material após sua condensação. O pré-tratamento ácido diluído pode levar a formação de pseudo-lignina, um composto não formado pela degradação da lignina somente, mas sim pelos produtos de degradação dos carboidratos liberados no processo (MENG; RAGAUSKAS, 2017). A pseudo-lignina atua de maneira semelhante a lignina recondensada/depositada sobre a fibra após a aplicação do pré-tratamento, agindo como uma barreira física impedindo a atuação das enzimas responsáveis pela hidrólise do material, além de promover a adsorção irreversível/improdutiva das enzimas, impactando no custo do processo (MENG; RAGAUSKAS, 2017).

Alguns estudos demonstraram que a porcentagem de lignina (Klason) após a aplicação de pré-tratamento com ácido diluído é maior comparativamente com o material inicial (BRIENZO et al., 2017) Entretanto, esse aumento na concentração de lignina está associado ao ganho em massa devido a condensação de componentes da lignina e dos produtos de degradação de açúcares, formando um composto denominado pseudo-lignina (HU et al., 2012). A pseudo-lignina não necessariamente necessita da presença de lignina para ser formada, o pré-tratamento de carboidratos com alto grau de severidade já pode ocasionar na sua formação (SANNIGRAHI et al., 2011).

Kumar (2013) e colaboradores demonstraram em seus experimentos utilizando avicel em conjunto com xilana de Beechwood que a coloração do material se altera de acordo com a severidade do pré-tratamento aplicado, indo de uma cor branca (Combined Severity Factor - CSF 1,94), indicando a presença de celulose e xilana

(não pré-tratado), até um escurecimento quando aumentada a severidade do pré-tratamento (CSF 3,5), demonstrando a formação de pseudo-lignina. É importante notar que a composição de lignina (Klason) nestes materiais é quase nula, pois avicel é celulose microcristalina pura, enquanto a xilana de Beechwood possui em sua composição 70 % xilana, 2,2 % de glucana, 6 % de cinzas e menos de 1 % de arabinana. Deste modo, foi confirmado que a pseudo-lignina pode ser formada principalmente por compostos de degradação do açúcar, como o furfural e hidroximetilfurfural.

## **4.2 Pré-tratamento por explosão de vapor**

O pré-tratamento por explosão de vapor é um dos métodos mais utilizados para o estudo de conversão de biomassa lignocelulósica. Nesse processo a biomassa é colocada em um reator e então sujeita a um vapor saturado a altas temperaturas (160°C a 260°C), por um período de tempo de segundos a minutos (KUMAR, et al. 2017). Após o tempo de reação, é seguido de uma rápida despressurização do reator, sendo o material “explodido” em um tanque de descompressão. Essa abordagem combina forças químicas e mecânicas que apresentam efeito de solubilizar parte da hemicelulose, e assim permitindo uma maior acessibilidade à celulose para a ação das enzimas celulolíticas (ALVIRA et al., 2010; MOSIER et al., 2005).

No pré-tratamento por explosão a vapor, em um primeiro momento a água em altas temperaturas leva a liberação de ácidos orgânicos, seguida por uma reação que resulta na solubilização parcial e a hidrólise da hemicelulose (SINGH et al., 2015). Os efeitos mecânicos causados pela rápida descompressão do reator levam a ruptura das fibras da parede celular, a redução do tamanho das partículas e aumento da porosidade (PITARELO, 2007). Uma fração pré-tratada insolúvel contendo principalmente celulose e lignina é obtida, e outra, líquida, contendo carboidratos solúveis derivados da hemicelulose em forma de monômeros e/ou oligômeros (SUN; CHENG, 2002; ALVIRA et al., 2016). Apesar das semelhanças deste tipo de pré-tratamento com o pré-tratamento ácido, a explosão a vapor acaba por resultar em uma concentração maior de açúcares porque após a despressurização boa parte da umidade é perdida (SINGH et al., 2015). Para aumentar a efetividade do método e

também reduzir a quantidade de compostos fenólicos gerados, um balanço entre temperatura e tempo de reação/residência deve ser determinado para diferentes tipos de materiais (SILVA et al., 2003).

Este tipo de pré-tratamento físico-químico é ambientalmente favorável, pois é possível obter redução na cristalinidade da celulose estimular a auto hidrólise da hemicelulose sem o emprego de reagentes químicos. Entretanto, é comum a adição de baixas concentrações de ácido para amplificar os resultados (SINGH et al., 2015).

Os efeitos do pré-tratamento explosão a vapor sobre a lignina variam entre o tipo de biomassa. Em madeiras duras por exemplo, as quebras de ligações do tipo éter levam a formação de compostos com baixa massa molecular e aumento de conteúdo fenólico. O aumento da temperatura (severidade) também leva ao surgimento de estruturas condensadas. Para resolver este problema é necessário realizar uma pré-impregnação do material com SO<sub>2</sub>, tornando o processo mais eficiente para biomassas do tipo softwood (LI et al., 2009). Li et al. (2009) também demonstraram que a porcentagem de lignina solúvel obtida por um subsequente método alcalino, após a aplicação de um pré-tratamento por explosão a vapor, também varia de acordo com o tipo de biomassa, de forma que em madeiras moles como *Picea abies* (Norway spruce) e *Pinus sylvestris* (Scots pine) a taxa de extração de lignina chega a no máximo 14 % e 27 % respectivamente. Por outro lado, em madeiras duras como do gênero Bétula (Birch) e *Populus tremuloides* (Aspen) essa taxa chega a 86 % e 48 %, respectivamente. Para o bagaço de cana-de-açúcar os valores de solubilização de lignina, após o pré-tratamento por explosão a vapor, seguido de um processo de deslignificação alcalina, ficaram na faixa de 92 % (ROCHA et al., 2012a). Apesar da alta taxa de solubilização de lignina, a combinação destes pré-tratamentos leva a uma perda de 31 % de celulose, o que é um valor considerável para a indústria de produção de etanol de segunda geração (ROCHA et al., 2012a).

### **4.3 Pré-tratamento com clorito de sódio - deslignificação**

A remoção da lignina leva ao aumento da acessibilidade à celulose, e uma das maneiras de remover a lignina seletivamente é pelo emprego de agentes oxidativos, como o clorito de sódio (SIQUEIRA et al., 2013). Entretanto, este tipo de pré-

tratamento, efetivo na deslignificação de biomassa, é empregado apenas para fins analíticos.

O método funciona pela adição de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) em uma solução aquosa na presença de ácido acético, levando a dissociação do clorito em dois ânions, o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2^-$ ) e o próprio ânion de cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Estes dois compostos são altamente reativos, capazes de quebrar a estrutura da macromolécula de lignina e levar a formação de compostos simples, que são solúveis e, portanto, mais fáceis de remover por meio de lavagem com água (YUE et al., 2015).

Apesar da remoção de lignina ser seletiva, alguns efeitos negativos podem ser observados no conteúdo de polissacarídeos, principalmente pela degradação parcial, ocasionada possivelmente pela remoção de complexos lignina-carboidrato (SIQUEIRA et al., 2013). No entanto, a aplicação deste método leva ao decréscimo no grau de polimerização da celulose, possivelmente pela ocorrência de quebras oxidativas na cadeia de celulose, ou pela hidrólise ácida. O uso do clorito de sódio também tem efeitos na hemicelulose, podendo remove-la parcialmente (SIQUEIRA et al., 2013).

Em contraste com outros pré-tratamentos oxidativos, como por exemplo o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que leva a degradação da celulose pela ação de radicais peróxido, além de ser mais difícil de armazenar e manusear, já que se trata de um composto explosivo. O uso de clorito de sódio tem suas vantagens já que a interferência nos polissacarídeos é minimizada, com baixa perda de glicose (YUE et al., 2015).

## 5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise é definida como o processo pelo qual as ligações químicas entre as moléculas são rompidas, levando a adição de uma molécula de água, de forma que o grupo hidroxila (OH-) se ligue a uma das extremidades resultantes, enquanto que o hidrogênio restante complementarizará a outra molécula formada/liberada.

O processo em si, foi estudado primeiramente em microrganismos, os quais desenvolveram diferentes estratégias para hidrolisar o substrato em que se encontram, inclusive os lignocelulósicos. Esses microrganismos geralmente produzem uma série de diferentes glucanases de diferentes funções, dentre estas temos as endoglucanases, que atacam a ligação beta-(1,4), as exoglucanases que possuem preferência pelas extremidades de cadeias de celulose menores (ESTEGHLALIAN et al., 2001).

Para que ocorra a hidrólise enzimática, se faz necessária uma interação entre as enzimas atuantes do processo, e, no caso dos materiais lignocelulósicos, com a celulose, para que haja interação é necessário haver exposição. Portanto, quanto maior a superfície de contato, ou seja, a superfície da celulose acessível as enzimas, mais rápida será a reação, levando conseqüentemente a uma maior taxa conversão em glicose (MENG; RAGAUSKAS, 2014). A superfície de contato, para este tipo de material, pode ser dividida em duas, a superfície externa, que é determinada principalmente pelo tamanho da partícula, e a superfície interna, formada pelos poros. Portanto, quanto maior o número de poros, maior a superfície interna, e conseqüentemente a superfície acessível total (MENG; RAGAUSKAS, 2014).

Diferente de um polissacarídeo puro, os processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos apresentam uma série de dificuldades principalmente porque a digestibilidade da celulose depende de diversos fatores físico-químicos, estruturais e outros relacionados a composição do substrato (SANT'ANNA et al., 2014). Porém, como discutido anteriormente, os pré-tratamentos apresentam-se como alternativas para modificar a estrutura do material lignocelulósico, resultado em melhor ação das enzimas e promover uma alta liberação de glicose no processo de hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010).

A cristalinidade da celulose é um dos principais fatores relacionados a baixos rendimentos e taxa de liberação de glicose na hidrólise enzimática. A compactação

ocorrente neste tipo de molécula é uma das maneiras que as células têm de proteger os carboidratos estruturais de ataques de microrganismos. Portanto, a celulose cristalina é naturalmente resistente a ataques enzimáticos e químicos (SUN et al., 2016).

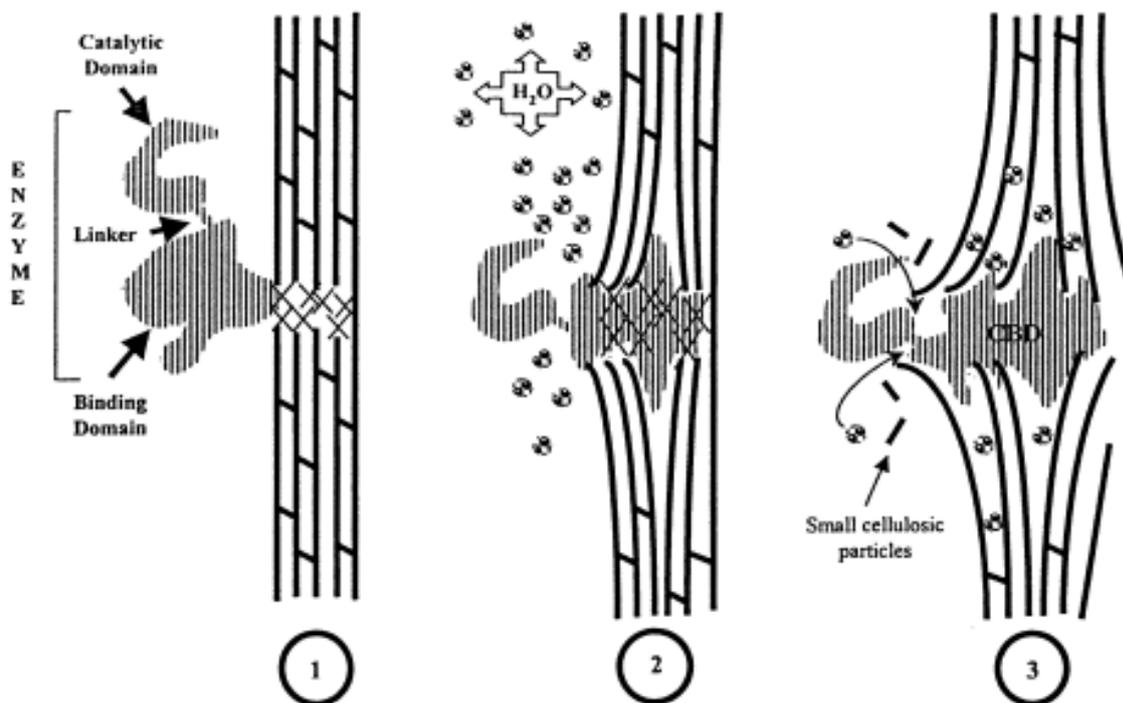
Os fatores que acabam por dificultar o rendimento de hidrólise enzimática também estão relacionados a presença de hemicelulose e lignina. A matriz formada pela interação covalente entre estas duas macromoléculas atua como uma barreira que impede o acesso das enzimas e os agentes químicos à celulose. Além disso, a interação improdutiva entre as enzimas utilizadas no processo e a lignina, acabam por diminuir ainda mais a taxa de conversão de celulose, uma vez que esta interação é irreversível (SUN et al., 2016).

Algumas alternativas vêm sendo estudadas para diminuir o efeito negativo da lignina em processos biotecnológicos de conversão de biomassa. Extração com solvente alcalino pode remover a lignina, diminuindo a barreira física, e adição de componentes como proteínas, especialmente a albumina, que se ligaria a lignina diminuindo a ligação improdutiva da celulase. Um trabalho realizado por Pan et al., (2005) demonstrou que a adição de 6 % de albumina durante a hidrólise enzimática aumenta a conversão de celulose de SEDF (*Pseudotsuga menziesii*, pré-tratada em explosão a vapor) em até 30 %. Este aumento no rendimento de hidrólise ocorre principalmente devido a ligação entre albumina e a lignina, impedindo que a lignina interaja com as enzimas celulolíticas. Essa técnica é bastante promissora, já que os custos da proteína “suicida” devem ser baixos se comparado com os custos das proteínas utilizadas para a conversão de celulose a glicose. Além disso, a presença da proteína exógena pouco interfere no processo.

A adição de proteínas com ação sinérgica pode contribuir para a melhora do rendimento da reação, ou o aumento da sua velocidade. Estas proteínas, apesar de não serem hidrolíticas e estarem relacionadas diretamente com a conversão de celulose a glicose, acabam por modificar a estrutura aumentando conseqüentemente a ação das enzimas responsáveis por realizar a conversão de fato. Algumas proteínas mais estudadas para este fim são as os “Módulo de Ligação a carboidratos” (CBMs), os quais são módulos proteicos capazes de orientar os módulos catalíticos de hidrolases. Os CBMs (Figura 4) são responsáveis por aumentar a concentração de

celulases na superfície das fibras, reconhecer sítios específicos de ligação e induzir modificações na estrutura da celulose (KIM et al., 2014).

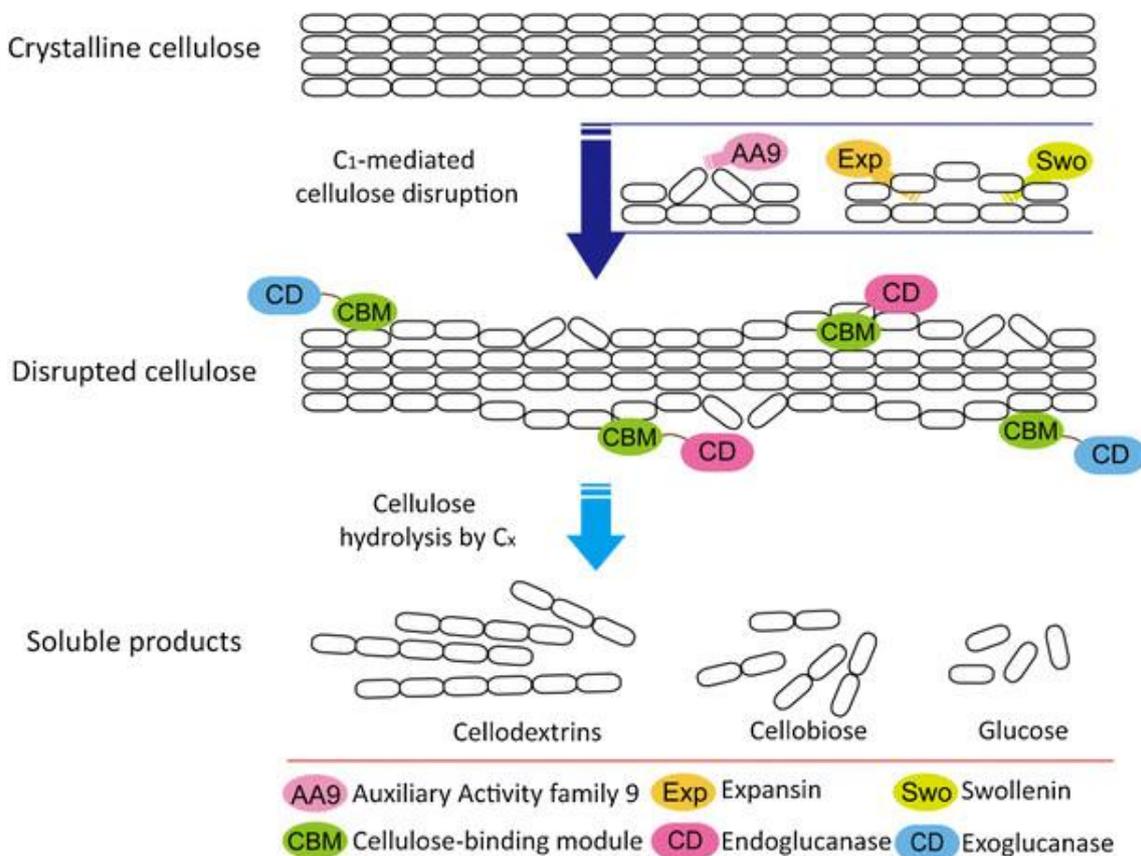
**Figura 4.** Representação esquemática da ação do CBD (Cellulose binding domain) atuando em regiões amorfas.



Fonte: ESTEGHLALIAN et al., 2001.

Algumas proteínas podem auxiliar no processo de hidrólise enzimática. As expansinas, são proteínas presentes na própria planta, responsáveis por remover ligações de hidrogênio, promovendo o relaxamento da fibra. Alguns microrganismos desenvolveram a capacidade de produzir sua própria expansina, como as bactérias do gênero *Xanthomonas* e os fungos do gênero *Aspergillus*. As swollelinas atuam de maneira semelhante as expansinas, porém não ocorrem naturalmente nas plantas, sendo produzida apenas por fungos. Outro grupo, as proteínas de atividade auxiliar da família 9 (Auxiliary Activity Family 9 proteins, ou AA9), é capaz de realizar a quebra das ligações as ligações  $\beta$ -1,4 em polissacarídeos insolúveis, porém, por se tratar de um conjunto de enzimas recentemente descobertas, não se sabe exatamente os mecanismos de ação deste grupo (Figura 5) (KIM et al., 2014).

**Figura 5.** Representação esquemática da ação de enzimas sinérgicas AA9, expansinas e swolloleninas e a ação das enzimas responsáveis pela quebra da celulose, Endoglucanases e Exoglucanases, juntamente com os módulos de ligação de carboidratos (CBM).



Fonte: KIM, et al. 2014.

Para a completa conversão de celulose a glicose, é necessário um coquetel composto por pelo menos três enzimas: a endo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.6), a exo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.91), e a  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21). Estas três enzimas agem em conjunto para a liberação dos monossacarídeos, em ação sinérgica. As enzimas envolvidas no processo atuam de maneira sinérgica, as CBHs (Cellobiohidrolases) atacam as extremidades livres criadas pela ação das Endoglucanases, que atuam nas regiões amorfas da fibra, enquanto as  $\beta$ -glucosidases promovem a clivagem das celbioses geradas pela ação das CBHs (DUTTA; WU, 2014). A inibição pelo produto é outro fator a ser considerado no sucesso da hidrólise enzimática (WALLACE et al., 2016). Durante um processo de

hidrólise enzimática, aproximadamente metade do produto é hidrolisado em menos de 24 horas, enquanto que o restante da reação leva cerca de dois dias a mais para se concluir. Esta diferença é causada principalmente pela inibição pelo produto, diminuindo drasticamente a velocidade da reação. Neste tipo de hidrólise enzimática, etanol, glicose e celubiose possuem os maiores níveis de inibição enzimática, tanto em beta-glucosidase isolada, quanto em compostos enzimáticos (XIAO et al., 2004).

Os produtos da própria hidrólise enzimática podem contribuir para diminuir a velocidade da reação com o passar do tempo, como por exemplo a celobiose, glucose e xilose (WALLACE et al., 2016). A quantidade de lignina residual durante a hidrólise enzimática pode ter efeito sobre o rendimento de hidrólise por aumentar a razão lignina/carboidrato, eficientemente criando uma barreira entre os carboidratos e as enzimas do processo (WALLACE et al., 2016). A lignina residual também tem influência no rendimento de hidrólise pela ligação irreversível com as enzimas. Wallace e colaboradores (2016) sugeriram que propriedades intrínsecas da celulose estão relacionadas com a diminuição da velocidade de reação observando a cinética de reação de celulose pura (avicel), chegando a conclusão de que as mesmas três etapas de reação ocorriam (fase inicial rápida, fase intermediária e fase final recalcitrante), e, portanto, o material não seria, independentemente do tempo de reação, completamente hidrolisado.

## 6. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito dos pré-tratamentos ácido diluído e deslignificação com clorito de sódio na superfície exposta da lignina, e na digestibilidade enzimática.

### 6.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos pré-tratamentos ácido e ácido seguido de deslignificação branda, na composição química da biomassa da cana-de-açúcar (fração externa, nó, entrenó e folha).
- Avaliar o efeito dos pré-tratamentos ácido e ácido seguido de deslignificação branda na digestibilidade enzimática das biomassas de cana-de-açúcar.
- Avaliar o efeito da superfície exposta da lignina no rendimento em glicose da hidrólise enzimática.
- Avaliar a área superficial total e específica da lignina utilizando o corante Azure B.
- Avaliar a caracterização química das biomassas antes e após os pré-tratamentos.

## **7. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **7.1 Separação das frações**

Os colmos de cana-de-açúcar e folhas foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia Canavieiro (CTC) de Piracicaba-SP. De modo manual, a fração externa foi separada (contendo epiderme – cerca de 2 a 3 mm da extremidade), a cana-de-açúcar livre de fração externa foi moída (em moenda) para extrair o suco (sacarose) e então lavada em água corrente para remoção de açúcares livres. Após esse processo, a separação do nó e entrenó foi realizada por corte manual, seguida de secagem em estufa a 45°C por 48 h. O material foi moído em um moinho de facas e selecionados usando peneira de 20 mesh (0,85 mm) (BRIENZO et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2011).

### **7.2 Pré-tratamento com ácido diluído**

As amostras de entrenó, nó, fração externa e folha foram submetidas a diferentes condições de pré-tratamento ácido utilizando ácido sulfúrico. Com 5 g de cada fração, pesadas em balança analítica (Chyo JK-200), as reações foram realizadas em frascos tipo Schott, usando volume reacional total de 50 mL, sendo a porcentagem de sólidos de 10 %. As concentrações de ácido empregadas foram 5, 10 e 20 % (m/m, massa de ácido por massa de material), em autoclave a 121°C por 30 min. Após esfriar, o material foi filtrado em papel de filtro comum. A fração sólida foi lavada com água destilada até o pH da água de lavagem atingir o pH da água destilada. O material foi seco em estufa a 45°C e armazenado em frascos plásticos para análises posteriores (BRIENZO et al., 2015).

### **7.3 Deslignificação branda com clorito de sódio (NaClO<sub>2</sub>) após pré-tratamento com ácido**

Após pré-tratamento com ácido diluído, nas condições do item 7.2, as amostras ainda úmidas de entrenó, nó, fração externa e folha pré-tratadas foram submetidas a deslignificação branda com clorito de sódio. 30 % m/m de NaClO<sub>2</sub>, e mais 0,5 mL de

ácido acético anidro em 50 mL de água destilada foram adicionados aos frascos contendo as amostras provenientes do pré-tratamento ácido. A reação ocorreu em banho-maria (Panem, Dubnoff 145) a 70°C por 1 h (SIQUEIRA et al. 2013). Após resfriar, foi realizada a filtração em papel de filtro comum, sendo a fração líquida descartada. A fração sólida foi lavada com água destilada até o pH da água de lavagem atingir o pH da água destilada. O material foi seco em estufa a 45°C e armazenado em frascos plásticos para análises.

#### **7.4 Determinação da Atividade enzimática**

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a técnica descrita por Ghose (1987). Tiras de papel de filtro Whatman nº1 (1x6 cm) foi adicionada a tubos de ensaio contendo 1 ml de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 50°C por 60 minutos e a reação foi interrompida com 3 mL de DNS. Os tubos foram então fervidos a 100°C em banho maria por 5 minutos. Em seguida, 20 mL de água destilada foi adicionada e a então procedeu-se a leitura da absorbância do conteúdo a 540 nM. O controle foi feito substituindo o papel de filtro e o volume da enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8. Nos controles para cada amostra, DNS foi adicionado antes do extrato enzimático para descontar a produção de açúcar não relacionada a reação enzimática. A curva padrão de glicose foi construída utilizando reagente D-glicose (Merck) em concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg/mL.

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo completamente 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio, em 1,4 L de água destilada. A seguir, foram adicionados 300 g de tartarato de sódio e potássio; 7,6 g de fenol (aquecido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O volume foi acertado para 1,5 L; filtrado e armazenado em frasco âmbar (MILLER, 1959).

## 7.5 Hidrólise enzimática das amostras

As amostras *in natura* e pré tratadas com ácido diluído, pré-tratada ácido e deslignificada com clorito de sódio foram submetidas a hidrólise enzimática para avaliar o rendimento em glicose. Cerca de 0,1 g de amostra foi pesado em tubos falcon de 50 mL, e submetido a hidrólise enzimática para comparar a digestibilidade utilizando coquetéis comerciais (Cellic Ctec II - Novozymes), em 5 ml de tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A atividade enzimática utilizada foi de 30 FPU/g, em reação a 50°C e agitação de 150 rpm em incubadora shaker (SL-222, SOLAB), por 24 h (BRIENZO et al., 2015). O rendimento em glicose (anidroglicose, fator de hidratação 0,9) foi expresso com base no conteúdo de celulose no material.

## 7.6 Composição química dos materiais

As amostras *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído, pré-tratada ácido e deslignificada com clorito de sódio foram caracterizadas quanto ao conteúdo de glucana/celulose, hemicelulose (xilose e arabinana) e lignina. A composição química foi determinada em reação com ácido sulfúrico concentrado com as amostras livres de extrativos (SLUITER et al., 2010). Cerca de 0,3 g de amostra foi pesada em balança analítica e então colocada em frasco tipo Schott de 100 mL e adicionados de 3 mL de ácido sulfúrico 72 %. Os frascos foram então colocados em banho maria a 30°C por 1 hora. Após percorrido este período de tempo, foram adicionados aos frascos, cerca de 84 mL de água destilada, os frascos foram então fechados e colocados em autoclave, a 121°C 1 atm por 1 hora. O conteúdo dos frascos foi filtrado em cadinhos de placa porosa com o auxílio de uma bomba a vácuo. A fração solúvel foi utilizada para determinação de glicose, xilose, arabinose, e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna Aminex HPX-87H a 60°C, eluída com ácido sulfúrico 0.01 M em um fluxo de 0,6 mL/min. Os açúcares foram quantificados utilizando detector de índice de refração (SLUITER et al., 2010). A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria (retida no filtro/cadinho), e a lignina solúvel em ácido foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro a 240 nm.

## 7.7 Preparo do corante Azure B, determinação da absorvidade molar e padronização de parâmetros

Uma solução do corante Azure B foi preparada em concentração de 1 g/L, em tampão fosfato de sódio pH 7 (SIPPONEN et al., 2014b). A solução tampão foi preparada adicionando 8,66 g de acetato de sódio trihidratado e 2,16 g de ácido acético glacial em 1L de água deionizada. Para evitar contaminação microbiológica, 0,01 % de azida sódica foi adicionada, e a solução foi armazenada em geladeira.

Para a padronização do tempo de reação, foram realizados ensaios em 3, 6, 9, 12, 18 e 24 h, determinando o período suficiente para atingir o equilíbrio de adsorção (SIPPONEN et al., 2014b). O efeito da temperatura na adsorção do corante os grupos hidroxila presentes na lignina foi avaliado utilizando 0,02 g de lignina extraída em ácido fosfórico (gentilmente doada pelo Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves - IPBEN) suspensos em tubos falcon de 50 ml, contendo 5 ml da solução de corante. A suspensão foi agitada a 150 rpm, às temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C por 24 horas.

## 7.8 Determinação da superfície exposta ou área superficial da lignina (ASL) e área superficial específica da lignina (ASEL)

A área superficial da lignina (ASL) foi determinada com o corante catiônico Azure B. Cerca de 20 mg de material foi pesado em tubo falcon de 50 mL, em solução 0,1 g/L de solução Azure B em pH 7. A mistura reacional foi submetida a temperatura de 25°C, e agitada a 200 rpm por 24 h. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min e a absorvância determinada em 647 nm em espectrofotômetro. A concentração de corante adsorvida foi determinada pela subtração da absorvância de solução de corante na ausência do material (Sipponen et al., 2014b). A área superficial da lignina foi determinada pelo uso da equação 1, enquanto que a área de superfície específica da lignina (ASEL) foi determinada pela equação 2.

$$\text{Equação 6. } SA = 0.88Fsbg \left( \frac{1.55qe}{305.83} \right) * 397$$

$$\text{Equação 8. } SSA = \frac{SA}{PL}$$

Na equação 1, 0,88 corresponde ao fator de correção a ligação inespecífica do corante com carboidratos; F é o fator de correção baseado no valor total de lignina na fração sólida apenas; 1,55 é a razão entre capacidade de adsorção máxima do material e a adsorção de corante no material em equilíbrio;  $q_e$  é a adsorção de corante obtida no ensaio; 397 ( $m^2/mmol$ ) é a área coberta pelo corante Azure B; 305.83 é a massa molar do corante Azure B. Na equação 2, PL corresponde a soma em porcentagem massa/massa da lignina total no material.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Pré-tratamento ácido diluído

O pré-tratamento com ácido diluído (% , massa de ácido por massa de material) foi realizado seguindo as condições determinadas na metodologia, utilizando 5 g de massa (base seca) de cada fração da biomassa de cana-de-açúcar (fração externa (contendo epiderme), nó, entrenó e folha). Após o pré-tratamento, obteve-se um material agora então denominado pré-tratado, o qual tem suas propriedades e composição modificada em função do pré-tratamento e suas condições (BRIENZO et al., 2017). Uma das primeiras informações obtidas foi a recuperação de massa (base seca), quantidade de material pré-tratado obtido após o pré-tratamento. A recuperação de massa pode ser um indicativo da recalcitrância do material, sendo a solubilização de carboidratos um dos principais fatores que colaboram com essa perda (BENJAMIN et al., 2013).

Os resultados estão dispostos em termos de porcentagem de massa recuperada em relação a massa inicial aplicada no pré-tratamento (% , m/m). Neste caso, um valor de 40 % de recuperação de massa significa que de 5 g iniciais, 2 g foram obtidos após a pesagem do material livre de umidade.

A Figura 6 mostra os resultados obtidos após a pesagem do material pré-tratado. Observou-se que para a fração externa, os resultados obtidos foram semelhantes independente da concentração de ácido utilizada, resultando em torno de 37 % de recuperação de massa. Para o nó e folha, a recuperação de massa aumentou de maneira inversamente proporcional a concentração de ácido empregado. Para concentrações de ácido iguais a 5 %, menor concentração empregada neste trabalho, a recuperação de massa ficou próxima de 65 % e 68 %, respectivamente (Figura 6).

Para o entrenó ocorreu uma pequena diminuição na recuperação de massa conforme a concentração de ácido aumentou de 5 para 10 %. Empregando 20 % de ácido, maior concentração utilizada, o resultado mostrou tendência em diminuir a recuperação de massa, chegando a 50 %.

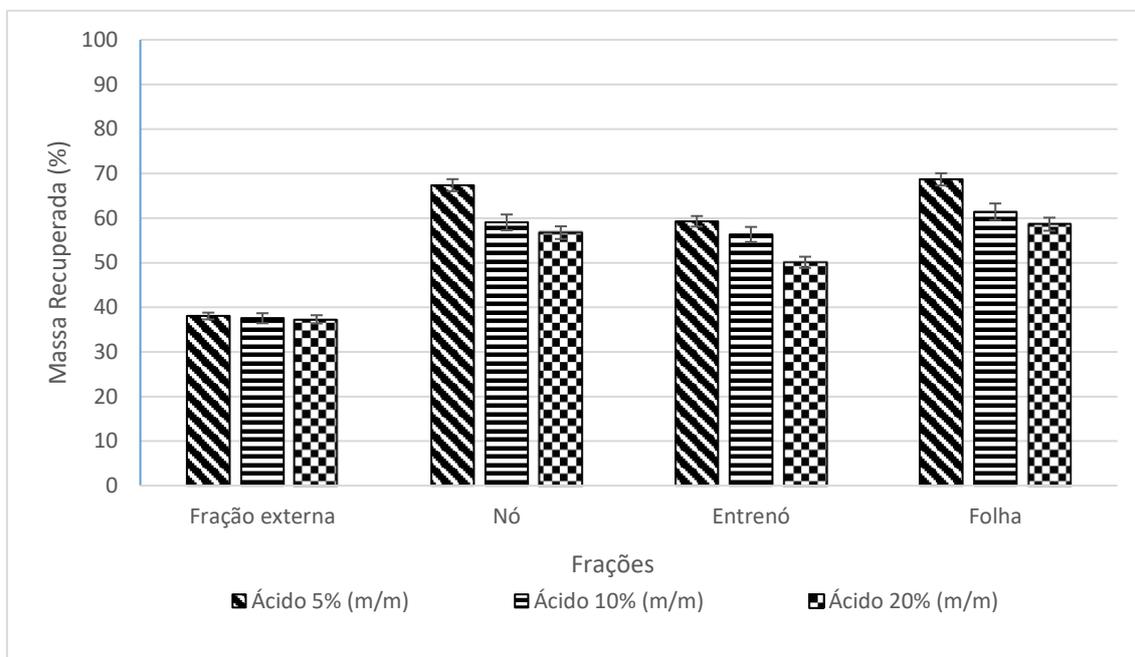
Os pré-tratamentos com ácido diluído tem como principal objetivo/efeito solubilizar a hemicelulose, aumentando a concentração relativa de celulose e lignina no material pré-tratado (SANTOS et al., 2018). Benjamin e colaboradores (2013)

demonstraram que a aplicação do pré-tratamento ácido em concentração de 0.5 % levou a uma redução média de arabinoxilana na composição química do material em 50 %. Este resultado sugere que uma parte da redução da massa após o pré-tratamento seja proveniente da remoção do total de hemicelulose. Brienzo et al. (2014) obtiveram comparativamente, em seu trabalho, resultados diferentes analisando a recalcitrância das diferentes frações (fração externa, nó e entrenó) do caule de cana-de-açúcar. O trabalho demonstrou que a fração externa é a mais recalcitrante entre as três estudadas. No trabalho, a fração externa foi o material com menor quantidade de hemiceluloses.

De maneira controversa a literatura (BRIENZO et al., 2014), este trabalho apresenta a fração externa com a maior perda de massa em comparação com as frações de nó e entrenó, as quais apresentaram uma redução de massa menos pronunciada (Figura 6). Entretanto, existe uma diferença entre os procedimentos utilizado no presente trabalho e no de Brienzo et al., (2014). Brienzo et al., (2014) submeteram o material a diversas lavagens para remoção de açúcares livres, incluindo processo de extração com etanol 96 %, e água destilada em soxhlet. O procedimento de lavagem aplicada resultou também na remoção de extrativos (Tabela 1). Uma vez que no presente trabalho os extrativos não foram removidos previamente ao pré-tratamento, uma maior perda de massa também ocorreu em função dos extrativos que foram solubilizados. Observou-se uma remoção de extrativos equivalente a 50 % em massa na fração externa (tópico referente a caracterização química), o que pode justificar a baixa recuperação obtida após o pré-tratamento ácido. A massa de extrativos para as outras frações condizem melhor com a massa recuperada após o pré-tratamento, levando a cerca de 75 % de recuperação para estes casos.

Apesar do pré-tratamento ácido melhorar a digestibilidade do material, ocorrem também a formação de produtos indesejáveis (RAJAN; CARRIER, 2014). O uso de ácidos como catalisadores em pré-tratamentos pode ocasionar em alguns efeitos colaterais que se agravam conforme a concentração de ácido ou severidade aumenta. Por exemplo, pode ocorrer a formação de produtos de degradação de polissacarídeos como o furfural proveniente da desidratação de pentoses, e o hidroximetilfurfural (HMF) proveniente de hexoses como a glicose (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

**Figura 6.** Recuperação de massa para o pré-tratamento com ácido diluído da biomassa de cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha) em concentrações de 5, 10 e 20 % (m/m), 30 min a 121°C.



## 8.2 Deslignificação branda com clorito de sódio do material pré-tratado com ácido

Em seguida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, as amostras ainda úmidas foram submetidas a uma deslignificação branda com clorito de sódio. O experimento foi realizado em uma única concentração de clorito de sódio, utilizando como base a massa de cada uma das frações resultante após o pré-tratamento previamente determinada (recuperação de massa – Figura 6).

A figura 8 apresenta os resultados de recuperação de massa obtidos das amostras do pré-tratamento com ácido diluído seguido de deslignificação branda com clorito de sódio. Nesta figura, a recuperação de massa refere-se somente da etapa com clorito de sódio. A fração externa resultou em uma recuperação em torno de 50 % da massa inicial para amostras pré-tratadas com ácido em concentração de 5 %, e uma recuperação em torno de 67 % para as concentrações de ácido em 10 % e 20 %. A porção correspondente ao nó apresentou valores próximos de 71 % para as

concentrações de ácido 5 % e 20 %. Amostra de nó pré-tratada com 10 % de ácido resultou em cerca de 77 % de recuperação de massa. O entrenó apresentou um padrão de recuperação bastante estável em comparação com as outras frações, onde as concentrações de ácido levaram a uma recuperação em torno de 73 %, considerando o desvio padrão (erro) das médias apresentadas. A folha mostrou uma variação em relação as concentrações de 5 % e 20 %, que resultaram em recuperação de massa em torno de 75 %. A concentração de 10 % de ácido manteve um padrão de recuperação de massa de cerca de 70 % (Figura 7). É provável que estes valores sejam estatisticamente semelhantes.

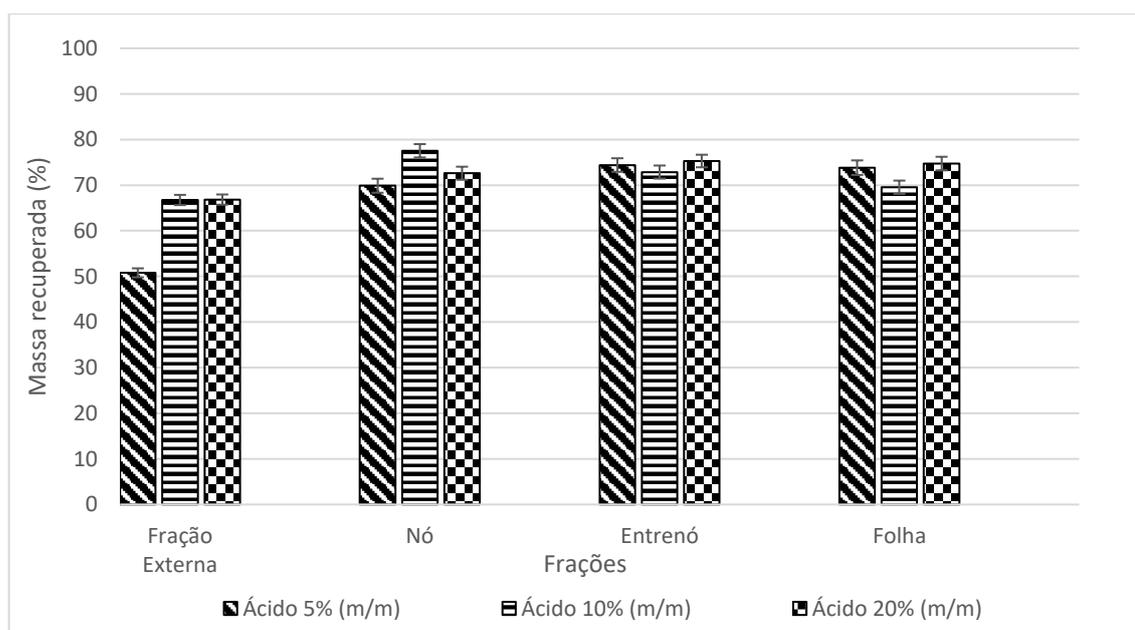
A figura 7 apresenta os resultados de recuperação de massa, considerando o efeito cumulativo do pré-tratamento ácido diluído e deslignificação branda com clorito. Observa-se que a recuperação de massa é menor por considerar a remoção provocada pelo pré-tratamento ácido e a deslignificação. O perfil de recuperação de massa se manteve semelhante para a fração externa, em concentrações de ácido de 5 % uma recuperação de massa total de cerca de 20 % foi observada. Para 10 % e 20 % de ácido, resultou em uma recuperação de massa em torno de 25 %. Para as frações do nó e entrenó, uma relação direta entre a concentração de ácido aplicada na primeira etapa e a recuperação de massa final, de maneira que para concentrações de ácido em 5 %, foram recuperadas cerca de 47 % e 43 %, respectivamente para 10 % de ácido a recuperação de massa foi de 42 % e 41 %, respectivamente para 20 % de ácido o resultado foi de 41 % para o nó e 38 % de recuperação de massa para o entrenó. Os resultados obtidos para a folha demonstram que as concentrações de 10 % e 20 % não possuem diferenças significativas em termos de recuperação de massa total, mantendo-se em torno de 43 %. A concentração de 5 % de ácido resultou em cerca de 50 % de recuperação total de massa (Figuras 7 e 8).

O emprego de clorito de sódio em meio ácido (ácido acético) promove a remoção seletiva da lignina através da sua solubilização (SIQUEIRA et al., 2013). No presente estudo, o clorito de sódio foi empregado em condições brandas para deslignificação parcial do material previamente pré-tratado com ácido diluído. De fato, foi utilizada uma carga de clorito de sódio quatro vezes menor do que reportado na literatura (BRIENZO et al., 2015; SIQUEIRA et al; 2013). Deste modo, era esperado que a deslignificação ocorresse somente na lignina re-depositada na superfície do material, por efeito do pré-tratamento ácido. O emprego deste da deslignificação

branda em sequência ao pré-tratamento com ácido diluído teve como objetivo remover dois dos três principais componentes da biomassa. A hemicelulose, a qual foi removida na primeira etapa com ácido diluído, e a lignina superficial (provavelmente), resultando em um material rico em celulose.

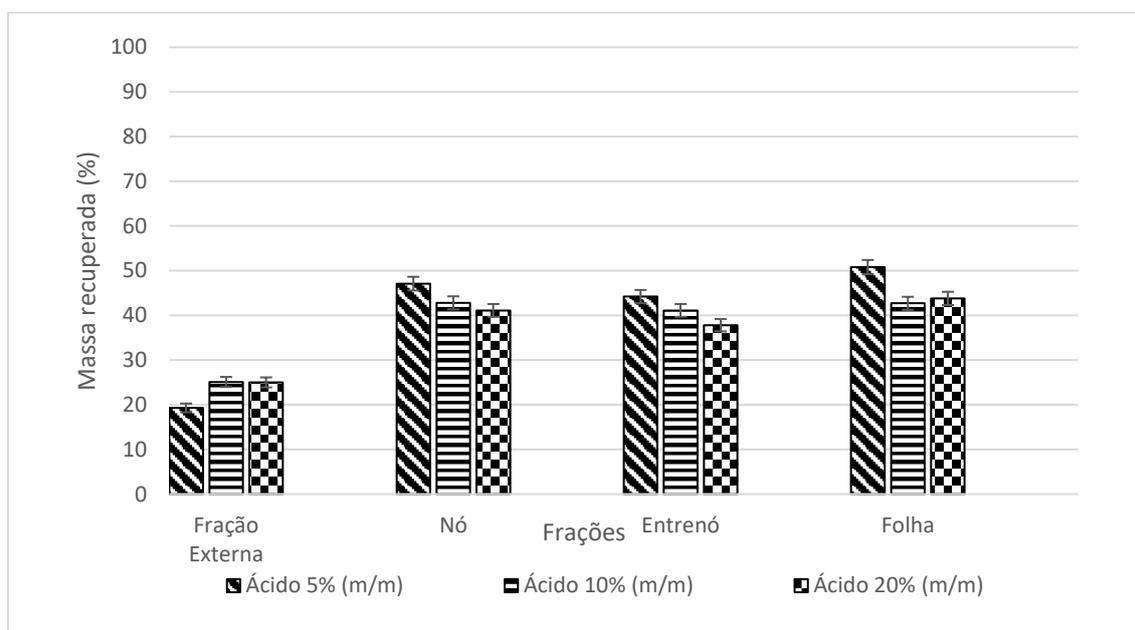
A remoção seletiva da lignina tem consequências na composição química do material, já que as ligações entre os polissacarídeos e a lignina ficam comprometidas e, portanto, alguma quantidade de carboidratos pode ser perdida, além de diminuir o grau de polimerização da celulose (SIQUEIRA et al., 2013). No estudo apresentado por Siqueira et al (2013), demonstraram que cerca de 41 % da lignina inicial de bagaço de cana-de-açúcar não-tratado foi removida após apenas uma hora de reação com clorito de sódio. Com cinco horas de reação o teor de lignina residual no material foi inferior a 5 %. Estes resultados confirmam que o principal responsável pelo decréscimo na massa recuperada apresentada nos resultados de deslignificação (Figura 7 e 8) é a remoção seletiva da lignina.

**Figura 7.** Recuperação de massa\* para a deslignificação branda com clorito de sódio das amostras pré-tratadas com ácido diluído (5, 10 e 20 %, 121°C/30 min). Carga de clorito de sódio 1,5 g e 0,5 mL de ácido acético, volume reacional de 50 mL, a 70°C por 1 h.



\* A recuperação de massa é referente somente ao efeito da deslignificação com clorito de sódio.

**Figura 8.** Recuperação de massa\* após os pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído (5, 10 e 20 % m/m 121°C/30 min) e a lavagem com clorito de sódio (30 % m/m NACIO a 70°C/1 h).



\*A recuperação de massa é baseada no total de massa recuperada, com efeito cumulativo do pré-tratamento ácido diluído seguido da deslignificação branda com clorito de sódio.

### 8.3 Composição química das biomassas de cana-de-açúcar

As biomassas de cana-de-açúcar, fração externa, nó, entrenó e folha, tanto *in natura* quanto pré-tratadas com ácido diluído e submetidas ao processo de deslignificação branda com clorito de sódio, foram caracterizadas quanto a sua composição química. Esta composição foi baseada no conteúdo de celulose/glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina (solúvel e insolúvel), os quais são os principais componentes da biomassa lignocelulósica (SIQUEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Compostos como extrativos e cinzas foram determinados na biomassa *in natura* (Tabela 1).

A caracterização quanto ao conteúdo dos componentes principais da biomassa do material *in natura* está descrita na Tabela 1. A fração externa apresentou 40,03 % de celulose, 21,56 % de xilose, 3,85 % de arabinose, 3,14 % de ácido acético e 34,41 % de lignina. A composição do nó foi caracterizada em 38,61 % de celulose,

21,85 % de xilose, 4,19 % em arabinose. 3,42 % em ácido acético e 33,59 % de lignina. A composição química do entrenó apresenta as maiores quantidades de celulose, 45,54 %, e xilana, 22,64 %, e a menor quantidade de lignina, ficando em 26,56 %, enquanto a arabinana e ácido acético apresentaram teor de 4,33 % e 3,54 % respectivamente. A folha apresentou em sua composição 37,24 % de celulose, 20,72 % e 1,48 % de xilose e arabinose respectivamente, 1,20 % de ácido acético e a maior quantidade de lignina entre as frações aqui avaliadas, 40,79 %.

**Tabela 1.** Composição química das biomassas de cana-de-açúcar fração externa, nó, entrenó e folha *in natura* quanto ao conteúdo de celulose, xilana, arabinana, ácido acético, lignina, cinzas e extrativos.

Amostra	Composição química (% , massa seca)							Total
	Glucana	Xilana	Arabinana	Ác. Acético	Lignina	Cinzas	Extrativos*	
F. ext	40,03±4,03	21,56 ± 2,09	3,85 ± 0,47	3,14 ± 0,38	34,31 ± 0,92	0,32 ± 0,05	50,89 ± 1,34	102,19
Nó	38,61±0,91	21,85 ± 0,53	4,19 ± 0,05	3,42 ± 0,04	33,59 ± 2,14	1,61 ± 0	10,08 ± 1,26	101,67
Entrenó	45,54±3,68	22,64 ± 1,67	4,33 ± 0,16	3,54 ± 0,13	26,56 ± 1,38	0,07 ± 0,03	26,75 ± 0,86	102,62
Folha	37,24±1,00	20,72 ± 0,31	1,48 ± 0,02	1,20 ± 0,02	40,79 ± 4,17	5,40 ± 0,08	16,70 ± 0,76	101,44

\* Somatório não inclui extrativos (caracterização química foi realizada com material livre de extrativos).

F. ext: Fração externa;

Ác. Acético: Ácido acético;

Os conteúdos de glucana, xilana, arabinana, ácido acético e lignina dos materiais pré-tratados estão dispostos na Tabela 2. A abordagem dos resultados neste trabalho compara primeiramente os resultados obtidos nos experimentos realizados com a biomassa pré-tratada, para cada uma das frações, com ácido sulfúrico nas descritas concentrações (5, 10 e 20 %, m/m). Em seguida foram comparados os efeitos da aplicação do da deslignificação branda com clorito de sódio nas amostras pré-tratadas com ácido, na composição química de cada uma das biomassas/frações da cana-de-açúcar.

O pré-tratamento ácido da fração externa resultou em um aumento em porcentagem de celulose, chegando a 46,22 % com a maior concentração de ácido (Tabela 2). A hemicelulose apresentou uma diminuição constante relativa a concentração de ácido empregado no pré-tratamento. A redução no teor de xilana, a qual é a hemicelulose representativa da biomassa de cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2009), para 8,14 % quando a concentração de ácido empregada foi 20 %. As

concentrações de ácido acético e arabinana foram inicialmente baixas, sendo de 3,14 % e 3,85 %, respectivamente. Com o pré-tratamento, o ácido acético e arabinana foram completamente removidos. De modo geral, o ácido acético e arabinana reduzem com o aumento da concentração de reagente no pré-tratamento. Esta tendência foi observada para todas as frações da biomassa de cana-de-açúcar. Em comparação com o material *in natura*, o uso de 5 % de ácido sulfúrico removeu cerca de 40 % do conteúdo de xilana inicial, e mais de 80 % do conteúdo de arabinana, removendo mais de 50 % e 90 %, respectivamente, quando a concentração de ácido foi igual a 10 %, e removeu 58 % e 100 %, respectivamente, com a concentração mais elevada de ácido, 20 %. A remoção de hemicelulose pode ser parcial ou completa, dependendo das condições empregadas no pré-tratamento (BRIENZO et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

O pré-tratamento ácido diluído resulta em um aumento em concentração de lignina em porcentagem, devido a remoção de outros componentes da biomassa (BRIENZO et al., 2017; MENG; RAGAUSKAS, 2017; SANTOS, et al., 2018). Para remover parcialmente o conteúdo de lignina, e principalmente a lignina que depositada na superfície da fibra, uma deslignificação branda foi aplicada nos materiais pré-tratados com ácido diluído. A deslignificação foi realizada logo após o pré-tratamento ácido diluído, sem a secagem do material.

A deslignificação branda com clorito de sódio resultou em uma diminuição na proporção de lignina no material pré-tratado com ácido. Ocorreu uma redução da lignina em cerca de 7 % para o material pré-tratado com 5 % de ácido, 25 % para o material pré-tratado com a concentração intermediária de ácido (10 %) e aproximadamente 27 % para a concentração mais elevada que foi 20 % de ácido. Os resultados sugerem que para a fração externa, a capacidade de deslignificação por meio de clorito de sódio aumentou conforme a concentração de ácido empregado previamente no pré-tratamento. Em relação ao material *in natura*, a remoção de lignina foi cerca de 44 %, 70 % e 90 % de lignina para as concentrações de ácido iguais a 5, 10 e 20 %, respectivamente.

O pré-tratamento ácido diluído da fração de nó apresentou um aumento crescente, atingindo 41,95 % de celulose com a concentração mais elevada, que foi 20 % de ácido. As concentrações de ácido de 5% e 10 % apresentaram resultados estatisticamente semelhantes de celulose, sendo de maneira geral a porcentagem de

celulose nos materiais em torno de 40 % para as três condições de pré-tratamento (Tabela 2). O teor de hemicelulose diminuiu gradativamente conforme o aumento da concentração de ácido empregado no pré-tratamento. A menor concentração de ácido reduziu o conteúdo de xilana para 5,89 % e 4,95 % para 20 % de ácido. A porcentagem em massa de ácido acético no material também diminuiu conforme a concentração de ácido sulfúrico empregado aumentou, sendo 1,7 % quando a concentração de ácido foi de 5 %, diminuindo até cerca de 0,5 % quando 20 % de ácido foi empregado. Em relação a proporção de lignina no material os valores aumentaram de 33,59 % do material *in natura* para 41,95 % no material pré-tratado com ácido 20 %. Para as três concentrações de pré-tratamento empregadas, o teor de lignina se manteve na média de 42 %.

Após a aplicação da deslignificação branda com clorito de sódio, ocorreu uma redução no conteúdo de lignina presente na fração do nó (Tabela 2). Os teores foram de 18,49; 16,79 e 13,18 % para as concentrações de ácido de 5, 10 e 20 %, respectivamente. Estes resultados indicam que de maneira semelhante a fração externa, a concentração de ácido previamente aplicada no pré-tratamento ácido parece amplificar o efeito do clorito de sódio na remoção da lignina. De fato, a literatura sugere que com o aumento da concentração de ácido/severidade do pré-tratamento ácido, maior é a deposição da lignina na superfície da fibra (BRIENZO et al., 2017). A deslignificação branda foi aplicada com objetivo de remover esta lignina depositada na superfície da fibra de celulose. Assim, quanto maior a concentração de ácido, maior a realocação ou deposição da lignina sobre a fibra de celulose, e maior a remoção com a deslignificação com clorito (Tabela 2).

Para a fração do entrenó, valores próximos de 40 % foram obtidos para celulose, empregando 5 % de ácido no pré-tratamento. A concentração intermediária (10 % de ácido) aumentou para 48,64 %, e com a concentração maior que foi 20 %, o teor foi de 50,49 %. O teor de xilana diminuiu para as diferentes condições de pré-tratamento, de 4,49 % para a menor concentração, até 3,24 % para a concentração mais elevada. O teor de lignina foi de 36,6 % utilizando 5 % de ácido, e 33,79 % e 34,32 % para 10 % e 20 % de ácido. Após a deslignificação com clorito de sódio ocorreu uma diminuição no teor de lignina. Para o material pré-tratado com 5 % de ácido foi de 21,92 %, e para pré-tratados com 10 % e 20 % foi de 19,04 % e 14,33 %, respectivamente.

Para a folha da cana-de-açúcar, o teor de celulose no material foi de 37,24 % para a menor concentração de ácido (5 %), 36,38 % para a concentração intermediária e 37,76 % para a maior concentração, indicando que o pré-tratamento não surtiu efeito neste componente. Em relação a hemiceluloses (xilose e arabinose) os resultados indicam um decréscimo significativo entre as três concentrações de ácido empregadas, obtendo 7,96 % em massa para a menor concentração de ácido, 5,81 % para a concentração intermediária e 3,68 % para a maior concentração de ácido. Em relação ao ácido acético no material observa-se proporções semelhantes para as duas primeiras concentrações de ácido no pré-tratamento, e um decréscimo significativo para a concentração mais elevada. Para a lignina, foram obtidos resultados próximos para as concentrações de 5 % e 10 %, 58,09 % e 58,22 % respectivamente, enquanto que para a maior concentração de ácido a média ficou em 63,11%, porém, os desvios sugerem que as diferenças entre as três condições não são significativas. Observa-se, comparando com o material *in natura*, que enquanto a proporção de xilana no material diminui, a concentração de lignina aumenta, levando a maior concentração de lignina entre as três frações estudadas.

Com a aplicação da metodologia de deslignificação branda, os valores referentes a concentração de lignina são reduzidos para em torno 30 % do valor inicial, passando de 58,09 % para 21,77 % para o material previamente pré-tratado com ácido diluído a 5 % e 10 %, e de 63,11 % para 23,75 % para o material pré-tratado com ácido a 20 % (Tabela 2).

Com objetivo de obter melhores rendimentos em termos de glicose durante a hidrólise enzimática, a remoção de hemicelulose e lignina pode ser realizada por diversos tipos de pré-tratamentos (SEIDL; GOULART, 2016). Neste trabalho foi utilizado um pré-tratamento com efeito na remoção de hemicelulose, o pré-tratamento ácido diluído, e a deslignificação com clorito de sódio, buscando uma redução no conteúdo de lignina.

A aplicação de pré-tratamentos com ácidos diluídos tem como finalidade a remoção primária da hemicelulose, porém outras mudanças estruturais podem ser geradas no material, como a modificação estrutural da lignina e a redução do tamanho de partícula (MESA et al. 2017). Por este motivo, pode-se observar uma diminuição na proporção de hemiceluloses (Xilana e Arabinana) em todos os casos, de maneira que a média obtida para cada uma das amostras pré-tratadas com cada uma das

concentrações de ácido é subsequentemente menor. Em comparação com os teores de xilana dos materiais *in natura*, ocorreu para todas as frações uma redução no conteúdo de xilana, indicando a eficiência do pré-tratamento em remover mais de 40 % da xilana com concentração de 5 %, aumentando proporcionalmente a concentração de ácido utilizado no pré-tratamento, até que cerca de 75 % da xilana foi removida. Entretanto, esta remoção ou redução do teor de xilana pode ser maior dependendo da fração em questão, como no caso do entrenó onde o teor de xilana foi removido em cerca de 90 % do teor em comparação com a xilana do material *in natura*.

Santos et al (2013) demonstraram em seu trabalho, que a solubilização de hemiceluloses aumenta conforme a duração do pré-tratamento, sendo que em 30 min, cerca de 45 % do conteúdo de xilana inicial foi solubilizado enquanto que, em média, 70 % do conteúdo de arabinana é solubilizado nesta mesma condição. Contribuindo com o que foi demonstrado no trabalho apresentado acima, os resultados aqui apresentados demonstram que para esta duração (30 min) diferentes concentrações de ácido possuem diferentes efeitos na solubilização da hemicelulose total do material.

**Tabela 2.** Composição química das biomassas de cana-de-açúcar fração externa, nó, entrenó e folha quanto ao conteúdo de celulose, xilana, arabinana, ácido acético e lignina, após pré-tratamento ácido diluído (5, 10 e 20 % m/m a 121°C/30 min) e deslignificação branda com clorito de sódio (30 % m/m, 70°C/1 h).

Composição Química (% base massa seca)							
Amostra	Condição	Glucana	Xilana	Arabinana	Ác. Acético	Lignina	Total
Fração externa	Ácido 5%	43,41 ± 1,37	13,09 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,44 ± 0,01	25,29 ± 4,75	82,84 ± 5,16
	Ácido 10%	43,13 ± 0,20	10,34 ± 0,38	0,29 ± 0,01	0,23 ± 0,01	30,11 ± 2,00	84,22 ± 2,58
	Ácido 20%	46,22 ± 0,55	8,32 ± 0,08	0 ± 0	0 ± 0	30,47 ± 0,28	85,21 ± 0,91
	Ácido 5% + clorito	52,44 ± 2,92	12,80 ± 1,51	1,0 ± 0,31	0,81 ± 0,25	18,30 ± 4,50	85,42 ± 9,49
	Ácido 10% + clorito	59,92 ± 1,61	10,46 ± 0,42	0,62 ± 0,01	0,50 ± 0,01	5,25 ± 3,89	76,87 ± 5,94
	Ácido 20% + clorito	62,32 ± 0,75	8,14 ± 0,10	0 ± 0	0 ± 0	2,34 ± 0,24	72,01 ± 1,09
Nó	Ácido 5%	38,46 ± 2,82	5,89 ± 0,16	2,07 ± 0,19	1,68 ± 0,15	42,67 ± 0,71	90,84 ± 4,03
	Ácido 10%	41,20 ± 2,69	4,95 ± 0,15	1,43 ± 0,39	1,17 ± 0,02	40,49 ± 3,48	90,22 ± 6,63
	Ácido 20%	41,95 ± 3,66	4,04 ± 0,16	0,63 ± 0,39	0,51 ± 0,32	41,95 ± 2,61	89,11 ± 7,14
	Ácido 5% + clorito	59,46 ± 1,70	13,94 ± 0,40	1,27 ± 0,11	1,03 ± 0,09	18,49 ± 2,73	94,26 ± 5,03
	Ácido 10% + clorito	62,94 ± 0,15	10,46 ± 0,29	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,03	16,79 ± 1,80	91,26 ± 2,3
	Ácido 20% + clorito	66,09 ± 2,36	9,08 ± 0,07	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,01	13,18 ± 3,21	89,04 ± 5,66
Entrenó	Ácido 5%	40,31 ± 0,45	4,49 ± 0,31	1,75 ± 0,12	1,43 ± 0,10	36,60 ± 0,05	84,65 ± 1,03
	Ácido 10%	48,64 ± 0,61	4,04 ± 0,22	1,47 ± 0,05	1,20 ± 0,04	33,79 ± 0,17	89,26 ± 1,09
	Ácido 20%	50,49 ± 0,63	3,24 ± 0,29	0,95 ± 0,06	0,77 ± 0,05	34,32 ± 0,24	89,99 ± 1,27
	Ácido 5% + clorito	47,06 ± 3,51	7,65 ± 0,94	0,92 ± 0,06	0,93 ± 0,04	21,92 ± 4,6	78,56 ± 4,55
	Ácido 10% + clorito	50,65 ± 0,44	6,19 ± 0,34	0 ± 0	0,71 ± 0,3	19,04 ± 0,18	76,71 ± 0,81
	Ácido 20% + clorito	59,57 ± 0,32	7,54 ± 0,80	0 ± 0	0,16 ± 0,06	14,33 ± 2,26	81,81 ± 1,18
Folha	Ácido 5%	36,38 ± 3,05	6,92 ± 1,62	1,04 ± 0	0,85 ± 0	58,09 ± 5,71	103,34 ± 10,38
	Ácido 10%	37,76 ± 1,13	4,63 ± 0,20	1,18 ± 0,44	0,96 ± 0,36	58,22 ± 2,52	102,76 ± 4,65
	Ácido 20%	37,31 ± 1,53	3,48 ± 0,35	0,20 ± 0,20	0,16 ± 0,16	63,11 ± 7,12	104,28 ± 9,36
	Ácido 5% + clorito	53,91 ± 3,07	14,66 ± 2,15	0,58 ± 0,25	0,47 ± 0,20	21,77 ± 0,63	91,46 ± 5,68
	Ácido 10% + clorito	58,64 ± 0,85	9,79 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	22,11 ± 0,63	90,89 ± 0,90
	Ácido 20% + clorito	59,62 ± 1,52	5,67 ± 1,90	0,56 ± 0,20	0,45 ± 0,10	23,75 ± 1,59	90,07 ± 3,80

Ácido 5, 10 e 20 %: pré-tratamento com ácido sulfúrico em percentagem m/m a 121°C/30 min; Ácido % + clorito: pré-tratamento com ácido sulfúrico seguido de deslignificação com clorito de sódio (30 % m/m, a 70°C/1 h).

Brienzo et al. (2014) trabalharam com as frações do nó, entrenó e a fração externa do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados apresentados para a fração externa variaram de 50 % a 55 % em termos de celulose para as concentrações de ácido de 5 % a 20 %. Diferentemente do presente trabalho, onde os teores de celulose obtidas, apesar de estarem crescentes conforme a concentração de ácido aumenta, foram de 43.13 % a 46.22 % para as concentrações de ácido de 5 % a 20 %. Uma das possíveis explicações para essa diferença pode estar na ocorrência da degradação dos carboidratos, principalmente a celulose em hidroximetilfurfural (HMF), que pode ser gerado em condições elevadas de temperatura e pressão, como as empregadas no pré-tratamento ácido (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Ainda, observa-se uma diferença no conteúdo de extrativos entre os dois materiais, uma vez que o trabalho em comparação teve os extrativos removidos antes do pré-tratamento. Quanto ao teor de lignina, os valores obtidos entre os dois trabalhos são próximos, todos em cerca de 30 %.

A fração de nó apresentou teor de lignina semelhante ao da fração externa, cerca de 34 %, enquanto para o entrenó este valor foi menor, 26,56 % (Tabela 2). Espera-se que os valores de lignina nas frações mais internas (nó e entrenó) sejam menores em comparação com a fração externa, já que a fração externa é formada pelos tecidos mais expostos a ações externas e, portanto, devem ser mais resistentes a ataques de microrganismos, chuvas e outras ações naturais degradativas (EVERT, 2006). De fato, a fração externa, próxima a epiderme, apresenta grande concentração de feixes vasculares, os quais são mais lignificados (BRIENZO et al., 2016). Em comparação, a folha foi a fração que apresentou maior conteúdo de lignina, 40,79 %, diferente dos valores apresentados na literatura, em torno de 10 %, porém, espera-se, para a fração em questão, um pequeno aumento no teor de lignina (MOODLEY; KANA, 2015).

A deslignificação branda com clorito de sódio foi empregada com objetivo de reduzir o conteúdo geral de lignina no material previamente pré-tratado com ácido diluído, gerando um material com elevado conteúdo de celulose. A modificação estrutural causada pelo pré-tratamento com ácido diluído acaba por gerar partículas de complexo lignina-carboidrato (realocação e pseudo-lignina) que acabam por precipitar sobre a fibra do material, contribuindo para a exposição da celulose. Porém, favorece a interação inespecífica entre enzima e estes complexos durante a etapa de

hidrólise enzimática (ZENG et al., 2014; WALLACE et al., 2016). Deste modo, a quantificação desses complexos de lignina é importante para avaliar o efeito do pré-tratamento, e seu impacto no rendimento de conversão em glicose.

A aplicação de clorito de sódio (em meio ácido - ácido acético) para a remoção seletiva de lignina foi demonstrada por Siqueira e colaboradores (2013), onde cerca de 41 % da lignina inicial presente em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi removido com 1 h de pré-tratamento. De acordo com os resultados exibidos na Tabela 2, pode-se observar que a aplicação do clorito de sódio após o pré-tratamento com ácido diluído resultou em uma deslignificação em cerca de 40 % para todas as frações estudadas. Porém, de maneira mais pronunciada na fração externa, onde quase toda a lignina (95 %) foi removida quando a deslignificação branda foi aplicada em conjunto com o pré-tratamento com a maior concentração de ácido. O entrenó e o nó apresentaram taxas de deslignificação de no mínimo 40 %, chegando até próximo de 70 % para a amostra de nó pré-tratada com ácido diluído a 20 %.

Observa-se para o entrenó, folha e fração externa que o balanço total de massa é reduzido em até 10 % após a aplicação da deslignificação branda com clorito de sódio. Esta diferença no balanço de massa pode estar relacionada com a degradação de açúcares (ZENG et al., 2014), pela ação de moléculas intermediárias geradas durante a reação do material com o clorito de sódio, como o ácido hipocloroso, clorito, clorato e cloro (KAFLE et al., 2015). Uma consequência da deslignificação é que pode ocorrer redução do grau de polimerização da celulose. Por exemplo, estudos com papel de filtro apresentou redução de até 35 % no grau de polimerização, e com avicel em até 5 % (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010).

## **8.4 Área de superfície da lignina**

### **8.4.1 Padronização do tempo, temperatura e agitação na adsorção do corante Azure B em material lignocelulósico.**

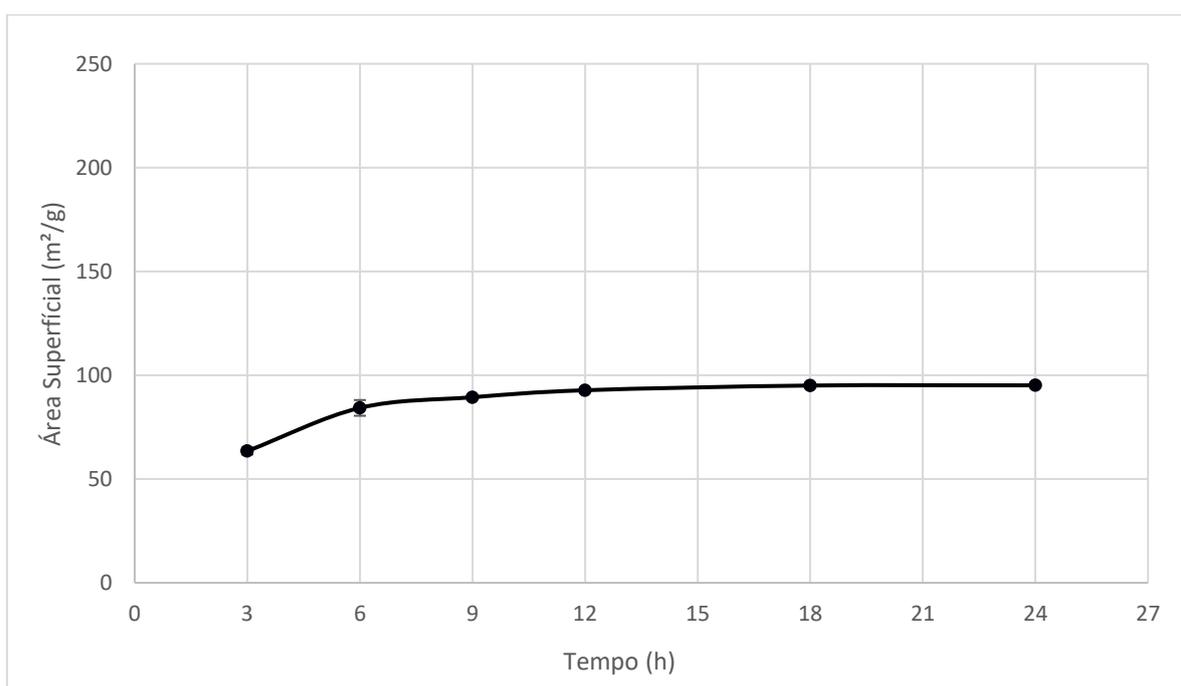
A Figura 9 mostra a área superficial específica obtida em função do tempo de ensaio. Apenas o sobrenadante foi utilizado para as medições apresentadas nesta figura. Observou-se um aumento na área específica do material utilizado no ensaio,

fração externa (cerca de 24 % de lignina) conforme o tempo de reação avança, partindo de 63,4 m<sup>2</sup>/g até 95.1 m<sup>2</sup>/g no final do período analisado.

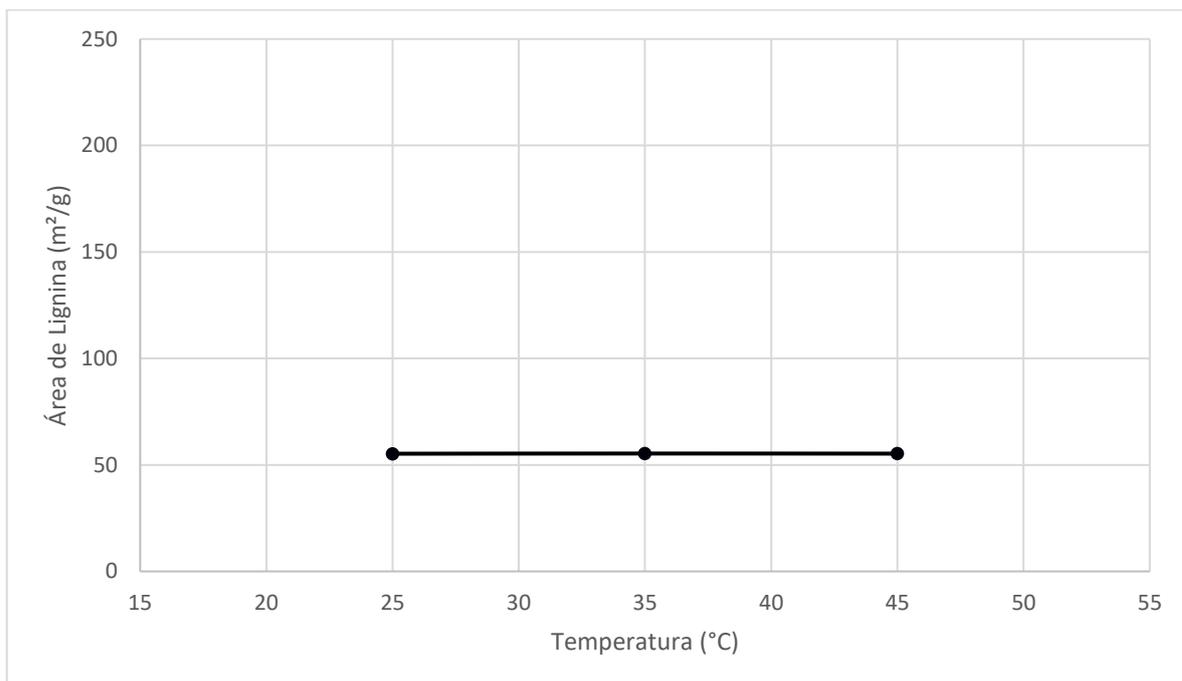
O Azure B é um corante catiônico que possui afinidade, neste caso, com os grupos hidroxila, presentes majoritariamente, nas moléculas de lignina (SIPPONEN et al., 2014). A área neste ensaio indica conseqüentemente a quantidade de corante que foi adsorvido as moléculas de lignina. A variação em área conforme o tempo de ensaio aumenta sugere que, no início do ensaio, pouco corante encontra-se adsorvido a lignina, e conforme o tempo de ensaio aumenta, a quantidade de corante adsorvido aumenta até aproximadamente 9 horas, onde a absorvância medida começa a estabilizar, indicando o início do período de equilíbrio, aumentando levemente até 12 horas, onde a partir desta marcação de tempo, pouca variação na absorvância é medida.

Os resultados obtidos em relação a variação na temperatura e seu impacto na área superficial exposta estão dispostos na Figura 10. Os dados apresentados sugerem que não existem efeitos na área obtida após a realização do ensaio nas condições utilizadas até a marca de 45°C, ficando em torno de 55 m<sup>2</sup>/g.

**Figura 9.** Efeito do tempo de ensaio na área superficial da lignina (ASL) e área superficial específica da lignina (ASEL) utilizando a fração externa (0.02 g) em solução de corante Azure B de concentração igual a 0.1 g/L por períodos entre 3 e 24 horas.



**Figura 10.** Relação entre a temperatura de ensaio e a área superficial total de lignina utilizando 0.02 g de lignina extraída utilizando ácido fosfórico suspensas em solução de corante Azure B de concentração igual a 0.1 g/L á diferentes temperaturas (25°C a 45°C).



#### 8.4.2 Área superficial da lignina (ASL) e específica (ASEL) nas biomassas de cana-de-açúcar pré-tratadas

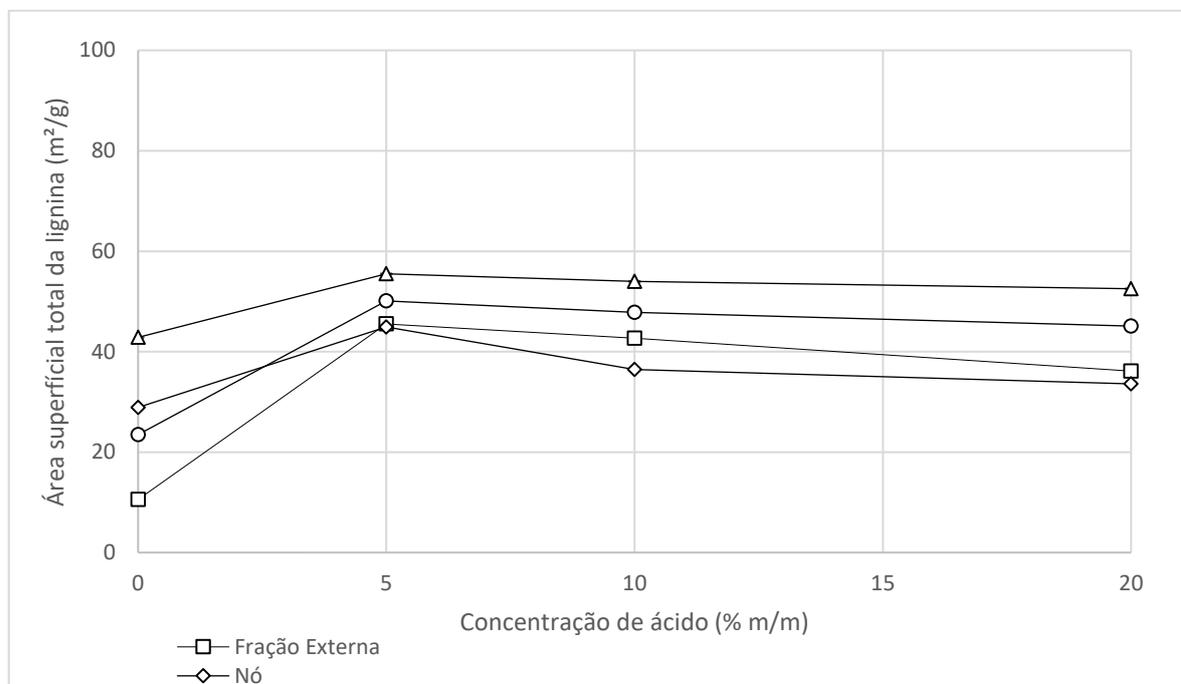
Um dos fatores relacionados ao rendimento de hidrólise enzimática é a porosidade, que é dada pela razão entre o volume dos poros e o volume da massa seca (JUNIOR et al., 2013). Durante o pré-tratamento ácido, a lignina é parcialmente solubilizada enquanto a temperatura está alta, e volta a se condensar após a queda da temperatura e final da reação, depositando-se em forma de gotículas sobre a fibra de celulose. A lignina agora depositada sobre a fibra/material possivelmente impede o acesso das enzimas ao substrato durante a etapa de hidrólise enzimática (LI et al., 2014). É possível que parte desta lignina que passa a ser solubilizada/depositada esteja presente entre as fibras de celulose, e, portanto, interfira na porosidade do

material. A lignina depositada sobre a fibra age como uma barreira física, protegendo a celulose; e provoca adsorção improdutiva, podendo se ligar de forma irreversível a proteínas/enzimas, diminuindo assim a carga de enzima na reação (WALLACE et al., 2016; SIPPONEN et al., 2017).

Para determinar a área superficial exposta da lignina as biomassas de cana-de-açúcar foram submetidas ao ensaio de adsorção com o corante Azure B. Os corantes catiônicos como o Azure B podem ser empregados para obter uma estimativa da quantidade de lignina presente no material, graças a sua capacidade de adsorção a grupos hidroxila ácida presentes na lignina (SIPPONEN et al., 2014). Neste estudo, os resultados foram expressos na forma de área superficial da lignina (ASL) ocupada, com base no total de material; e com base na massa total de lignina no material, sendo a área superficial específica da lignina (ASEL). A Figura 11 apresenta os valores obtidos para a superfície total em área ocupada pela lignina por grama de material.

Observa-se, para todas as frações estudadas um aumento da área superficial total em relação ao material *in natura* para o pré-tratado com 5 % de ácido e então uma leve tendência a diminuir ou estabilizar de acordo com a concentração de ácido utilizada no pré-tratamento (Figura 11). Apesar das semelhanças, a fração externa demonstrou a maior diferença entre o material *in natura* e o pré-tratado com ácido 5 %, de 10,5 m<sup>2</sup>/g para 45 m<sup>2</sup>/g. na fração do nó, essa diferença foi pouco maior que 30 %, passando de 28 m<sup>2</sup>/g para 44 m<sup>2</sup>/g.

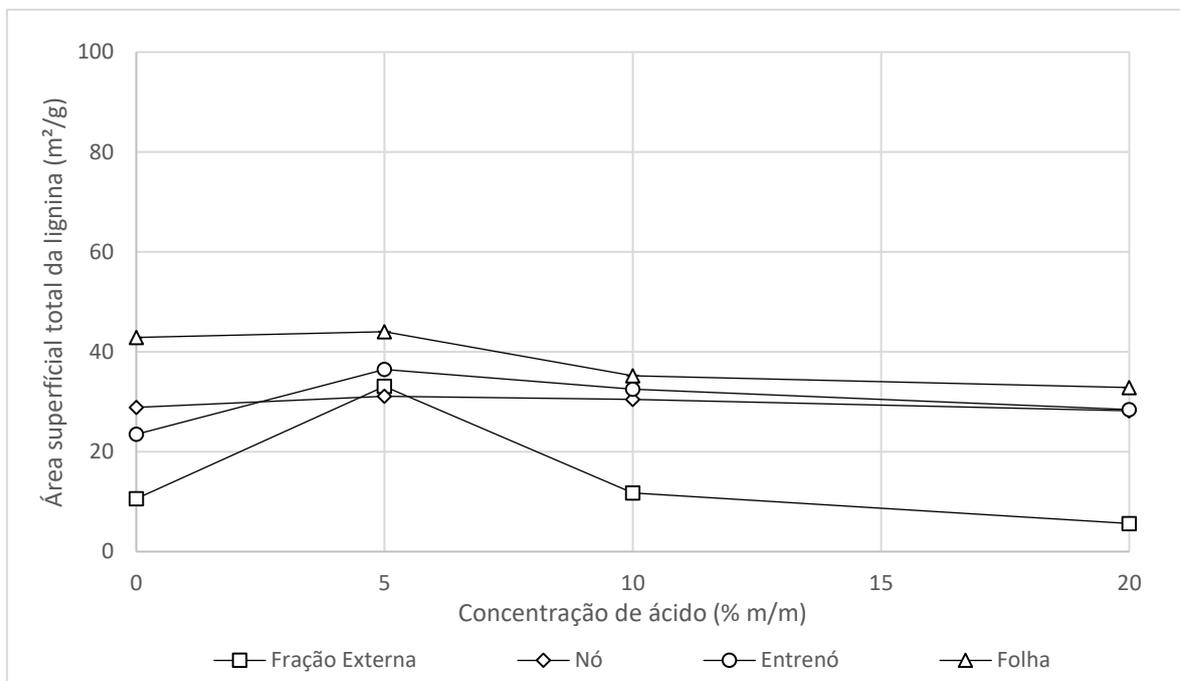
**Figura 11.** Área superficial total da lignina (ASL) para as biomassas da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha), *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (5, 10 e 20 %, m/m, 121°C/30 min).



As áreas superficiais totais para as amostras pré-tratadas com ácido diluído seguido de deslignificação com clorito de sódio estão dispostas em forma de gráfico na Figura 12. A amostra de fração externa *in natura* apresentou 10,5 m²/g em área de lignina, após o pré-tratamento ácido, essa área aumentou para aproximadamente 31 m²/g com a menor concentração (5 %), e então em declínio até a maior concentração de ácido, chegando a 5,6 m²/g. A amostra nó de apresenta a menor diferença entre a área *in natura* e a área após a aplicação dos pré-tratamentos e deslignificação, pouco menos de 2 m²/g, que diminuem para menos de 1 m²/g quando o material foi pré-tratado com 20 % de ácido.

Um aumento de 23 m²/g para 36 m²/g é observado entre as amostras *in natura* e pré-tratadas com 5 % de ácido para o entrenó, e então uma tendência em estabilizar em cerca de 28 m²/g. Os resultados obtidos com a folha apresentam um aumento de 42 m²/g para 44 m²/g entre o material *in natura* e o pré-tratado com 5 % de ácido, um decréscimo entre as concentrações de 5 % e 10 %, e um declínio menor entre 10 % e 20 %.

**Figura 12.** Área superficial total da lignina (ASL) as biomassas da cana-de-açúcar (fração externa, entrenó, nó e folha), *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (5, 10 e 20 %, m/m, 121°C/30 min) e seguida de deslignificação com clorito de sódio (30 % m/m, 70°C/1 h).

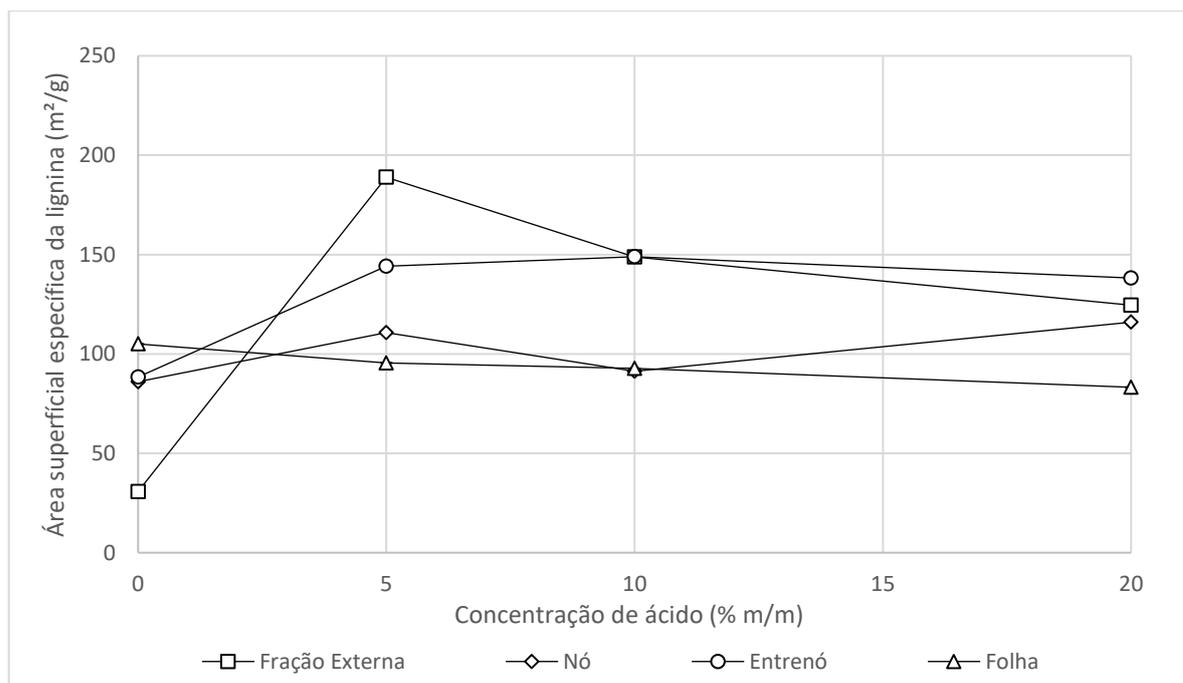


As figuras 13 e 14 apresentam os resultados referentes a área superficial específica da lignina (ASEL). A área inicial da fração externa (Figura 13) *in natura* foi de 30 m<sup>2</sup>/g, subindo para 180 m<sup>2</sup>/g após a aplicação de pré-tratamento ácido a 5 %, observa-se então uma tendência a diminuir conforme a concentração de ácido aumenta. O entrenó apresenta um aumento de 88 m<sup>2</sup>/g para 144 m<sup>2</sup>/g e então uma tendência a estabilizar após a concentração de 10 % de ácido. O nó inicia em 86 m<sup>2</sup>/g, aumenta para 110 m<sup>2</sup>/g e então diminui para pouco mais de 90 m<sup>2</sup>/g, voltando a apresentar uma tendência em aumentar para a concentração de ácido em 20 %. A folha apresenta uma tendência linear de decrescimento para toda a curva.

Na Figura 14 para as frações externa, nó e entrenó, ocorreu um aumento na área superficial específica da lignina conforme a concentração de ácido empregada, principalmente entre o material *in natura* e pré-tratado com ácido 5 % e clorito de sódio. Para concentrações de ácido mais elevadas, os valores aumentaram, porém de maneira menos pronunciada em comparação com este primeiro incremento. A

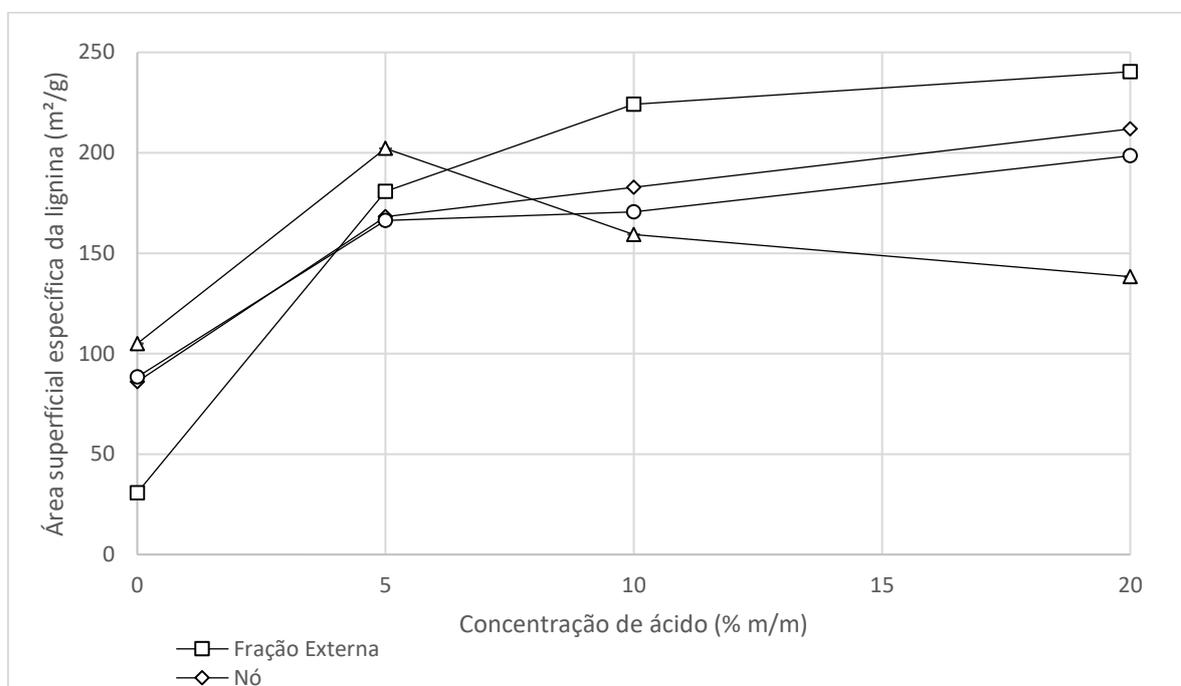
folha apresentou uma tendência diferente, aumentando após o pré-tratamento, porém diminuindo conforme a concentração de ácido aumentou.

**Figura 13.** Área de superfície específica da lignina (ASEL) para todas as frações, *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (5, 10 e 20 %, m/m, 121°C/30 min).



A lignina, como dito anteriormente, é uma macromolécula amorfa presente na parede celular, juntamente com a celulose e a hemicelulose. A lignina afeta os processos enzimáticos de diversas formas, agindo como barreira física impedindo consequentemente o acesso aos carboidratos estruturais e ligando quimicamente com as enzimas envolvidas no processo (HANSEN et al., 2013). A área superficial total da lignina, medida pelo corante Azure B, permite avaliar de maneira rápida os efeitos dos pré-tratamentos na exposição da lignina, e consequentemente estimar a quantidade de lignina acessíveis as enzimas nos processos de hidrólise.

**Figura 14.** Área de superfície específica da lignina (ASEL) para todas as frações, *in natura* e pré-tratada com ácido diluído (5, 10 e 20 %, m/m, 121°C/30 min) e deslignificação com clorito de sódio 30 % m/m, 70°C/1 h.



Em seu ensaio, foram obtidos resultados referentes a área superficial total (ASL) da lignina, e a área superficial específica da lignina (ASEL), esta última é calculada a partir da área total dividida pela proporção de lignina no material, obtendo, primeiramente em termos de área total da lignina cerca de 84 m<sup>2</sup>/g para a palha de trigo, 54 m<sup>2</sup>/g para o bagaço de cana-de-açúcar e 48 m<sup>2</sup>/g para casca de aveia. Em termos de área específica: 354 m<sup>2</sup>/g, 225 m<sup>2</sup>/g e 215 m<sup>2</sup>/g de lignina respectivamente para os mesmos materiais (SIPPONEN et al., 2014b). Neste trabalho foram obtidas diferentes áreas superficiais totais e específicas para cada uma das frações (externa, nó, entrenó e folha). No entanto, a média das áreas superficiais totais (m<sup>2</sup>/g de material) foi de 28,7 m<sup>2</sup>/g para as frações *in natura*; 45,3 m<sup>2</sup>/g para as frações pré-tratadas com ácido diluído e 29,1 m<sup>2</sup>/g para as amostras pré-tratadas com ácido diluído e deslignificadas. Em todos os casos a média das áreas obtidas é mais baixa do que a descrita na literatura, porém para a folha, a área superficial total chega muito próximo, em torno de 42 m<sup>2</sup>/g para o material *in natura* e 55 m<sup>2</sup>/g para o pré-tratado com ácido a 5 %.

Observa-se para as amostras *in natura*, que estas têm tendência a apresentar menores áreas superficiais em relação a primeira condição de pré-tratamento. O pré-tratamento ácido tem como característica a modificação da estrutura da lignina presente no material, levando a sua solubilização durante o processo e a sua deposição sobre as fibras de celulose (SUN et al., 2014) Esta característica do pré-tratamento com ácido diluído pode estar relacionada com o aumento na superfície apresentada neste trabalho.

No geral, os resultados obtidos neste trabalho variam de acordo com a fração da biomassa analisada e o tipo de pré-tratamento empregado. Os materiais pré-tratados com ácido diluído apresentaram em média (124 m<sup>2</sup>/g de lignina) áreas superficiais específicas (ASEL) menores do que as áreas apresentadas pelos materiais pré-tratados com ácido diluído e em seguida clorito de sódio (186,5 m<sup>2</sup>/g de lignina), indicando um possível efeito do clorito de sódio na superfície das moléculas de lignina.

Em termos de área ocupada pela lignina no material (ASL) observa-se que a diminuição desta área conforme a concentração de ácido empregada aumenta para todas as frações, sendo que a fração com a menor área de superfície total foi a fração externa, onde observou-se apenas 5 m<sup>2</sup>/g de área para o pré-tratamento ácido a 20 % e em seguida a aplicação de clorito de sódio, indicando mais de 95 % de remoção de lignina em comparação com o material *in natura* (Figuras 13 e 14). Em contrapartida, a folha demonstrou-se a fração com a maior área superficial de lignina em todos os casos, obtendo em média 54 m<sup>2</sup>/g de superfície para o pré-tratamento ácido apenas, e 37 m<sup>2</sup>/g para as amostras pré-tratadas também com clorito de sódio, confirmando seu maior teor de lignina evidenciado pelos resultados de caracterização química (Tabela 2).

Como o corante catiônico Azure B possui alta afinidade com grupos hidroxila (SIPPONEN et al., 2014), presentes, em termos de biomassa lignocelulósica, apenas nas moléculas de lignina (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2009) Pode-se dizer que a área superficial total de lignina serve, neste caso, como medida para comprovar a eficácia da remoção de lignina em processo de deslignificação, após a aplicação de um pré-tratamento com caráter ácido. Deste modo, a adsorção de Azure B, determinando a superfície total ou específica de lignina, poderia ser usado como um importante parâmetro para identificar materiais com diferentes quantidades de lignina.

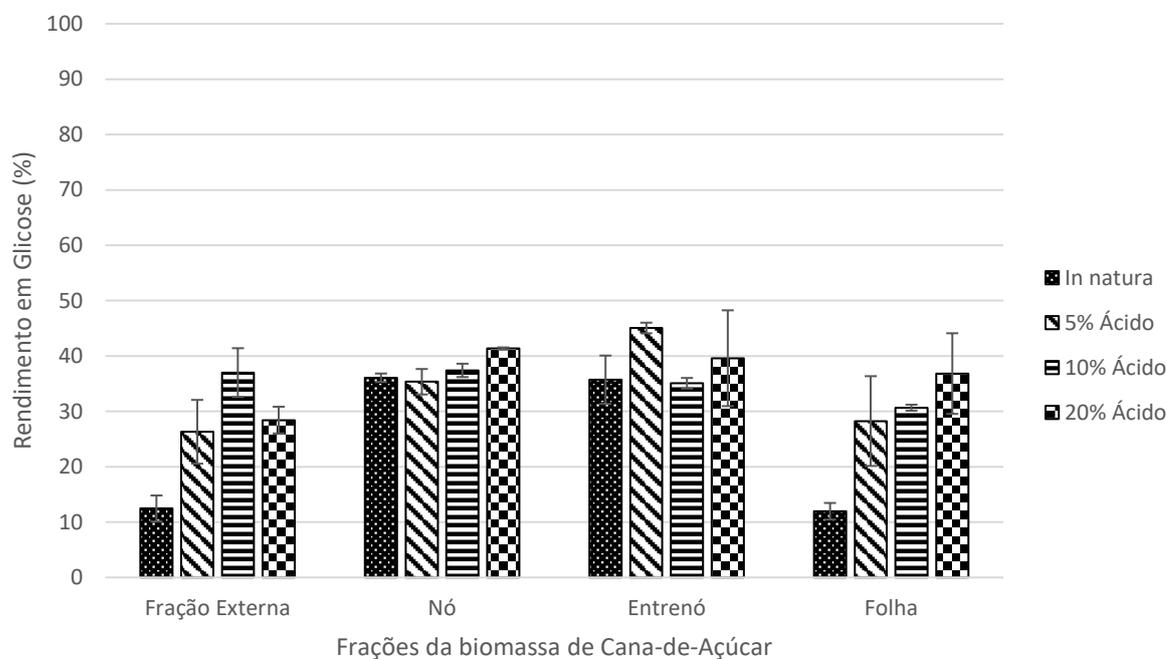
## 8.5 Hidrólise enzimática das biomassas de cana-de-açúcar

As amostras *in natura* e pré-tratadas de fração externa, nó, entrenó e folha foram submetidas a hidrólise enzimática para avaliar o efeito do pré-tratamento e da área superficial da lignina. A hidrólise enzimática foi conduzida por 24 h de reação para comparar o rendimento em glicose das biomassas da cana-de-açúcar. Este período de reação normalmente equivale a fase em que o rendimento de hidrólise está próximo da fase de recalcitrância, onde o incremento no rendimento começa a diminuir, assim o rendimento tende a estabilizar mesmo para longos tempos de reação (WALLACE et al., 2016).

A Figura 15 apresenta os resultados de hidrólise enzimática obtidos após a realização do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído nas concentrações de 5, 10 e 20 % (m/m) e também o rendimento apresentado pelas amostras *in natura*. A folha e a fração externa apresentaram o menor rendimento de hidrólise enzimática entre as amostras *in natura*, nas condições aplicadas para este ensaio, resultando em cerca de 12 % de conversão de celulose em glicose. Entre os materiais *in natura*, o entrenó é a fração que apresentou maior rendimento de hidrólise enzimática. Por outro lado, a fração externa e folha, foram as frações que resultaram em menor rendimento em glicose na hidrólise enzimática. Esta diferença de rendimento, o que é uma característica da recalcitrância de cada fração, está de acordo com a literatura (BRIENZO et al., 2014). Comparando com rendimentos de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar que normalmente resulta em torno de 10 % a 20 % (HASHMI et al., 2017; SANTOS et al., 2018), as frações de folha e externa ficaram abaixo, e entrenó e nó acima, evidenciando menor recalcitrância.

Considerando o rendimento em glicose, o entrenó se apresentou como a fração com maior taxa de conversão, resultado em valores próximos a 45 % quando pré-tratado com ácido diluído a 5 % enquanto que a amostra da fração externa pré-tratada a 5 % de ácido apresenta, considerando apenas as médias, a menor taxa de conversão em glicose, inferior a 27 %.

**Figura 15.** Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU/g de substrato) das frações externa, nó, entrenó e folha pré-tratadas com ácido (5, 10 e 20 %, m/m, a 121°C/30 min).



Os resultados obtidos para o nó sugerem uma possível correlação entre a concentração de ácido utilizada na etapa de pré-tratamento e o rendimento em hidrólise para as condições aqui aplicadas, resultando em taxas de conversão crescentes de 35 % para 5 % de ácido, 37 % para 10 % de ácido e 41 % para 20 % de ácido empregado. Embora a fração da folha presente, em termos de valores médios, um aumento gradual na conversão de hidrólise assim como o nó, os desvios experimentais apontam que os resultados obtidos para as concentrações de 5 %, 10 % e 20 % possam ser semelhantes.

As amostras pré-tratadas com ácido diluído e submetidas a deslignificação branda com clorito de sódio também foram submetidas a hidrólise enzimática. Os resultados de rendimento em glicose estão dispostos na Figura 16.

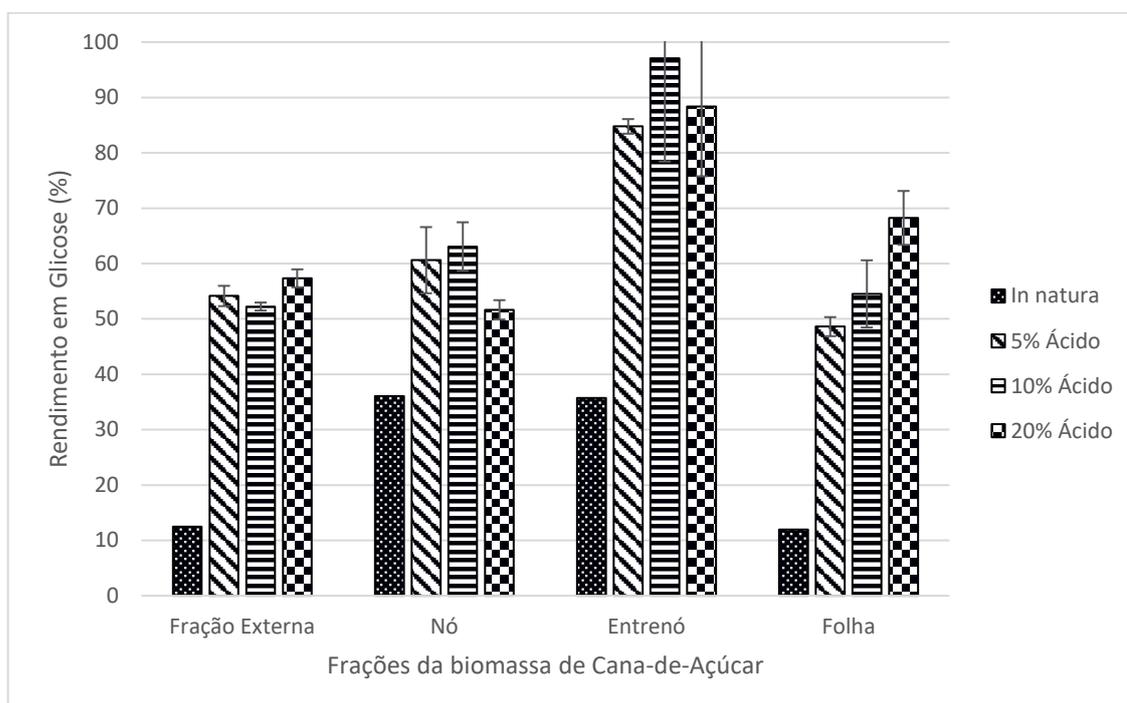
É perceptível a diferença em termos de conversão de glicose apresentadas após a aplicação do clorito de sódio em comparação com as amostras pré-tratadas apenas com ácido diluído, observando que, neste caso, todas as frações apresentaram rendimento em glicose acima de 43 % (Figura 16). O entrenó

novamente se apresentou como a fração com maior rendimento de conversão em glicose, resultando em valores próximos de 100 % de rendimento, como no caso do pré-tratamento com 10 % de ácido. A folha em contrapartida, representa a amostra com o menor rendimento entre as frações, resultando em cerca de 43 % de rendimento em glicose para a amostra pré-tratada com ácido diluído a 10 %.

A fração externa apresentou em média um rendimento em torno de 53 %, considerando-se uma média do rendimento em glicose dos materiais pré-tratados com 5, 10 e 20 % de ácido. Considerando também uma média dos resultados para o nó, o rendimento em glicose foi em torno de 58 % (Figura 16). Estes resultados demonstram que o aumento na concentração de ácido não foi suficiente para diminuir a recalcitrância destas frações aumentar o rendimento em glicose (Figura 15). Entretanto, a subsequente deslignificação branda mostra que a remoção parcial de lignina (Tabela 2) resulta em aumento no rendimento em glicose (Figura 16).

A recalcitrância do material lignocelulósico é uma das barreiras a serem vencidas quando deseja-se aplicar o processo de hidrólise enzimática em escala industrial (BRIENZO et al., 2015; GILNA et al., 2017). Algumas das propriedades do material lignocelulósico que confere resistência aos agentes do pré-tratamento e ação de enzimas são o tipo de ligação entre os carboidratos da celulose, a ligação  $\beta$ -1,4, que favorece a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas, aumentando a cristalinidade das microfibrilas (WALLACE et al., 2016). Além disso, a hemicelulose e a lignina atuam como barreiras físicas, impedindo o acesso à celulose. A lignina em particular é responsável por se ligar covalentemente aos carboidratos formando os complexos lignina-carboidrato (LCC), dificultando ainda mais o acesso à celulose (WALLACE et al., 2016). O emprego de pré-tratamentos como o ácido diluído e a deslignificação com clorito de sódio, são utilizados justamente para remover estes dois componentes, aumentando o acesso à celulose, e conseqüentemente, a sua conversão em glicose. De fato, o rendimento em glicose na hidrólise enzimática melhorou com o pré-tratamento (Figura 15) e com a deslignificação branda com clorito de sódio (Figura 16).

**Figura 16.** Rendimento em glicose na hidrólise enzimática (15 FPU/g de substrato) das frações externa, nó, entrenó e folha pré-tratadas com ácido (5, 10 e 20 %, m/m, a 121°C/30 min) e subsequente deslignificação branda com clorito de sódio (30 % a 70°C/1 h).



A fração externa é identificada na literatura como a fração mais recalcitrante da biomassa da cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2014). Esta fração foi reportada com o menor rendimento em glicose por hidrólise enzimática, com resultados inferiores a 10 % em 24 horas de reação para amostras in natura, e cerca de 17% de conversão para materiais pré-tratados com ácido diluído a 20% (BRIENZO et al., 2014). Em contrapartida, o entrenó e o nó foram as frações que resultaram maior rendimento em glicose (Figuras 19 e 20). Estes resultados corroboram dados reportado na literatura, que apresentou rendimentos em glicose de cerca de 25 % e 20 %, respectivamente para os materiais in natura do entrenó e nó, e cerca de 75 % e 60 % para as amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído a 20 % (BRIENZO et al., 2016). O presente trabalho obteve rendimentos superiores aos apresentados pela literatura para os

materiais *in natura*. Porém, esta diferença pode ter ocorrido devido a origem e tipo de biomassa utilizada, processamento da biomassa como remoção de extrativos antes previamente ao pré-tratamento, e coquetel enzimático empregado na hidrólise enzimática.

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que, de fato, a fração externa é a mais recalcitrante em comparação com nó e entrenó, obtendo rendimentos em glicose de cerca de 66 % menor para o material *in natura* (Figura 16). Porém, após a aplicação do pré-tratamento ácido, observou-se pouca diferença entre os rendimentos em glicose da fração externa e nó, de modo que o entrenó se apresentou como fração menos recalcitrante.

Correlacionando a área superficial total da lignina (ASL) e os resultados de hidrólise enzimática pode-se concluir que a superfície total e específica da lignina não está diretamente relacionada com o rendimento em glicose do material para os materiais *in natura*, mas observa-se uma relação direta entre a área superficial específica (ASEL) da lignina e os resultados de hidrólise enzimática para as amostras de fração externa e folha pré-tratadas com ácido 5 % e deslignificação com clorito de sódio. O decréscimo na área superficial total também aparenta estar relacionado com o aumento no rendimento em glicose, já que as amostras deslignificadas, apresentam as maiores taxas de conversão e áreas superficiais reduzidas em comparação com as amostras pré-tratadas apenas com ácido diluído.

A área superficial específica apresenta uma relação inversa ao rendimento de hidrólise para as frações externa, nó e entrenó deslignificadas (Figuras 14 e 16). A folha apresenta uma diminuição na área superficial específica porém um aumento no rendimento de hidrólise (Figuras 14 e 16).

A aplicação de clorito de sódio é utilizada como ferramenta para remoção seletiva de lignina, que em condições levemente ácidas (via adição de ácido acético) produz ânions dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2^-$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), os quais são responsáveis pela quebra da macromolécula de lignina em fragmentos menores, favorecendo sua solubilização (YUE et al., 2015). De fato, a deslignificação diminuiu o teor de lignina nos materiais (Tabela 2). Durante este processo o grau de polimerização da celulose pode diminuir, facilitando ainda mais a ação das enzimas (YUE, et al., 2015). A remoção da lignina a baixas temperaturas evita a desestruturação das fibras e resulta em um material altamente digestível (ZENG et al., 2014). Confirmando esta hipótese,

os rendimentos em glicose na hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar foram significativamente aumentados com a deslignificação branda (Figura 16).

A fração de menor recalcitrância, o entrenó, teve seu rendimento em glicose aumentando em até 50 %, em comparação com o resultado observado com a amostra pré-tratada apenas com ácido diluído (Figuras 15 e 16). Para as frações de maior recalcitrância, externa e nó, a deslignificação branda aumentou o rendimento em glicose em aproximadamente 33 %. Para a folha, a deslignificação provocou um aumento de cerca de 40 % no rendimento em glicose.

## 9. CONCLUSÃO

O pré-tratamento ácido nas concentrações utilizadas (5, 10 e 20 % m/m) foi eficiente em remover seletivamente a lignina, aumentando consequentemente o teor de glicose e lignina das amostras, para todas as frações em estudo, em especial as menos recalcitrantes, o nó e o entrenó. A folha foi a fração cujo teor de lignina se apresentou o maior em todos os casos, porém não a mais recalcitrante, conforme evidenciado pelos resultados de hidrólise enzimática. A conversão de celulose a glicose foi menor na fração externa, que apesar de não ter o maior teor de lignina, apresentou o menor conteúdo de glicose entre todas as frações estudadas.

A área superficial total e específica da lignina é modificada pela ação dos pré-tratamentos ácido e a subsequente deslignificação com clorito de sódio. A concentração de ácido utilizado no pré-tratamento tem efeito negativo sobre a superfície total da lignina para todas as frações, a subsequente deslignificação amplifica a redução da área total, enquanto que área específica aumenta para as frações externa, nó e entrenó, conforme a concentração de ácido. A redução na área superficial ocupada pela lignina aparenta ter efeito positivo sobre o rendimento de hidrólise enzimática, aumentando a quantidade de glicose obtida após 24 h de reação para todas as frações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL R, GAUR R, MATHUR A, KUMAR A, GUPTA RP, TULI DK, SATLEWAL A. Improved saccharification of pilot-scale acid pretreated wheat straw by exploiting the synergistic behavior of lignocellulose degrading enzymes. **RSC Advances**, 5, pp. 71462-71471, 2015.

ALLEN, S. E. Chemical Analysis of Ecological Materials. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, England. 2nd ed. 1989.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, 101(13), pp. 4851-4861. 2010.

ALVIRA, P., NEGRO, M. J., BALLESTEROS, I., GONZÁLEZ, A., BALLESTEROS, M. Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. **Bioethanol**. 2(1). 2016.

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

BEZERRA, T. L. RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 10(5), 634-647. 2016.

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

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

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

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

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

BRUCE, R. J. WEST, C. A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. **Plant Physiology**, 91, 889–897. 1989.

CAI, J., HE, Y., YU, X., BANKS, S. W., YANG, Y., ZHANG, X., BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 76, 309-322. 2017.

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

CARROLL, A., SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. **Annual review of plant biology**, 60, 165-182, 2009.

CHEALI, P. POSADA, J. A. GERNAEY, K.V. SIN, G. Upgrading of lignocellulosic biorefinery to value-added chemicals: Sustainability and economics of bioethanol-derivatives. **Biomass and Energy**. 75, 282-300. 2015.

CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In **Biotechnology of Lignocellulose**. Springer Netherlands. 1, 25-71. 2014.

CHUNG, Y. L. OLSSON, J. V. LI, R. J. FRANK, C. W. WAYMOUTH, R. M. BILLINGTON, S. L. SATTELY, E. S. A renewable lignin–lactide copolymer and application in biobased composites. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 1, 1231-1238. 2013.

COLARES, C. J. G., PASTORE, T. C. M., CORADIN, V. T. R., CAMARGOS, J. A. A., MOREIRA, A. C. O., RUBIM, J. C., BRAGA, J. W. B. Exploratory Analysis of the Distribution of Lignin and Cellulose in Woods by Raman Imaging and Chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26(6), 1297-1305. 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_08\\_24\\_08\\_59\\_54\\_bolbole\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_17-18.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_24_08_59_54_bolbole_cana_portugues_-_2o_lev_-_17-18.pdf). Acessado em: 27/01/2018. Agosto de 2017.

DRABIK, D., GORTER, H., JUST, D. R., TIMILSINA, G. R. The Economics of Brazil's Ethanol-Sugar Markets, Mandates, and Tax Exemptions. **American Journal of Agricultural Economics**, 97. 1433-1450. 2015.

DUTTA, S., WU, K. C. W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, 16(11), 4615-4626. 2014.

ESHKIKI, R. B., MORTHA, G., LACHENAL, D. A new method for the titration of free phenolic groups in pulps. **Holzforschung**, 61(3), 242-246, 2007.

ESTEGHLALIAN, A. R., SVIVASTAVA, V., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic

feedstocks. In: Himmel, M.E., Baker, W., Saddler, J.N. (Eds.), **Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion**. ACS, 100–111. 2001.

EUDES, A. GEORGE, A. MUKERJEE, P. KIM, J. S. POLLET, B. BENKE, P. I. YANG, F. MITRA, P. SUN, L. ÇETINKOL, Ö. P. CHABOUT, S. Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. **Plant biotechnology journal**, 10, 609-620. 2012.

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

FANG, R. XIANSU, C. XIAORONG, X. Synthesis of lignin-base cationic flocculant and its application in removing anionic azo-dyes from simulated wastewater. **Bioresource technology** 101, 7323-7329. 2010.

FERNANDES, E., ALVES, R. C., PAGNOCCA, F. C., CONTIERO, J., BRIENZO, M., Sugar and ethanol production process from sugarcane. In: MURPHY R. Sugarcane: production systems, uses and economic importance. **Nova lorque: Nova Publishers**, 1, 193-216. 2017.

FOLEY, W. J., MCILWEE, A., LAWLER, I., ARAGONES, L., WOOLNOUGH, A. P., BERDING, N. Ecological applications of near infra-red reflectance spectroscopy—a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant animal tissues and aspects of animal performance. **Oecology**. 116, 293–308. 1998.

GHAFFAR, S. H., FAN, M. Lignin in straw and its applications as an adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. 48. 92-101. 2014.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, 59(2), 257-268. 1987.

GILNA, P., LYND, L.R., MOHNEN, D., DAVIS, M.F., DAVISON, B.H. Progress in understanding and overcoming biomass recalcitrance: a BioEnergy Science Center (BESC) perspective. **Biotechnology for Biofuels**, 10(1), 285. 2017.

HANSEN, M.A.T., JØRGENSEN, H., LAURSEN, K.H., SCHJØRRING, J.K., FELBY, C. Structural and chemical analysis of process residue from bio-chemical conversion of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) to ethanol. **Biomass and bioenergy**, 56, 572-581. 2013.

HASHMI, M., SUN, Q., TAO, J., WELLS JR, T., SHAH, A.A., LABBE, N., RAGAUSKAS, A.J. Comparison of autohydrolysis and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, 224, 714-720. 2017.

HATAKEYAMA, H; HATAKEYAMA, T. Lignin structure, properties, and applications. In: Biopolymers. **Springer Berlin Heidelberg**. 1, 1-63. 2009.

HEITNER, C. DIMMEL, D. SCHMIDT, J. Lignin and Lignans: advances in chemistry. **CRC Press**. 1, 11. 2016.

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**, 315(5813), 804-807, 2007.

HOLLADAY, J. E., WHITE, J. F., BOZELL, J. J., JOHNSON, D. Top Value-Added Chemicals from Biomass-Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. **Pacific Northwest National Laboratory (PNNL)**, Richland, WA (US), 2007.

HSU, T. C., GUO, G. L., CHEN, W. H., HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, 101(13), 4907-4913. 2010.

HU, F., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, 117, 7-12. 2012.

HUBBELL, C.A., RAGAUSKAS, A.J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, 101(19), 7410-7415. 2010.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, **Key World Energy Statistics** 2015.

Disponível em:

<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WorldEnergyBalances2017Overview.pdf>, 2017.

ISIKGOR, F.H., BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**. 1, 4497-4559. 2015.

JIN, W., CHEN, L., HU, M., SUN, D., LI, A., LI, Y., HU, Z., ZHOU, S., TU, Y., XIA, T. WANG, Y. Tween-80 is effective for enhancing steam-exploded biomass enzymatic saccharification and ethanol production by specifically lessening cellulase absorption with lignin in common reed. **Applied Energy**.175, 82-90. 2016.

JÖNSSON, L.J., MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, 199, 103-112. 2016.

JÚNIOR, R; AGUDO, R. Análise da viabilidade do aproveitamento da palha da cana de açúcar para cogeração de energia numa usina sucroalcooleira. **UNESP-Dissertação de Mestrado**. 2009.

JUNIOR, C.S., MILAGRES, A.M.F., FERRAZ, A., CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**. 20(6), 3165-3177. 2013.

JUNG, S. K. KIM, S. H. CHUNG, I. M. Comparison of lignin, cellulose and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. **Biomass and Bioenergy**. 83. 322-327. 2015.

- KAFLE, K., LEE, C.M., SHIN, H., ZOPPE, J., JOHNSON, D.K., KIM, S.H., PARK, S. Effects of delignification on crystalline cellulose in lignocellulose biomass characterized by vibrational sum frequency generation spectroscopy and X-ray diffraction. **BioEnergy Research**, 8(4), 1750-1758. 2015.
- KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I. G., KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied microbiology and biotechnology**. 98(20), 8469-8480. 2014.
- KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, 48, 8, 3713-3729, 2009.
- KUMAR, R., HU, F., SANNIGRAHI, P., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. J., WYMAN, C. E. Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion. **Biotechnology and bioengineering**, 110(3), 737-753. 2013.
- KUMAR, A. K., SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and bioprocessing**, 4(1), 7. 2017.
- LABEEUW, L., MARTONE, P. T., BOUCHER, Y., CASE, R. J. Ancient origin of the biosynthesis of lignin precursors. **Biology Direct**, 10(1), 1. 2015.
- LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL JR, M. J., LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, 81(1) 33-44, 2002.
- LI, J., GELLERSTEDT, G., TOVEN, K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. **Bioresource technology**, 100(9), 2556-2561, 2009.
- LI, H., PU, Y., KUMAR, R., RAGAUSKAS, A.J., WYMAN, C.E. Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms. **Biotechnology and bioengineering**, 111(3), pp.485-492. 2014.
- LOH, Y. R., SUJAN, D., RAHMAN, M. E., DAS, C. A. Sugarcane bagasse—The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, 75, 14-22, 2013.
- MACHINET, G.E. BERTRAND, I. BARRIÈRE, Y. CHABBERT, B. RECOUS, S. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. **Soil biology and biochemistry**, 43(7), 1544-1552. 2011.
- MARABEZI, K. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**. 2009.

MENG, X., RAGAUSKAS, A. J. Pseudo-lignin formation during dilute acid pretreatment for cellulosic ethanol. **Recent Advances in Petrochemical Science**. 1(1). 2017.

MENG, X., RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**. 27, 150-158. 2014.

MESA, L., MARTÍNEZ, Y., BARRIO, E., GONZÁLEZ, E. Desirability function for optimization of Dilute Acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. **Applied Energy**, 198, 299-311. 2017.

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

MONTIES, B. Lignins. pp. 113–157, in P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press, New York. 1989.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 27, 77-93. 2013.

MOODLEY, P., KANA, E.G. Optimization of xylose and glucose production from sugarcane leaves (*Saccharum officinarum*) using hybrid pretreatment techniques and assessment for hydrogen generation at semi-pilot scale. **International journal of hydrogen energy**, 40(10), 3859-3867. 2015.

MORRISON, I. M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in prediction the digestibility of forage crops. **J. Science and Food Agriculture**. 23, 455–463. 1972.

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**. 96, 673–686. 2005.

NAKAGAME, S., CHANDRA, R. P, SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 105, 871–9. 2010.

NORGREN, M., EDLUND, H. Lignin: recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 19(5), 409-416. 2014.

OKAMURA-ABE, Y. Beta-ketoadipic acid and muconolactone production from a lignin-related aromatic compound through the protocatechuate 3, 4-metabolic pathway. **Journal of bioscience and bioengineering**, 121(6), 652-658, 2016.

OLIVEIRA, R. A., ROSSELL, C. E. V., MACIEL FILHO, R. Using Hemicellulosic Liquor from Sugarcane Bagasse to Produce Second Generation Lactic Acid. **World**

**Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, 4(6). 2017.

PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals 1*, 1069-1079. **Humana Press**. 2005.

PARK, J. W., TAKAHATA, Y., KAJIUCHI, T., AKEHATA, T. Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. **Biotechnol Bioeng**. 39, 117–20. 1992.

PEARL, I.W. *The Chemistry of Lignin*. **Marcel Dekker**, Inc.: New York. 339, 1967.

PITARELO A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Master thesis. **Federal University of Paraná**. 2007.

RAGAUSKAS, A., BECKHAM, G., BIDDY, M. J., CHANDRA, R., CHEN, F., DAVIS, M. F., DAVISON, B. H., DIXON, R. A., GILNA, P., KELLER, M., LANGAN, P., NASKAR, A. N., SADDLER, J. N., TSCHAPLINSKI, T. J., TUSKAN, G. A., WYMAN, C. E. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. **Science**. 344. 1246843. 2014.

RAJAN, K., CARRIER, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, 62, 222-227. 2014.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. W. H. Freeman, 2005.

REZENDE, C. A. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, 4(1), 1, 2011.

ROCHA, G. D. M., GONÇALVES, A. R., OLIVEIRA, B. R., OLIVARES, E. G., ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 35(1), 274-279, 2012a.

ROCHA, G. J. M., MARTIN, C., SILVA, V. F. N., GOMEZ, E. O., GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**. 111, 447–452. 2012b

ROCHA, G. J. M., NASCIMENTO, V. M., GONÇALVES, 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**. 64, 52-58. 2015a

ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., NAKANISHI, S. C., NASCIMENTO, V. M., SILVA, V. F. N. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, 74, 810-816. 2015b.

SAHA, B. C., ITEN, L. B., COTTA, M. A., WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**. 40(12), 3693-3700. 2005.

SANNIGRAHI, P., KIM, D. S. H., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy & Environmental Science** 4, 1306–1310. 2011.

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

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

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

SCHWEINEBARTH, H., BAKER, D., TOMANI, P. Lignin–Evaluation of Properties for Applications. **NWBC 2015**, 387. 2015.

SHEKIROL, J., MUHN, E. M., NAGLE, N. J., TUCKER, M., ELANDER, R. T., SCHELL, D.J. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, 7-23, 2014.

SEIDL, P. R., GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2, 48-53. 2016.

SILVA, A. S. A., TEIXEIRA, R. S. S., DE OLIVEIRA MOUTTA, R., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE BARROS, R. D. R. O., FERRARA, M. A., DA SILVA BON, E. P. Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**. 1, 47-88. 2003.

SIMMONS, B. A., LOQUE, D., RALPH, J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. **Current opinion in plant biology**, 13(3), 312-319. 2010.

SINGH, J., SUHAG, M., DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate Polymers**. 117, 624-631. 2015.

SIPPONEN, M. H., PIHLAJANIEMI, V., PASTINEN, O., LAAKSO, S. Reduction of surface area of lignin improves enzymatic hydrolysis of cellulose from hydrothermally pretreated wheat straw. **Rsc Advances**, 4(69), 36591-36596. 2014a.

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

SIPPONEN, M. H., RAHIKAINEN, J., LESKINEN, T., ÖSTERBERG, M. Structural changes of lignin in biorefinery pretreatments and consequences to enzyme-lignin interactions. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**. 32(04), 550-571. 2017.

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**, 4(1), 7. 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**, 102, 399-402. 2013.

SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry: Fundamentals and Application. **Academic Press: Orlando**. 293, 1993.

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

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

SUN, Q., FOSTON, M., MENG, X., SAWADA, D., PINGALI, S.V., O'NEILL, H.M., LI, H., WYMAN, C.E., LANGAN, P., RAGAUSKAS, A.J. AND KUMAR, R. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment. **Biotechnology for biofuels**, 7(1), 150. 2014.

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

USMANI, M.A., KHAN, I., HAQUE, A., BHAT, A.H., MONDAL, B., GAZAL, U. Biomass-based composites from different sources: Properties, characterization, and transforming biomass with ionic liquids. In book: Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials, Edition: 1, Chapter: 4. **Elsevier**. 45-94. 2017.

VANHOLME, R., DEMEDTS, B., MORREEL, K., RALPH, J., BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, 153(3), 895-905, 2010.

VANHOLME, R., MORREEL, K., DARRAH, C., OYARCE, P., GRABBER, J. H., RALPH, J., & BOERJAN, W. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. **New Phytologist**, 196(4), 978-1000, 2012.

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

THAKUR, V. K., THAKUR, M. K., RAGHAVAN, P., KESSLER, M. R. Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: a review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2(5), 1072-1092. 2014.

THAKUR, V. K., THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 72, 834-847. 2015.

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In: Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. **Humana Press**. 1115-1126 2004.

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

WAGNER, A., TOBIMATSU, Y., PHILIPS, L., FLINT, H., GEDDES, B., LU, F., RALPH, J. Syringyl lignin production in conifers: Proof of concept in a Pine tracheary element system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 112(19). 6218-6223. 2015.

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

WYMAN, C. Handbook on bioethanol: production and utilization. **CRC press**, 1996.

YUE, Y., HAN, J., HAN, G., AITA, G. M., WU, Q. Cellulose fibers isolated from energycane bagasse using alkaline and sodium chlorite treatments: Structural, chemical and thermal properties. **Industrial Crops and Products**, 76, 355-363. 2015.

ZENG, Y., ZHAO, S., YANG, S., DING, S.Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current opinion in biotechnology**, 27, 38-45. 2014.

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