

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-
AÇÚCAR POR TÉCNICAS AVANÇADAS DE IMAGEM**

Autor: Carlos Martins Viana

Orientadora: Prof^ª. Augusta Cerceau Isaac Neta

Coorientador: Luciano Andrey Montoro

Agosto/2017

Carlos Martins Viana

ESTUDO DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-
AÇÚCAR POR TÉCNICAS AVANÇADAS DE IMAGEM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof^ª. Augusta Cerceau Isaac Neta

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
2017

Viana, Carlos Martins.

V614e

Estudo da recalcitrância da biomassa derivada de cana-de-açúcar por técnicas avançadas de imagem [manuscrito] / Carlos Martins Viana. - 2017.

71 f., enc.: il.

Orientadora: Augusta Cerceau Isaac Neta.

Coorientador: Luciano Andrey Montoro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 64-71.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Biomassa - Teses. 4. Bagaço de cana - Teses. I. Isaac Neta, Augusta Cerceau. II. Montoro, Luciano Andrey. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 620(043)

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Maria e Geraldo, aos meus irmãos Lívia e Geraldo, por sempre me apoiarem e torceram por mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado sabedoria para que eu pudesse continuar nesta caminhada.

A toda minha família, meus pais Maria e Geraldo e meus irmãos Lívia e Geraldo, pelo apoio de sempre, pois sem eles não estaria concluindo mais essa etapa.

A minha orientadora Prof. Augusta Cerceau Isaac Neta, pela oportunidade, pelos conselhos e por sempre me incentivar.

Ao Prof. Luciano Andrey Montoro que sempre me ajudou com as análises de dados e por sempre disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos.

Ao Prof. Gregory Kitten pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar com as caracterizações.

Ao pessoal dos laboratórios da Engenharia Metalúrgica e de Minas que sem eles não conseguiria concluir o meu trabalho.

A todas as pessoas do Centro de Microscopia da UFMG que sempre tiveram dispostos a me ajudar.

As todos os meus amigos, em especial a Amanda, Paula, Fernanda e Lívia que sempre estiveram comigo em todas as situações me dando apoio e me incentivando.

A minha amiga da vida Tati que sempre esteve comigo e que tenho muita consideração e admiração.

Aos amigos que fiz na UFMG, Claudilene, Dani, Bárbara, Dâmia, Rodolfo, Nathália, Alexandre, Paula, que sempre me apoiaram e sou muito grato.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Cana-de-açúcar.....	4
3.2. Materiais lignocelulósicos.....	5
3.2.1. Celulose.....	8
3.2.2. Hemicelulose.....	9
3.2.3. Lignina.....	11
3.3. Processos de conversão em etanol a partir de biomassa.....	13
3.4. Pré-tratamentos.....	16
3.4.1. Pré-tratamentos químicos assistidos por micro-ondas.....	19
3.4.1.1. Pré-tratamentos com ácido diluído.....	20
3.4.1.2. Pré-tratamentos alcalino.....	21
3.5. Hidrólise Enzimática.....	21
3.6. Técnicas de Caracterização.....	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Substrato.....	23
4.1.1. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar.....	23
4.1.2. Pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio assistidos por micro-ondas do bagaço de cana-de-açúcar.....	24
4.2. Reagentes, equipamentos e materiais utilizados.....	26
4.3. Caracterização morfológica, estrutural e química.....	27
4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
4.3.1.1. Preparação de amostras.....	28
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	29
4.3.2.1. Preparação de amostras.....	31
4.3.3. Microscopia de Força Atômica.....	31
4.3.4. Difração de raios X (DRX).....	33
4.3.5. Tomografia de raios X por contraste de fases.....	35

4.3.6. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Caracterização	38
5.1.1. Visualização dos tecidos da biomassa derivada de cana-de-açúcar	38
5.1.2. Informação quantitativa sobre a arquitetura de tecido pré-tratada.	40
5.1.3. Mudanças na área de superfície específica pelo pré-tratamento alcalino.....	44
5.2. Caracterização	47
5.2.1. Mudanças químicas no bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos.....	47
5.2.2. Mudanças estruturais do bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos	49
5.2.3. Características ultra- estruturais e química das paredes celulares.....	50
5.2.4. Características tridimensionais das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar.....	52
5.2.4.1. Mapeando a distribuição de lignina por imagem de contraste de absorção	53
5.2.5. Ultraestrutura macromolecular das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar.....	54
5.2.6. Desconstrução da parede celular de bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos	56
5.2.7. Ultraestrutura macromolecular de paredes celulares.....	58
6. CONCLUSÕES.....	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia da cana-de-açúcar (Philippini, 2012).....	4
Figura 2: Ilustração esquemática dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular) (Santos, 2012).....	6
Figura 3: Estrutura de uma molécula de celulose (Fengel e Wegener, 1989).....	8
Figura 4: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo (A). As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (B) (Rabelo, 2010).....	8
Figura 5: Açúcares componentes das hemicelulose (Miranda, 2013).....	10
Figura 6: Representação teórica da estrutura da xilana vegetal. Adaptado (Philippini, 2012).....	11
Figura 7: Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico (1), coniferílico (2) e sinapílico (3) (Medina, 2013).....	12
Figura 8: Estrutura da molécula de lignina e seus principais tipos de ligações. Grupos funcionais na estrutura a lignina: (1) grupo hidroxila fenólico; (2) ligação carbono-carbono; (3) ligação tipo éter; (4) carbonila e ligações etilênicas. (Assumpção, 2015).....	13
Figura 9: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando hidrólise enzimática (Santos et al., 2012).....	14
Figura 10: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de palha e bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a tecnologia de pré-tratamento Proesa [®] , licenciada pela Beta Renewables para a Bioflex 1 (GranBio, 2017).....	15
Figura 11: Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas celulases de materiais lignocelulósicos para realizar hidrólise. (Taherzadeh e Karimi, 2008; Odisi, 2013).....	17
Figura 12: Reação entre lignina e ácido sulfúrico na formação das pseudo-ligninas. (Assumpção, 2015).....	21
Figura 13: Fenômeno multi-escalar da recalcitrância das paredes celulares das plantas. (Paës, 2014).....	22
Figura 14: Amostra de bagaço in natura após lavagem e secagem.....	23
Figura 15: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, (A) antes do pré-tratamento e (B) após do pré-tratamento.....	24
Figura 16: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamentos com solução diluída de H ₂ SO ₄ em 130° C (a) e 160° C (b). Os pré-tratamentos foram conduzidos por 30 min e assistidos por radiação micro-ondas.....	25
Figura 17: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamentos com solução diluída de NaOH em 130° C (d) e 160° C (e). Os pré-tratamentos foram conduzidos por 30 min e assistidos por radiação micro-ondas.....	26
Figura 18: Modelo esquemático dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). (Maliska, 2013).....	28

Figura 19: Diagrama do MET no modo de operação (a) imagem e (b) difração. (Rosa, 2008).....	30
Figura 20: Difração de raios-x em uma estrutura cristalina. (Herrmann et. al, 1997)...	32
Figura 21: Difração de raios-x em uma estrutura cristalina. (Azevedo, 2010)	33
Figura 22: Imagens de tomografia por contraste de fase de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar in natura. (a) Imagem TCF de uma única fibra e (b) uma seção transversal a partir da tomografia reconstruída	39
Figura 23: Reconstrução tomográfica de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uma solução alcalina (1% NaOH por 40 minutos em 120° C).	40
Figura 24: Histogramas das classes de áreas superficiais de poros individuais das partículas de bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratadas com NaOH.....	41
Figura 25: Imagens tomográficas de uma única amostra de bagaço de cana-de-açúcar in natura. Imagens de (a) todos os poros na secção transversal da partícula e (b) poros individuais das áreas superficiais (entre 2.595 e 8.024 μm^2). Cada poro individual está associado à uma cor diferente.....	42
Figura 26: Região selecionada do volume tomográfico da fibra de bagaço pré-tratada com NaOH. Poros individuais com áreas superficiais (entre 2.595 e 8.024 μm^2) estão coloridas na imagem.	43
Figura 27: Mapas da espessura da parede celular das secções transversais das partículas de bagaço de cana-de-açúcar. Imagens de (a) secção transversal da partícula in natura e (b) secção transversal de partículas tratadas em meio alcalino. A legenda e a barra de escala estão em microns.....	44
Figura 28: Espectro FTIR do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por 30 min sob processamento de microondas. (a) pré-tratamentos com H ₂ SO ₄ a 130 ° C e 160 ° C e (b) pré-tratamentos com NaOH a 130 ° C e 160 ° C.....	48
Figura 29: Espectros DRX do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por 30 min sob micro-ondas em processamento. Perfis DRX da amostra de controle (a), amostras pré-tratadas com mw-ácido a 130 ° C e 160 ° C (b e c, respectivamente) e amostras pré-tratadas com mw-álcali a 130 ° C e 160 ° C (d e e, respectivamente).....	50
Figura 30: Imagens MET e MEV de células de esclerenquima do bagaço de cana-de-açúcar. Imagens MET da amostra de controle antes do pré-tratamento (a) e amostras pré-tratadas a 160 ° C durante 30 min em H ₂ SO ₄ a 1% (b) e 1% de NaOH (c). Imagens MEV do substrato não tratado (d) e amostras pré-tratadas a 160 ° C durante 30 min em H ₂ SO ₄ a 1% (e) e 1% de NaOH (f). CC: canto celular, ML: lamela média, PW: parede celular primária e SW: parede celular secundária.	52
Figura 31: Imagens de tomografia de raios-X de fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar in natura e após pré-tratamentos. Secções transversais e vistas longitudinais geradas a partir dos volumes reconstruídos da amostra de controle (a), amostra pré-tratada com ácido mw a 130 ° C durante 30 min (b) e amostra pré-tratada com mw-álcali a 130 ° C durante 30 min (c).....	53
Figura 32: Comparação da ultraestrutura macromolecular das paredes celulares da cana-de-açúcar não tratada e pré-tratada. Imagens de amplitude e fase AFM das cana-de-açúcar	

pré-tratadas: in natura (a e b), ácido (c e d) e alcalino (e e f) à temperatura de 160 ° C durante 30 minutos..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.....	7
Tabela 2: Vantagens e desvantagens de alguns métodos de pré-tratamento. Adaptado (Wyman, 2005)	18
Tabela 3: Valores das áreas superficiais específicas externa, interna e total das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidos a partir dos volumes de tomografia.....	45

RESUMO

A busca por obtenção de novas fontes renováveis vem motivando pesquisas com intuito de suprir a escassez dos combustíveis fósseis, e o uso de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, vem ganhando destaque pois, a partir dele é possível obter o etanol de segunda geração. Estes materiais são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose presente no material está encapsulada por ligações complexas entre a hemicelulose e lignina que dificultam o acesso das enzimas às microfibrilas de celulose. Uma das barreiras que torna inviável a utilização deste material para produção de etanol segunda geração é a sua recalcitrância, que está ligada com a resistência que o vegetal possui contra os ataques de microrganismos provenientes de açúcares no interior das paredes celulares. Este trabalho visa o estudo da recalcitrância da biomassa derivada de cana-de-açúcar por técnicas avançadas de imagem. Foram caracterizados o bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e submetido à pré-tratamento ácido (solução diluída de H₂SO₄ 1%) e pré-tratamento alcalino (solução diluída de NaOH 1%), assistidos por micro-ondas, a temperaturas de 130°C e 160°C, durante 30 minutos. As amostras de biomassa foram analisadas pelas técnicas de caracterização como, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que forneceu informações sobre a heterogeneidade morfológica através de substratos de cana-de-açúcar, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) forneceu informações das paredes celulares, Microscopia de Força Atômica (AFM) forneceu mais as características arquitetônicas da parede celular em escala nanométrica, Difração de Raio-X (DRX) que quantificou a quantidade de celulose cristalina presente em materiais lignocelulósicos, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) forneceu informações qualitativas das alterações químicas no bagaço de cana-de-açúcar e Tomografia de Raio-X por contraste de fases (TCF) forneceu informações da arquitetura de tecido do bagaço cana-de-açúcar, bem como o mapeamento da distribuição de lignina.

Palavras chaves: Biomassa; Bagaço de cana-de-açúcar; Recalcitrância; Materiais lignocelulósicos e Pré-tratamentos químicos.

ABSTRACT

The search for new renewable sources has been motivating research in order to overcome the scarcity of fossil fuels, and the use of lignocellulosic materials, such as sugarcane bagasse, has been gaining prominence since, from it, it is possible to obtain the second generation ethanol. These materials are basically composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The cellulose present in the material is encapsulated by complex bonds between hemicellulose and lignin that make it difficult for enzymes to access cellulose microfibrils. One of the barriers that makes using this material for the production of ethanol second generation is its recalcitrance, which is linked to the resistance that the vegetable has against the attacks of microorganisms from sugars inside the cell walls. This work aims to study the recalcitrance of biomass derived from sugarcane by advanced imaging techniques. Sugarcane bagasse, *in natura* and submitted to acid pretreatment (diluted solution of 1% H₂SO₄) and pre-treated alkaline (dilute solution of NaOH 1%) were characterized, assisted by microwave, at temperatures 130 ° C and 160 ° C for 30 minutes. The biomass samples were analyzed by characterization techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM) that provided information on morphological heterogeneity through sugarcane substrates, Electron Transmission Electron Microscopy (TEM) provided information on cell walls, Microscopy (XRD) that quantified the amount of crystalline cellulose present in lignocellulosic materials, Spectroscopy in the Infrared Region with Fourier Transform (FTIR) provided qualitative information on the chemical changes in sugarcane bagasse and Phase Contrast X-ray Tomography (TCF) provided information on the tissue architecture of sugarcane bagasse as well as the mapping of the lignin distribution.

Keywords: Biomass; Sugarcane bagasse; Recalcitrância; Lignocellulosic materials and Chemical pre-treatments.

1. INTRODUÇÃO

A mitigação das reservas de combustíveis fósseis e as oscilações nos preços do petróleo associado aos problemas ambientais causados pelas emissões de gases do efeito estufa (GEE) têm motivado uma corrida sem precedentes a fontes de energias renováveis.

Dentro da matriz energética mundial, tem-se destacado o etanol celulósico, também conhecido como de 2ª geração, como uma das vias de mitigação dos problemas citados. Resíduos agrícolas como bagaço e palha de cana-de-açúcar, cascas, gramíneas e resíduos florestais, que tradicionalmente são queimados ou descartados, podem ser matérias-primas para obtenção de combustível líquido. Para a conversão de biomassa em combustível líquido, polissacarídeos armazenados no interior das paredes celulares das plantas devem ser degradados e liberados em solução como monossacarídeos, que são fontes de açúcares fermentescíveis (DeMartini et al., 2013).

Uma barreira para a conversão economicamente viável da biomassa lignocelulósica em biocombustível é a sua recalcitrância, que se refere à resistência natural das plantas em resistir aos ataques de microrganismos por seus açúcares no interior das paredes celulares (Himmel et al., 2007). A composição e a estrutura das paredes celulares variam consideravelmente ao longo da estrutura hierarquicamente organizada das plantas (Isaac et al., 2015). Essa complexidade associada à alta densidade de ligações cruzadas de suas paredes celulares contribuem para a recalcitrância da biomassa, particularmente, a presença e a integração da hemicelulose e da lignina, que encapsulam e restringem o acesso às microfibrilas de celulose (DeMartini et al., 2013; Ma et al., 2014; Holopainen-Mantila et al., 2013).

Uma opção para superar a recalcitrância da biomassa são os pré-tratamentos (por exemplo, físicos e químicos), que consistem em uma etapa essencial para a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, com subsequente fermentação dos açúcares em bioetanol. Os pré-tratamentos devem ser capazes de apresentar uma polpa celulósica com elevada acessibilidade e reatividade da fibra aos agentes hidrolíticos ácidos ou enzimáticos, garantir adequada recuperação das pentoses e limitar a formação de

compostos inibidores a leveduras e enzimas, além de ser economicamente viável. Apesar de vários pré-tratamentos terem sido propostos e desenvolvidos; poucos métodos se mostraram economicamente viáveis.

Para o desenvolvimento de pré-tratamentos mais eficientes, estudos que contribuam para o real entendimento dos materiais lignocelulósicos em diferentes escalas, bem como uma melhor compreensão dos mecanismos estruturais e químicos envolvidos durante a sua decomposição, ainda são necessários. Progressos significativos foram obtidos nos últimos anos, comparando-se as alterações ocorridas nas paredes celulares durante um pré-tratamento e a eficiência do processo de conversão enzimática. Estudos recentes sugerem, entretanto, a necessidade de investigar o impacto dos pré-tratamentos nas paredes celulares usando-se técnicas de imagens e analíticas em múltiplas escalas. Neste trabalho, os pré-tratamentos químicos assistidos por radiação micro-ondas serão investigados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a *identificação de características recalcitrantes de biomassa derivada de cana-de-açúcar*, por meio da visualização e quantificação das alterações estruturais e químicas ocorridas durante pré-tratamentos químicos assistidos por radiação micro-ondas. Para isso, técnicas analíticas e de imagens avançadas são utilizadas para a caracterização do bagaço *in natura* e após pré-tratamentos alcalinos e ácidos, com diferentes graus de severidade.

Pretende-se, assim, obter informações novas e relevantes a respeito dos mecanismos de degradação da biomassa para o aprimoramento e o desenvolvimento de rotas tecnológicas de conversão da biomassa em açúcares mais eficientes.

2.2. Objetivos específicos

Com o objetivo de se estudar os mecanismos de decomposição da biomassa em função de pré-tratamentos termoquímicos assistidos por micro-ondas, foram escolhidos dois métodos amplamente utilizados: (i) solução diluída de H_2SO_4 e (ii) solução diluída de NaOH, para duas temperaturas distintas (130°C e 160°C).

As seguintes metas foram propostas:

1. A primeira etapa trata-se de uma avaliação preliminar do uso da técnica de tomografia por contraste de fase (TCF) associada ao processamento de imagens, para a obtenção de informações sobre as características recalcitrantes de substratos. Neste estudo exploratório, o bagaço de cana-de-açúcar é tratado com uma solução de hidróxido de sódio com aquecimento convencional.
2. Caracterização morfológica tridimensional e quantitativa da organização dos tecidos da biomassa, em seu estado *in natura* e após os pré-tratamentos termoquímicos assistidos por micro-ondas, utilizando-se tomografia por contraste de fase síncrotron. De forma complementar, a morfologia dos substratos será analisada por meio de técnicas convencionais de microscopia eletrônica.
3. Mapeamento dos componentes lignocelulósicos (lignina, hemicelulose e celulose), utilizando-se técnicas que utilizam as características vibracionais de grupos funcionais químicos de moléculas (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier). Realizar um estudo detalhado e comparativo dos resultados obtidos por meio das duas técnicas de imagens químicas utilizadas. Adicionalmente, análises semi-quantitativas para avaliar a remoção e/ou redistribuição dos biopolímeros com os pré-tratamentos serão realizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea que teve origem na Índia, e foi inserida no território brasileiro na época colonial. Hoje, o seu maior cultivo é nas regiões tropicais e subtropicais do país. Ela passou por várias modificações desde à sua origem, com isso, originaram-se várias espécies diferenciando-se particularmente a quantidade de fibras e açúcares. Atualmente a maioria da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido da planta original juntamente com outras espécies da mesma família. (Joaquim, 1997).

A cana-de-açúcar é composta por rizomas, caule composto por colmos espessos (com nós e entrenós), no qual possuem grande capacidade de absorver água e onde está concentrada a sacarose. Possuem folhas extensas, com bainhas largas e abertas. Em cada nó há a inserção de apenas uma folha. Sua reprodução acontece pela espiguiha (espícula), um tipo de inflorescência. Cada espiguiha é composta de até 50 flores, que normalmente são hermafroditas (Joly, 2002; Vidal; Vidal 2003). A Figura 1 mostra a morfologia da cana-de-açúcar.

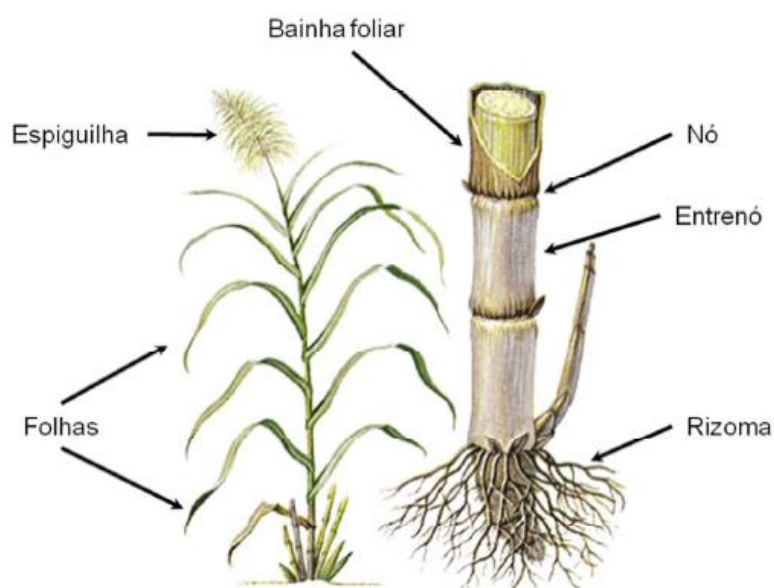


Figura 1: Morfologia da cana-de-açúcar (Philippini, 2012).

A estrutura da cana é composta por vários tipos de tecidos, como o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é constituído de fibras com grande quantidade de lignina, caracterizando-se por sua espessura da parede celular, comprimento e fibras rígidas. Ele serve de suporte para planta e a protege contra efeitos mecânicos externos. O tecido parenquimatoso se encontra no interior do talo, e sua principal função é armazenar a seiva produzida pela planta. As hastes fibrovasculares são constituídas de fibras pequenas e vasos que exercem a função de sustentar e conduzir os alimentos e outros produtos por toda extensão da planta (Paturau, 1989).

Segundo Schlittler (2006) a reprodução da cana-de-açúcar se faz assexuadamente, ou seja, através de colmos sementes que, pela brotação de suas gemas, dão origem aos colmos primários, surgindo assim os secundários, depois os terciários, até a formação de uma touceira. Pode atingir de 2 a 5 metros de altura. É composta principalmente por água e açúcar que estão concentrados nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante.

Segundo MAPA (2015) o Brasil é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, devendo alcançar uma taxa média de aumento da produção de 3,25 %, até 2018/2019, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de até 32,6 milhões de toneladas.

3.2. Materiais lignocelulósicos

A biomassa é composta por celulose, hemicelulose e lignina, bem como outros componentes como extrativos e cinzas, em menor quantidade. As frações de celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos e fontes potenciais de açúcares fermentáveis. Segundo o modelo proposto por (Kondo, 1997) adaptado por (Santos, 2012), a parede celular é constituída por camadas com várias fibrilas de celulose alinhadas paralelamente (indicado em amarelo na Figura 2). Ligninas estão polimerizadas entre as camadas de microfibrilas e covalentemente ligadas com polissacarídeos não-celulósicos, tais como hemiceluloses e pectinas, formando camadas de lignina e polissacarídeos (indicadas em

cinza na Figura 2). A presença e integração da hemicelulose e da lignina que encapsulam e restringem o acesso às fibrilas de celulose contribuem para a recalcitrância da biomassa.

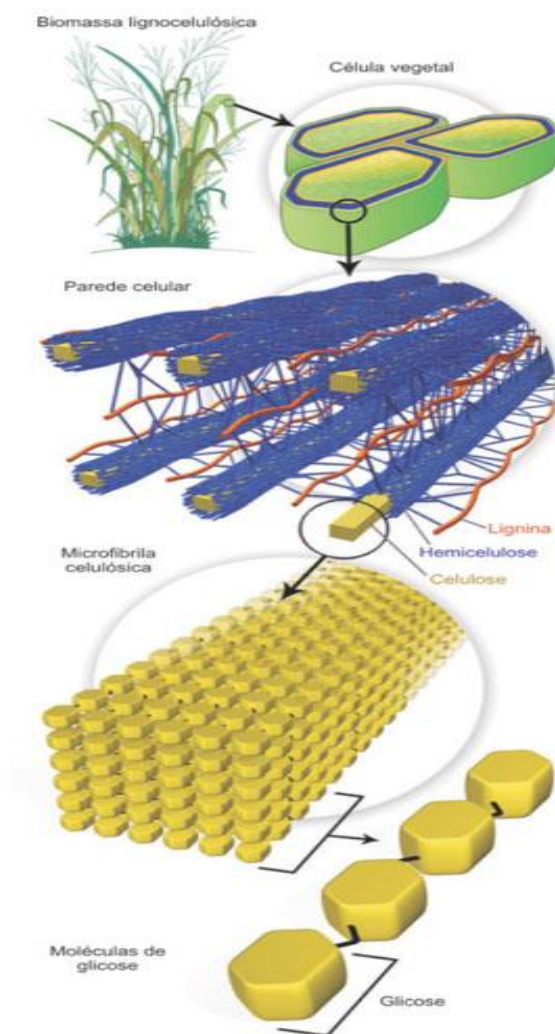


Figura 2: Ilustração esquemática dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular) (Santos, 2012).

As características recalcitrantes da biomassa provem basicamente da estrutura da parede celular da planta, que são compostas de uma combinação complexa de polissacarídeos, diferentes proteínas e lignina (Ritter, 2008). Há a presença da celulose que é combinada pelos seus grupos funcionais que compõem sua estrutura, quanto por suas interações físico-químicas presentes e meio às macromoléculas (Santos, 2012). Assim, a recalcitrância da biomassa está exclusivamente associada com as características químicas e físicas da sua parede celular (Chang, 2000).

A recalcitrância está ligada à proteção dos seus carboidratos contra a degradação por microrganismos ou enzimas. Podemos ressaltar outros aspectos que colaboram para à recalcitrância da biomassa, como o tecido epidérmico que constitui a planta, a estruturação dos feixes vasculares, a relação da quantidade de tecido esclerenquimatosos, as microfibrilas e a matriz polimérica presentes na parede celular. (Himmel et al, 2008). Além disso, para muitos autores a cristalinidade, o grau de polimerização e à baixa acessibilidade enzimática à celulose, são os grandes responsáveis pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos. (Santos, 2012)

A composição química dos materiais lignocelulósicos, pode variar de acordo com tipo de biomassa, idade, sua origem, etapa de crescimento e outras condições (Quilhó, 2011). Existem vários tipos destes materiais e a Tabela 1 mostra a quantidade de celulose, hemicelulose e lignina presentes em alguns deles.

Tabela 1: Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Fibra de coco	36 – 43	0,15 – 0,25	41 – 45	Reddy e Yang,2005)
Fibra de bagaço	32 – 48	19 – 24	23 – 25	Reddy e Yang,2005)
Palha de cana	38,10	29,20	24,20	(Silva, 2009)
Palha de cevada	38,60	21,40	19,90	(Moraes, 2008)
Palha de trigo	30	50	15	(Sun e Cheng, 2002)

3.2.1. Celulose

A celulose é um polissacarídeo linear formada por anéis de β -D-glicopiranosose conectados por ligações β (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, sendo a celobiose a unidade repetitiva do polissacarídeo (Zhang,2008). A figura 3 mostra a estrutura de uma molécula de celulose.

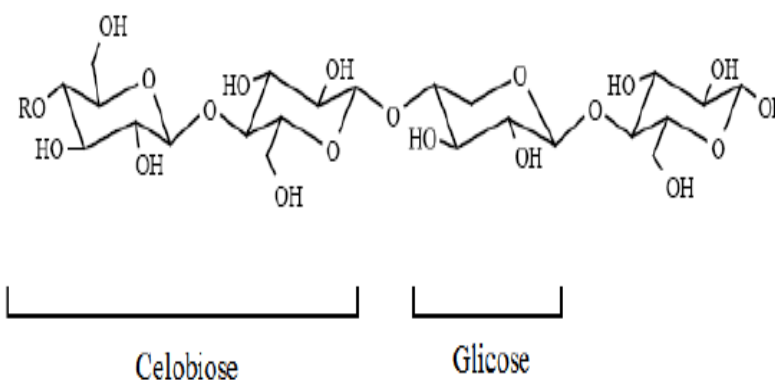


Figura 3: Estrutura de uma molécula de celulose (Fengel e Wegener, 1989).

Segundo (Mohnen *et al*, 2008) a molécula de celulose possui de 500 a 14.000 unidade de moléculas de glicose. Além disso, suas cadeias estão aglomeradas paralelamente formando fibrilas elementares, que não são solúveis em água e possuem regiões cristalinas e amorfas. (Fengel e Wegener,1989). A Figura 4 esquematiza as regiões da celulose.

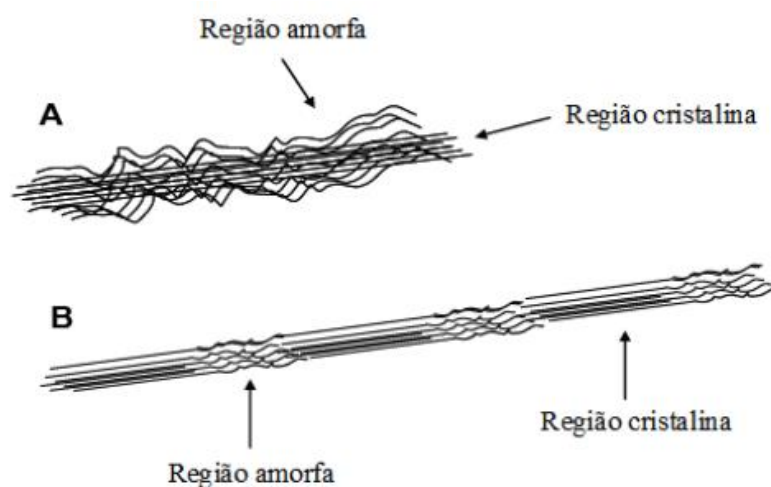


Figura 4: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo (A). As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (B) (Rabelo, 2010).

As regiões cristalinas da celulose são mantidas através das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, tornando-a altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. (Wood e Saddler, 1988); (Converse e Ware, 1994). As ligações intermoleculares conferem rigidez à cadeia do polímero, e as intramoleculares ajudam no desenvolvimento da fibra vegetal (Klemm, 1988). Já as regiões amorfas ou solúveis, por possuírem moléculas menos espessas, são mais fáceis de serem hidrolisadas pelas enzimas celulasas. (Agbor, 2011)

A celulose possui característica higroscópica podendo absorver de 8-14% de água em condições atmosféricas normais, temperatura de 20°C e 60% de umidade relativa, porém não é solúvel em água e em soluções de ácido diluído a baixa temperatura. As causas que influenciam a taxa de hidrólise da celulose podem afetar a sua solubilidade, isso porque ambas estão associadas entre si. Em altas temperaturas, tem-se uma maior geração de energia e conseqüentemente há a quebra das ligações de hidrogênio que fixam a estrutura cristalina da molécula de celulose, tornando-a mais solúvel. Em soluções de ácido concentrados, a celulose também se torna solúvel, porém degrada o polímero por hidrólise. Já em alcalinas concentradas, há o intumescimento das fibras de celulose e desagregação de frações de baixo peso molecular do polímero ($DP < 200$). (Krässig *et al*, 2004). Segundo (FTA, 2003) a celulose se decompõe inicialmente à 180°C, mas ela não se funde.

3.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose ou poliose é um heteropolissacarídeo (polissacarídeo que contém mais de um tipo de monômero) de diferentes açúcares C_5 e C_6 , que compõe a estrutura da parede celular vegetal. Diferencia-se da celulose por serem amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (pontoses, hexoes, ácidos hexurônicos e desoxiexoses). Elas são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (Fengel e Wegener, 1989). Na figura 5 estão representadas as principais estruturas.

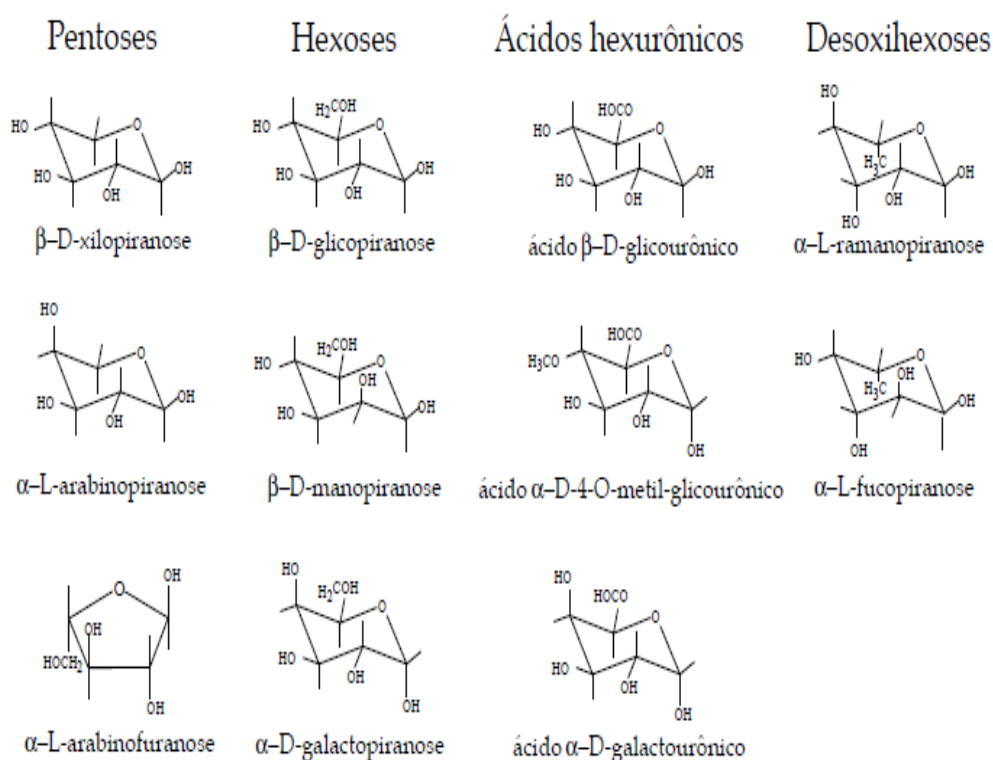


Figura 5: Açúcares componentes das hemicelulose (Miranda,2013).

A hemicelulose possui maior solubilidade em água e maior facilidade de degradação do que a celulose, pois ela possui diversos açúcares combinados e apresenta grande parte de uma estrutura molecular amorfa. Além disso, ela está diretamente conectada à celulose e a lignina, contribuindo para o desenvolvimento e crescimento da planta (Silva, 2009).

O principal polissacarídeo que compõe a hemicelulose é chamado de xilana. Elas são formadas por unidades de xilopiranosose na sua camada central, carboidratos diversos, como ácido urônico 4-metil-glicopiranosose e a α-L-arabinofuranose (Brienzo et al, 2009; Gírio et al, 2010; Philippini, 2012). No caso de madeiras duras, como o bagaço de cana, possuem uma maior proporção de xilana (Souza, 2012; Fengel e Wegener, 1984). Na figura 6 mostra a representação teórica da estrutura da xilana vegetal.

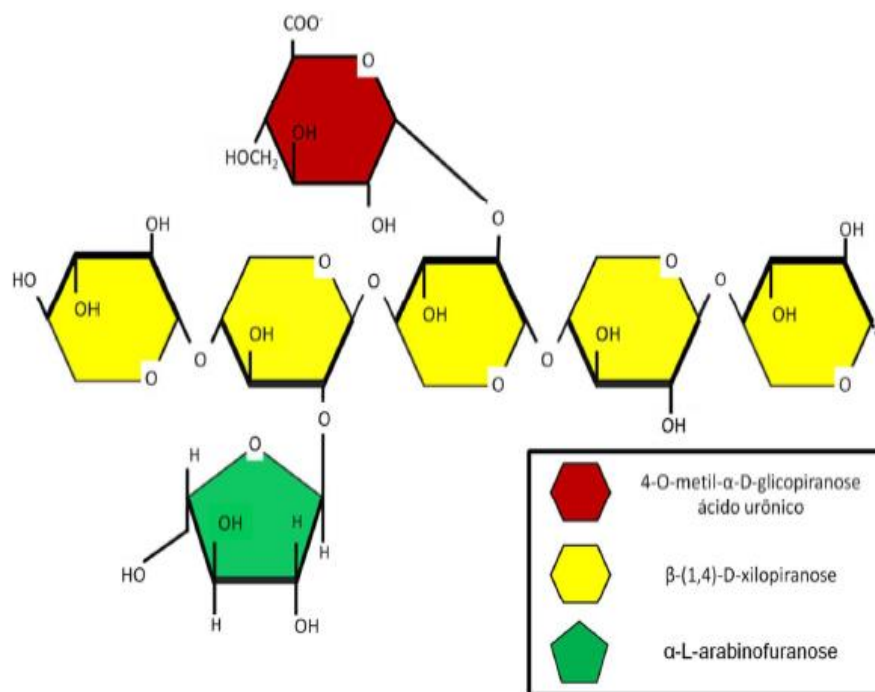


Figura 6: Representação teórica da estrutura da xilana vegetal. Adaptado (Philippini, 2012).

3.2.3. Lignina

A lignina é a terceira maior macromolécula presente na parede das células. Ela é responsável pelo aumento da resistência mecânica da planta e ajuda a proteger os tecidos contra a degradação por micro-organismos (Medina, 2013).

Ela é formada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxicinâmicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 7). Ela é composta por unidades fenilpropânicas conectadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril. (Fengel e Wegener, 1989)

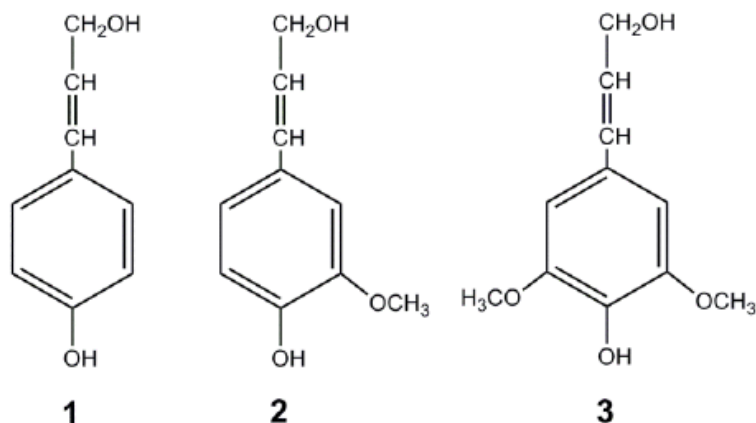


Figura 7: Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico (1), coniferílico (2) e sinapílico (3) (Medina, 2013).

A lignina é um biopolímero que possui maior abundância dentre os materiais lignocelulósicos, seguido da celulose (Weng et al, 2008; Davin et al, 2005, Ferraz, 2016). Em relação a sua morfologia ela é amorfa, complexa, heterogênea e ramificada tridimensionalmente. Além disso, a lignina concentra-se principalmente na lamela média e na parede secundária da célula (Fengel e Wegener, 1989).

A estrutura da lignina não pode ser absolutamente definida, pois varia de um vegetal para outro ou quando avalia-se partes distintas de uma mesma planta (Silveira, 2009). A figura 8 mostra uma representação da estrutura da molécula de lignina e seus principais tipos de ligações, da madeira.

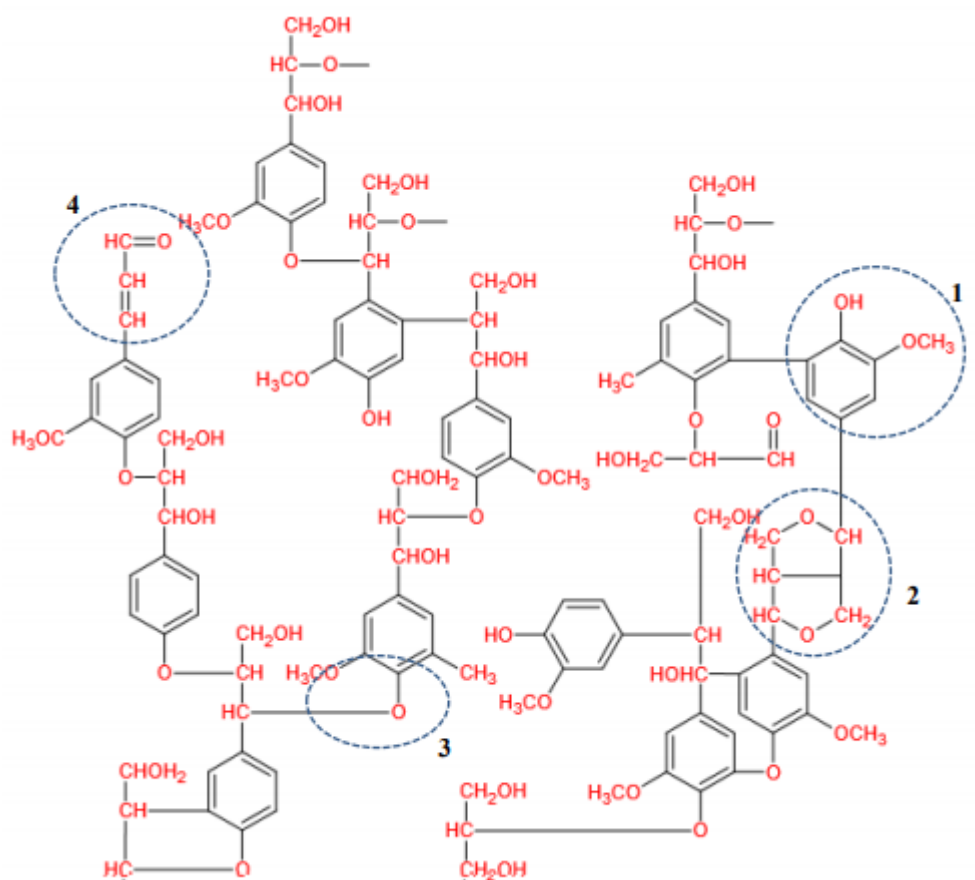


Figura 8: Estrutura da molécula de lignina e seus principais tipos de ligações. Grupos funcionais na estrutura a lignina: (1) grupo hidroxila fenólico; (2) ligação carbono-carbono; (3) ligação tipo éter; (4) carbonila e ligações etilênicas. (Assumpção, 2015)

3.3. Processos de conversão em etanol a partir de biomassa

O etanol é utilizado principalmente como combustível, (um dos poucos obtidos de fonte renovável no mundo), e pode ser utilizado com insumo industrial com diversas aplicações a partir de diferentes fontes de matéria prima. A cana-de-açúcar, ao amido de milho e o açúcar de beterraba, são as principais matérias primas para produção de etanol. Estes produtos agrícolas possuem grandes aplicações alimentícias, aumentando assim a demanda por novas alternativas para produção de etanol. Os materiais lignocelulósicos veem ganhando destaque e o uso futuro do etanol em larga escala pode ser baseado neste tipo de material.

Para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica são necessários pré-tratamentos físicos, químicos e enzimáticos para a hidrólise da celulose e da hemicelulose, fornecendo carboidratos (hexoses e pentoses), que posteriormente podem ser convertidos a etanol por microrganismos fermentadores. A Figura 9 apresenta o esquema da produção de etanol de segunda geração.

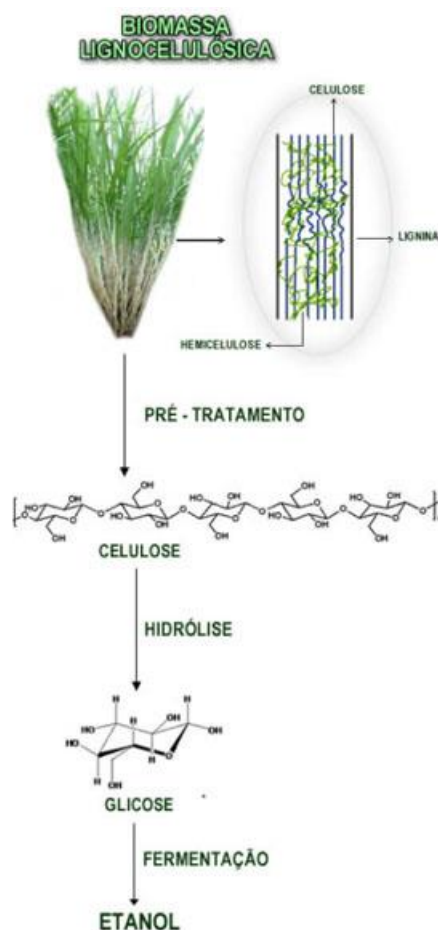


Figura 9: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando hidrólise enzimática (Santos et al., 2012).

A primeira usina comercial de etanol celulósico do mundo, foi inaugurada em outubro de 2013, próxima a cidade de Crescentino, na região norte da Itália. Com capacidade de produzir 75 milhões de litros de etanol 2G por ano. As matérias-primas utilizadas são palha de trigo, palha de arroz e um tipo de cana específica chamada cana-do-reino. Foi investido mais de US\$ 200 milhões no projeto em 2011, principalmente para o desenvolvimento de tecnologia usada para tornar possível a produção de etanol segunda geração (ÚNICA, 2013).

No Brasil, já existem empresas que produzem etanol de segunda geração. A primeira planta em escala comercial de etanol (2G), do Hemisfério Sul, foi operada pela empresa de biotecnologia industrial GranBio. A fábrica recebeu o nome de Bioflex 1 e entrou em funcionamento em setembro de 2014, no município de São Miguel dos Campos, à 55 quilômetros do porto de Maceió, em Alagoas. Sua capacidade de produção é de 82 milhões de litros de etanol. A matéria-prima utilizada para produção do biocombustível é a palha e bagaço de cana-de-açúcar. Ela converte a matéria-prima em etanol, utilizando a tecnologia de pré-tratamento Proesa[®], licenciada pela Beta Renewables para a Bioflex 1 (Figura, 10). Foi a primeira usina de etanol segunda geração a obter a certificação do Air Resource Board (ARB), da Califórnia. Já foi eleita em 2013 como uma das empresas mais inovadoras da América do Sul pela revista Fast Company (GranBio, 2017).



Figura 10: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de palha e bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a tecnologia de pré-tratamento Proesa[®], licenciada pela Beta Renewables para a Bioflex 1 (GranBio,2017).

A Raízen é outra empresa brasileira que destaca-se na produção de etanol segunda geração. Ela também utiliza a palha e o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Em novembro de 2014, construíram uma nova planta industrial juntamente com a já existente, na unidade Costa Pinto, em Piracicaba, no interior de São Paulo, para produção deste tipo de biocombustível. Foi investido R\$ 237 milhões na pesquisa tecnológica e para construção da planta. Associou-se a Iogen Energy, uma empresa de biotecnologia do Canadá que já pesquisava o processo produtivo do etanol celulósico a partir da palha do milho. Por mais benéfico que seja a produção deste biocombustível, há um grande desafio para essas empresas que é reduzir seus gastos na etapa industrial, que ainda é mais caro para produzir comparado com a tecnologia convencional. Um fator que viabiliza economicamente o projeto é que a planta de etanol celulósico está instalada ao lado da saída do bagaço da produção convencional e com isso reduz os impactos logísticos de coleta de matéria prima. Até 2024, planejam construir mais sete plantas de etanol celulósico, além da primeira inaugurada em Piracicaba. A expectativa é que essas unidades, ao serem localizadas próximas a plantas para produção de primeira geração, operem com capacidade máxima e produzam um bilhão de litros de etanol por ano (Raízen, 2017)

3.4. Pré-tratamentos

O pré-tratamento é uma das operações unitárias fundamentais para a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, com a finalidade de aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose. Para isso, a ideia geral destes processos é remover, redistribuir e/ou alterar hemicelulose e lignina, reduzir o grau de cristalinidade da celulose e aumentar a área superficial dos substratos acessível às enzimas que converterão os carboidratos em açúcares fermentáveis, além de não produzirem compostos inibidores que possam interferir no processo de fermentação. A figura 11 mostra o efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas celulasas para realização de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

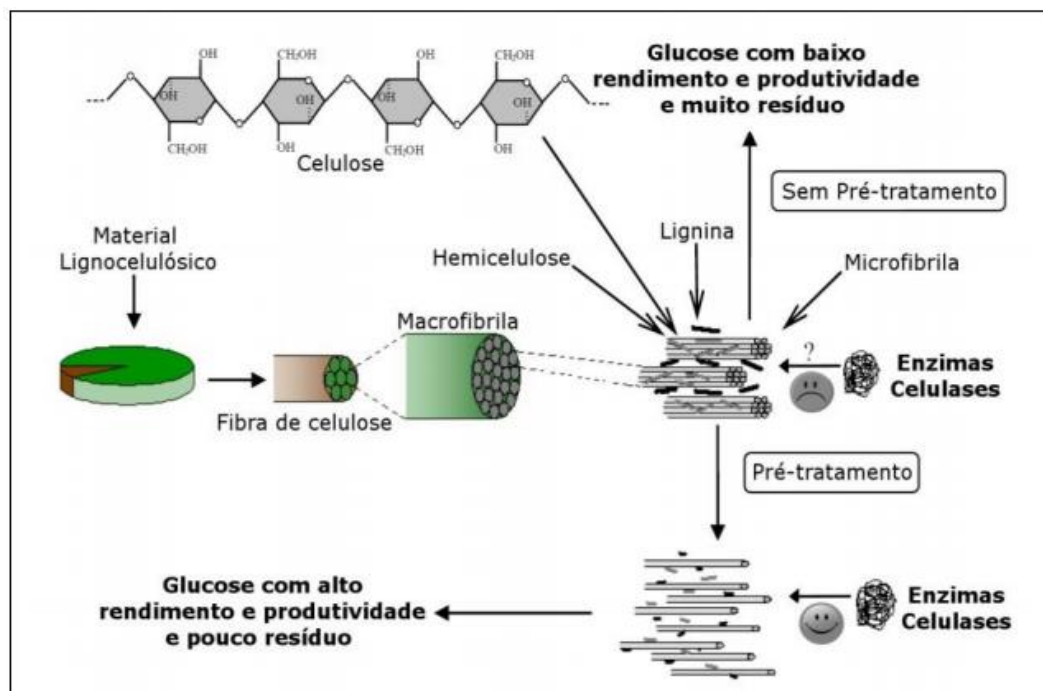


Figura 11: Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas celulases de materiais lignocelulósicos para realizar hidrólise. (Tahezadeh e Karimi, 2008; Odisi, 2013)

Grande parte dos pré-tratamentos são classificados como físicos ou químicos, sendo que cada método altera de forma distinta a estrutura e a composição química dos materiais lignocelulósicos. Por exemplo, pré-tratamentos físicos, como a moagem, não alteram a composição da biomassa, mas modificam a sua estrutura por meio de um aumento da área superficial e da redução do grau de cristalinidade da celulose (Kim et al., 2016). Normalmente, esse processo antecede a etapa seguinte que consiste no processamento químico e/ou bioquímico.

Dentre os pré-tratamentos químicos da biomassa lignocelulósica, destacam-se os métodos que utilizam soluções ácidas e alcalinas diluídas. A eficácia destes pré-tratamentos depende de diversos fatores, dentre eles a temperatura (T) e o tempo de residência (t) do material no reator. Particularmente, os substratos têm sido amplamente pré-tratados em soluções diluídas de H_2SO_4 e $NaOH$, sob condições moderadas de severidade (Kim et al., 2016).

Mais recentemente, vários pesquisadores têm procurado esclarecer as alterações químicas e estruturais que ocorrem nas paredes celulares e nos tecidos de materiais lignocelulósicos com os pré-tratamentos químicos (Zheng et al., 2015; Ji et al., 2015; Lee et al., 2015; Chandel et al., 2014; Holopainen-Mantila et al., 2013; Ding et al., 2013). Informações sobre a distribuição local de biopolímeros, bem como as alterações físicas na arquitetura celular de substratos, puderam ser obtidas; entretanto, ainda existem várias perguntas sobre os mecanismos de degradação da biomassa e o substrato propriamente dito a serem respondidas. Isso se deve, principalmente, à complexidade das características físicas e químicas da biomassa e às limitações de técnicas analíticas tradicionais. A tabela 2 mostra alguns métodos de pré-tratamentos, bem como suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens de alguns métodos de pré-tratamento. Adaptado (Wyman, 2005)

Método	Vantagens	Desvantagens
Métodos diretos		
Ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada produção de glicose • Pequena formação de inibidores • Executado à temperatura ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo elevado do ácido ou na recuperação do ácido utilizado • Valor do equipamento elevado por causa de problemas de corrosão
Ácido diluído	<ul style="list-style-type: none"> • Poucos problemas com corrosão comparado ao ácido concentrado • Método de duas etapas: bom rendimento de glicose e de açúcares de hemicelulose 	<ul style="list-style-type: none"> • Formação de produtos de degradação • Precisa de reatores mais sofisticados para obter grandes rendimentos • Baixa concentração de açúcar no fluxo de saída
Alcalino diluído	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção efetiva de ésteres • Aumento do número de poros • Aumento superficial interna • Diminui o grau de polimerização 	<ul style="list-style-type: none"> • Reagente (NaOH) possui alto custo. • Alto consumo de água • Difícil recuperação do álcali
Pré-tratamentos Físicos		
Moagem ou Vibração – seca ou úmida	<ul style="list-style-type: none"> • Reduz o tamanho da partícula, aumentando a área superficial 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é suficiente para aumentar a taxa de conversão de açúcar

	<ul style="list-style-type: none"> • Em alguns casos, reduz o grau de polimerização (DP) e a cristalinidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Não retira lignina
Pré-tratamentos Químicos		
Explosão à Vapor (com/sem adição de ácido como catalisador)	<ul style="list-style-type: none"> • Ótimo para madeira macia (na presença de um catalisador ácido) • Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose 	<ul style="list-style-type: none"> • Formação de produtos de degradação • Uma etapa adicional é necessária para a remoção da lignina
Oxidação Úmida Alcalina	<ul style="list-style-type: none"> • Formação mínima de inibidores • Remoção eficiente de lignina • Processo exotérmico: pouca energia necessária no processo 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo de oxigênio e catalisador alcalino (Na_2CO_3)
Pré-tratamentos Biológicos		
Uso de Fungos (<i>white rot basidiomycetes</i>) ou bactérias (<i>Actinomycetes</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Remove quantidade considerável de lignina • Pré-tratamento brando (ótimo para materiais com alto conteúdo de carboidratos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior tempo de residência • Bactérias/fungos consomem um pouco do carboidrato disponível – menor rendimento de açúcar

3.4.1. Pré-tratamentos químicos assistidos por micro-ondas

Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar o efeito da radiação micro-ondas nos pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para a produção de combustíveis líquidos. Por exemplo, em um dos trabalhos pioneiros que utilizaram micro-ondas, estudaram o efeito do pré-tratamento com água quente em palha de arroz e bagaço (Ooshima et al., 1984). A partir desse estudo, verificou-se o aumento considerável da acessibilidade destes materiais para a hidrólise enzimática. (Zhu et al., 2005) utilizaram radiação micro-ondas e uma solução alcalina para pré-tratar palha de arroz e trigo; e compararam com o mesmo pré-tratamento alcalino, mas com aquecimento convencional. Os resultados indicaram que o pré-tratamento assistido por micro-ondas conferem maiores taxas de conversão de açúcares e teor de glicose no hidrolisado. (Hu e Wen, 2008) mostraram que os pré-tratamentos alcalinos com micro-ondas aumentam em mais de 50% a liberação dos açúcares que o obtido com aquecimento convencional.

3.4.1.1. Pré-tratamentos com ácido diluído

De forma geral, o pré-tratamento ácido diluído hidrolisa a hemicelulose e solubiliza parte da celulose, tornando a fração celulósica mais amena à ação das celulases. Em trabalhos mais recentes, foi também constatado a redistribuição da lignina nos substratos quando submetidos aos pré-tratamentos ácido diluído (Ji et al., 2015). Com relação às alterações estruturais, vários trabalhos reportaram a redução do grau de cristalinidade da celulose como resultado da decomposição de regiões desordenadas e paracristalinas da celulose, bem como a remoção de estruturas amorfas (Chandel et al., 2014).

Para este tipo de pré-tratamento geralmente são utilizadas soluções de ácido clorídrico, sulfúrico e fosfórico. Preferencialmente, o H_2SO_4 é o mais utilizado por possuir um menor custo em relação ao HCl e H_3PO_4 , por exemplo. A temperatura e a concentração do ácido são determinantes, pois o grau de severidade da reação pode ser fundamental para decomposição da celulose e da hemicelulose, que formam furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e ácido acético, definidos como grandes inibidores de fermentação. (Assumpção, 2015).

Pré-tratamento ácido não atua na retirada de lignina, apenas possibilita a ocorrência de reações de condensação que promovem mudança estrutural, formando pseudo-ligninas que se realocam na parede celular, facilitando os próximos processos. Essa reação de formação das pseudo-ligninas após a lignina e o ácido sulfúrico reagirem, pode ser vista na (Figura 12). Os ácidos minerais utilizados neste pré-tratamento removem a hemicelulose, pois eles hidrolisam a xilana, um polímero presente em maior proporção na hemicelulose, formando assim as xiloses ou pentoses. (Assumpção, 2015)

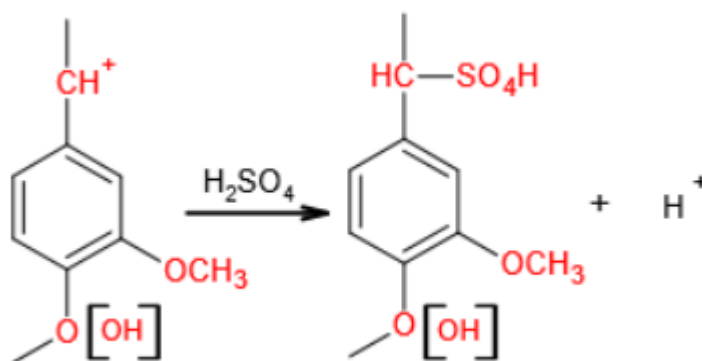


Figura 12: Reação entre lignina e ácido sulfúrico na formação das pseudo-ligninas. (Assumpção, 2015)

3.4.1.2. Pré-tratamentos alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos promovem uma intensa deslignificação da biomassa. Quando comparado aos processos ácidos, as soluções alcalinas causam uma menor degradação de açúcares (Kumar et al., 2009). Soluções aquosas de bases como NaOH, KOH, Ca(OH)₂ e NH₄OH são normalmente utilizadas. Vários trabalhos reportam que soluções de hidróxido de sódio provocam o aumento da superfície interna do material, bem como uma diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que também provoca a ruptura da estrutura da lignina (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Neste pré-tratamento ocorre um inchaço da biomassa, onde há um aumento superficial, uma maior abertura da estrutura, possibilitando que a água quebre a ligação de hidrogênio presentes entre a hemicelulose e a lignina. Com isso, reduz a cristalinidade e rompe a lignina com a quebra das ligações aril-éter. (Nascimento, 2011)

3.5. Hidrólise Enzimática

O material lignocelulósico após ser submetido ao pré-tratamento nas condições apropriadas, é hidrolisado à glicose por intervenção das enzimas. A temperatura, o pH, tempo de hidrólise, a dose de enzimas e a relação sólido com líquido, são condições que variam de acordo com o substrato selecionado e as características do complexo enzimático, onde para cada situação precisam ser definidas e otimizadas. (Rabelo, 2010).

A presença de grupos acetil, a quantidade de lignina, cristalinidade de celulose, o grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra de celulose e tamanho de partícula, são fatores importantes para a realização da hidrólise enzimática (Sewalt et al., 1997). Apesar disso, para um efetivo pré-tratamento avalia-se mais a quantidade de glicose produzida do que a composição química ou características físicas do material lignocelulósico posterior ao pré-tratamento (Rabelo, 2010).

3.6. Técnicas de Caracterização

Muitos desafios são encontrados quando se pretende obter uma completa e detalhada caracterização da biomassa. Isso se deve, principalmente, ao fato de que a recalcitrância das paredes celulares das plantas envolve aspectos químicos e estruturais em diferentes escalas de tamanho (Paës, 2014, Himmel, 2012; Chundawat et al., 2011). Por exemplo, feixes fibrovasculares e tecidos de parênquima são identificados em uma escala de 10^{-4} m, os diferentes tipos de célula podem ser visualizados em uma escala de 10^{-5} m, as paredes primárias e secundárias que constituem as células individuais podem ser diferenciadas em uma escala de aproximadamente 10^{-6} m e as nanofibras de celulose que compõe essas paredes estão na ordem de cerca de 10^{-9} m (Paës, 2014, Chundawat et al., 2011) (Figura 12). Fica claro, portanto, que os mecanismos físicos e químicos que relacionam a recalcitrância da biomassa à sua degradação por meio dos pré-tratamentos devem ser explorados em toda essa faixa de tamanho.

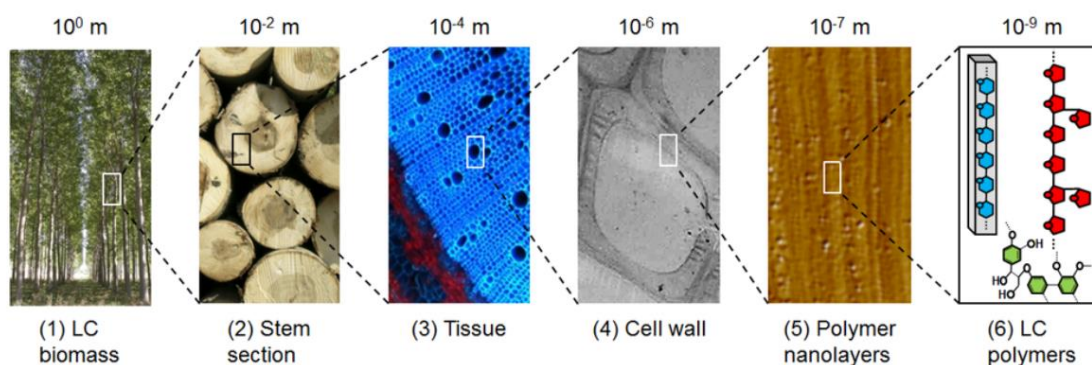


Figura 13: Fenômeno multi-escalar da recalcitrância das paredes celulares das plantas. (Paës, 2014)

4. METODOLOGIA

Este capítulo apresenta, detalhadamente, todos os materiais e métodos utilizados para a realização dos pré-tratamentos, tal como as caracterizações do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.

4.1. Substrato

4.1.1. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar

O material utilizado na pesquisa foi fornecido pela usina de cana-de-açúcar BUNGE Brasil (em Minas Gerais) e é proveniente de uma mesma safra, da espécie *Saccharum*. Foi selecionado uma parte do material para lavagem e secagem. Primeiramente, este material foi colocado em um béquer de 1L com 500 mL de água e, em seguida, foi feita a lavagem por 3 vezes sob agitação. Após a lavagem, as amostras foram secas em uma estufa em 70°C por 24 horas. Finalmente, foi feito o peneiramento do bagaço com uma peneira de 5,0 mm para retirada das partículas menores. A (Figura 4) mostra as partículas de bagaço *in natura* após a lavagem e secagem.



Figura 14: Amostra de bagaço *in natura* após lavagem e secagem

4.1.2. Pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio assistidos por micro-ondas do bagaço de cana-de-açúcar

Com o objetivo de se estudar os mecanismos de decomposição da biomassa em função de pré-tratamentos termoquímicos *assistidos por micro-ondas*, amostras de bagaço provenientes da mesma safra desta usina foram utilizadas. As amostras foram pré-tratadas com solução diluída de H_2SO_4 (1% m/v), com uma razão de 1/20 entre a massa de bagaço e o volume da solução alcalina, por um tempo de processo de 30 minutos, variando-se o grau de severidade em função da temperatura (130 e 160° C). Da mesma forma, pré-tratamentos com solução diluída de NaOH foram conduzidos.

Foi pesado uma massa de 2,51g de bagaço de cana-de-açúcar, essa massa foi colocada em uma solução contendo 0,27 mL de H_2SO_4 diluído em 50 mL de água deionizada. O mesmo foi feito com hidróxido de sódio. Foi pesado uma massa de 2,51g de bagaço de cana-de-açúcar, essa massa foi colocada em uma solução contendo 0,5g de NaOH diluído em 50 mL de água deionizada. Em cada pré-tratamento o material foi colocado em um recipiente de teflon, onde foi fechado para que pudesse ser levado ao micro-ondas às temperaturas de 130°C e 160°C (Figura 14).

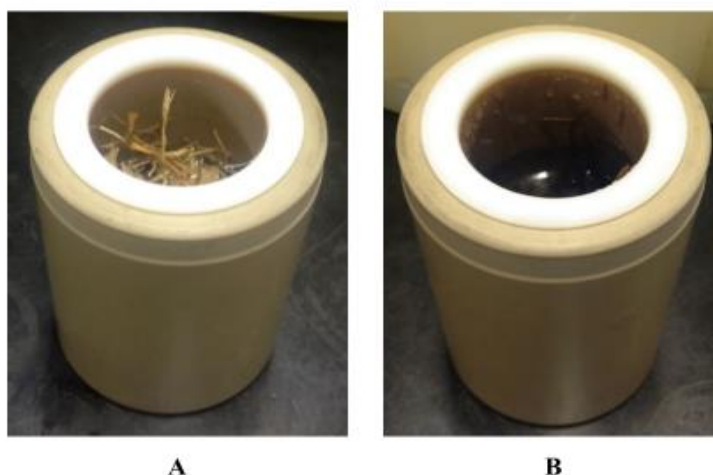


Figura 15: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, (A) antes do pré-tratamento e (B) após do pré-tratamento.

Este procedimento aumenta a pressão interna do recipiente à medida que a temperatura aumenta, com isso a água não entra em ebulição a 100°C, não comprometendo as reações às temperaturas mais elevadas. A duração da reação foi no tempo de 30 minutos, o sistema era fechado, a temperatura era constante durante todo o tempo da reação, à uma potência de 800W. Após completar o tempo da reação, o bagaço de cana-de-açúcar foi lavado com água deionizada, para isso é montado um sistema de filtração (sob sucção) à vácuo, composto de kitasato juntamente com um funil de Büchner, uma membrana e uma bomba, onde o bagaço foi colocado sobre essa membrana e foi feita a lavagem. Posteriormente o bagaço de cana-de-açúcar foi colocado em uma placa de petri e foi para secagem, em uma estufa à 70°C durante 24 horas. As figuras 15 e 16 mostram os bagaços de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos ácido e alcalino, respectivamente. Ao final da secagem, o bagaço de cana-de-açúcar foi colocado em saquinhos plásticos e mantidos fechados.

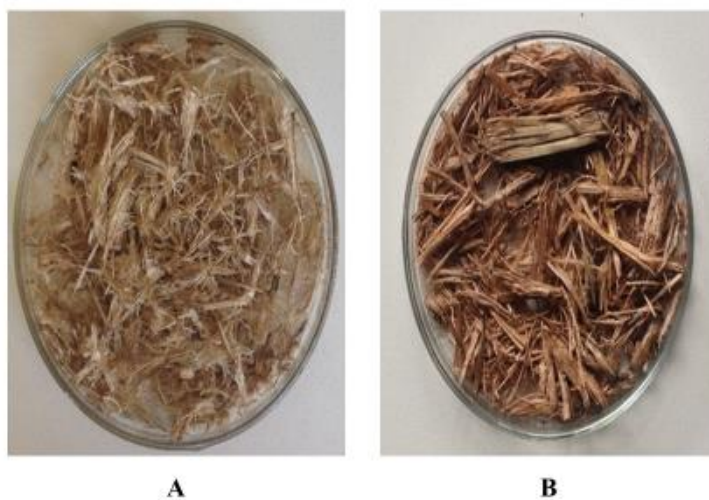


Figura 16: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamentos com solução diluída de H_2SO_4 em 130° C (a) e 160° C (b). Os pré-tratamentos foram conduzidos por 30 min e assistidos por radiação micro-ondas.

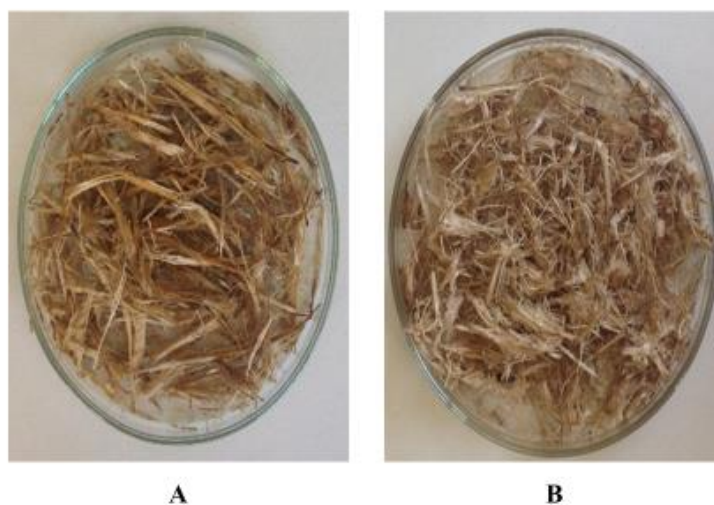


Figura 17: Amostras de bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamentos com solução diluída de NaOH em 130° C (d) e 160° C (e). Os pré-tratamentos foram conduzidos por 30 min e assistidos por radiação micro-ondas.

4.2. Reagentes, equipamentos e materiais utilizados

- Hidróxido de Sódio Micropérolas (NaOH) P.A., marca SIGMA ALDRICH (VETEC), 99% de pureza;
- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) P.A., marca Synth, 95% de pureza;
- Balança digital, marca Shimadzu, modelo AUW220D
- Recipiente Teflon
- Micro-ondas, marca Milestone, modelo Start D.
- Béqueres 1000, 50mL, 25mL.
- Proveta 50mL.
- Estufa, marca Biobase, modelo BOV-H50/90/125/216F.
- Kitasato
- Funil de Büchner
- Membrana
- Placa de Petri
- Agitador magnético, marca Tenal, modelo TE-0851
- Micropipeta, 100 - 1000µL, marca Lab Mate Pro
- Espátulas
- Suporte

- Garras
- Bastão de vidro
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca JEOL, modelo 6360LV
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca Tecnai, modelo G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV
- Difrátômetro de Raios-X de monocristal (DRX), marca Philips, modelo PANalytical PW1710
- Tomógrafo de Raios-X por contraste de fases, marca Bruker, modelo Skyscan 1272.
- Espectrofotômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier, marca Perkin-Elmer, modelo 1760-X (FTIR)
- Microscopia de Força Atômica, marca Olympus, modelo Cypher ES, Asylum Research, AC160TS cantilever de silicone.

4.3. Caracterização morfológica, estrutural e química

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura possui características semelhantes ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, inclusive foi criado baseado no MET. Ele é constituído geralmente por um canhão eletrônico, uma coluna eletrônica composta por uma série de lentes eletrônicas, uma câmara de amostra, uma unidade de varredura, um sistema de detectores e um sistema para visualizar imagem.

O princípio de funcionamento do MEV baseia-se na exploração da superfície da amostra por um feixe de elétrons de pequeno diâmetro. Essa varredura ocorre sucessivamente, ponto a ponto, e o sinal é transmitido a um detector e a uma tela catódica. É constituído basicamente por uma coluna ótico-eletrônica, sistema de varredura, câmara de amostra, detectores e sistema de visualização da imagem. Um modelo esquemático dos componentes do MEV pode ser visto na Figura 17.

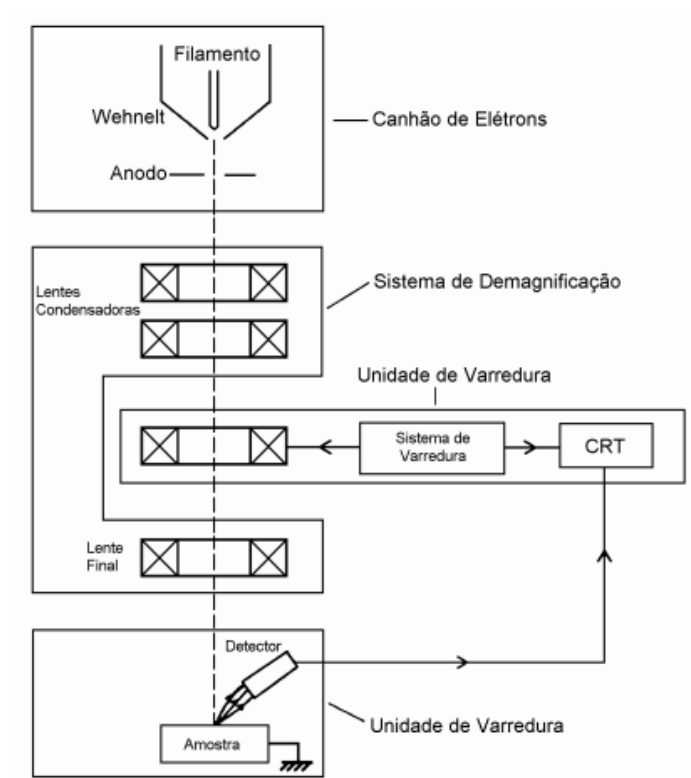


Figura 18: Modelo esquemático dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). (Maliska, 2013)

As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL) usando um detector de elétrons secundário. As amostras foram preparadas por crio-fraturação em nitrogênio líquido e revestidas por pulverização catódica com ouro com uma espessura de cerca de 10 nm. A imagem foi realizada em tensões de aceleração do feixe de 5 a 10 kV.

4.3.1.1. Preparação de amostras

As fibras de bagaço de cana-de-açúcar foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura seguindo as seguintes etapas: Primeiramente as fibras de bagaço de cana foram selecionadas, preparadas por crio-fraturas em nitrogênio líquido revestidas por pulverização catódica com ouro com uma espessura de cerca de 10nm. A imagem foi realizada em tensões de aceleração do feixe de 5 a 10 kV.

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão investiga a estrutura interna de sólidos e fornece informações sobre detalhes microestruturais que não são habituais. A utilização do MET para estudos de materiais biológicos é bastante difundida, pois ele permite definição de imagens intracelulares, podendo assim estudar, por exemplo, a morfologia celular e os aspectos gerais das organelas.

Segundo (Rosa, 2008) o MET é composto principalmente por uma fonte de elétrons que são orientados através de uma coluna formada por lentes eletromagnéticas e aberturas que definem a intensidade, tamanho e o caminho do feixe eletrônico antes e após interagir com a amostra. Juntamente ao sistema estão os detectores de elétrons secundários e raios-x. As tensões referentes a aceleração do feixe podem variar de 80Kv a 1,5MKv, geralmente para materiais inorgânicos utiliza-se na faixa de 200Kv a 400Kv e para materiais orgânicos a faixa de 80Kv a 120Kv. De acordo com a configuração de lentes utilizada, adquire-se uma imagem da amostra do espaço direto (modo imagem) ou no espaço recíproco (modo difração). A Figura 18 mostra o diagrama do MET no modo de operação.

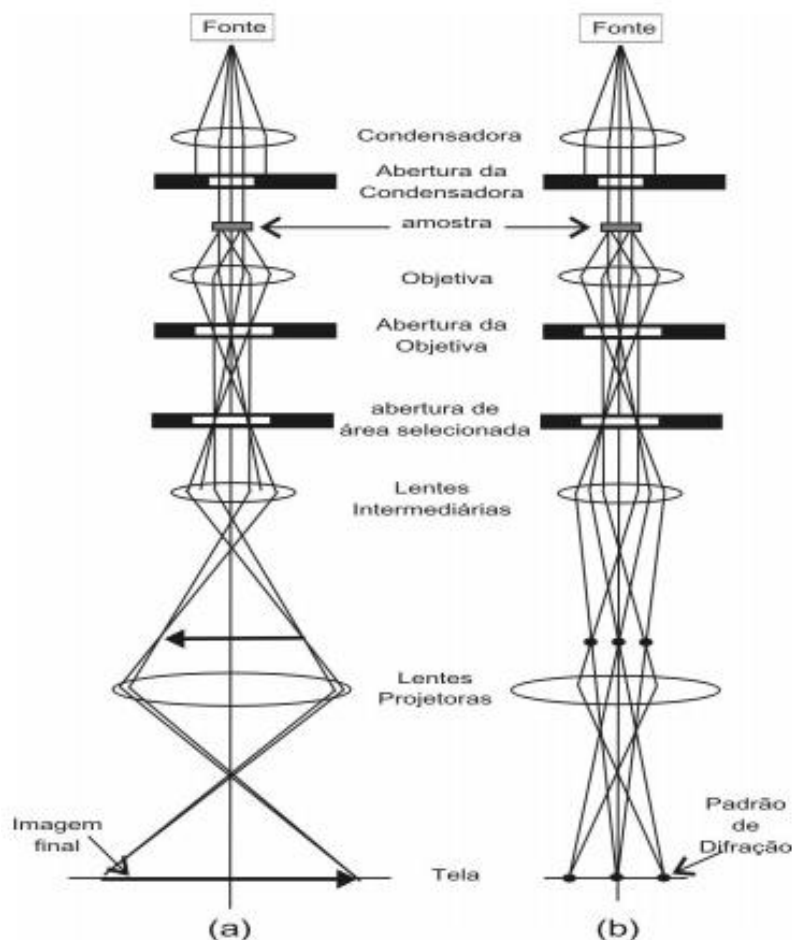


Figura 19: Diagrama do MET no modo de operação (a) imagem e (b) difração. (Rosa, 2008)

A geração da imagem por MET está relacionada principalmente com o tipo de interação (espalhamento) que o feixe de elétrons sofre ao passar por um material sólido e pela sua espessura. O espalhamento de elétrons pode ser denominado por: *espalhamento coerente* (as ondas que formam o feixe, mantêm-se em fase) ou *espalhamento incoerente* (as ondas que formam o feixe deixam de ter relação de fase uma das outras). Além disso, ao atravessar pela amostra o feixe pode ter espalhamento *inelástico* ou *elástico*, tendo em vista a perda ou não de energia cinética (Rosa, 2008).

Para obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV, disponível no Centro de Microscopia da UFMG.

4.3.2.1. Preparação de amostras

As fibras de bagaço de cana-de-açúcar foram preparadas para microscopia eletrônica de transmissão seguindo as seguintes etapas: As amostras foram fixadas por imersão em solução de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponado em tampão fosfato 0,1 M) sob vácuo. Foi utilizado ósmio e acetado de uranila, com a finalidade de manter estáveis as estruturas celulares e intracelulares. As amostras foram desidratadas em uma série graduada em etanol (30, 50, 70, 90%, duas vezes para etanol a 100%) e acetona. Seguido de infiltração com concentrações crescentes de resina Spurr diluída em acetona (15,30, 50, 70, 85, 95%, três vezes para 100% de resina) sob vácuo. Os blocos de resina com as amostras foram polimerizados a 70 ° C por 12 horas. Secções ultrafinas transversais foram obtidas num ultramicrotomo (Leica EMUC7) equipado com uma lâmina de diamante e montado em grades de cobre. As redes foram coradas com citrato de chumbo.

4.3.3. Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) tem se destacado por possuir uma maior resolução e um menor custo em relação a outras microscopias como MEV e MET. Além disso, as imagens obtidas por AFM conseguem um aumento de muitas dezenas de milhões de vezes, possibilitando ainda vantagem de obtenção essa resolução nas três dimensões, enquanto em outros microscópios eletrônicos chegam a centenas de milhares de vezes e não possuem essa vantagem. (Herrmann et. al., 1997)

A Figura 19 mostra uma ilustração do princípio de funcionamento do AFM, onde a geração da imagem se dá pela medição das forças de atração e repulsão entre a superfície da amostra e pela sonda fina que varre a amostra. O cantiléver tem como função avaliar a força de interação entre a amostra e a sonda. A detecção do deslocamento do cantiléver para obtenção das imagens é feita através da reflexão do feixe de laser. Já para a obtenção dos dados e imagens utiliza-se um microcomputador. (Herrmann et. al., 1997)

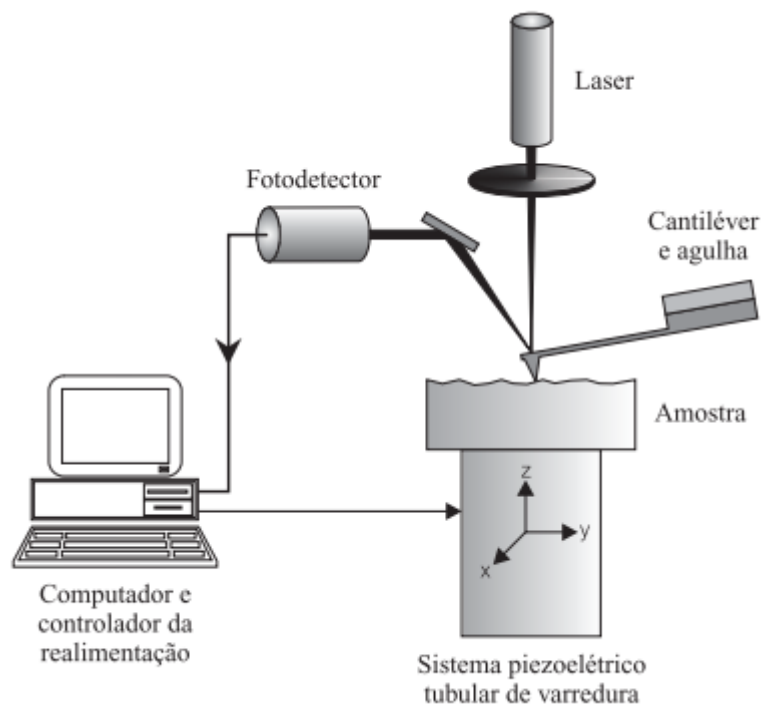


Figura 20: Difração de raios-x em uma estrutura cristalina. (Herrmann et. al., 1997)

Os fragmentos de fibras de esclerênquima antes e depois dos pré-tratamentos foram depositados em folhas de mica recém-cortadas. O excesso de água foi removido usando um fluxo de nitrogênio para minimizar possíveis artefatos gerados pela umidade e pelo procedimento de secagem ao ar, e as amostras foram fotografadas imediatamente. Todas as imagens de fibrilas foram adquiridas por um microscópio de força atômica (modelo Cypher ES, Asylum Research) equipado com caldeirão de silício AC160TS (Olympus) que opera no modo dinâmico sob condições ambientais. As imagens foram de ordem zero achatadas antes da determinação da altura da fibrilação usando o algoritmo padrão do software do sistema AFM.

4.3.4. Difração de raios X (DRX)

Apenas análise da morfologia não é suficiente para obter uma ampla caracterização do material, pois ela não permite obter informações sobre a disposição dos átomos no material. Os espectros de difração de raios X (DRX) irá permitir avaliar a mudança na cristalinidade da celulose remanescente, tanto para a amostra *in natura* quanto para as pré-tratadas.

Segundo (Ferreira, 2008) a difração de raios X é fundamentada a um fenômeno da Física Ondulatória denominado interferência. Isso acontece quando uma onda, ao deparar com uma fenda ou com algum obstáculo com o mesmo comprimento de onda, sofre desvios. Caso essa interferência sofrida pelo feixe produza uma dispersão de feixes em direções exclusivas, ocorre o fenômeno de difração.

Na técnica de difração de raios X, é incidido o feixe de raios X sob vários ângulos na amostra e parte dele é refletido pelos seus planos cristalográficos, com um ângulo igual ao incidente, e detectado por um sensor. Para alguns ângulos de incidência, são produzidos sinais com diferenças de intensidades indicando a posição dos planos atômicos na estrutura. A Figura 21 esquematiza a difração de raios X em uma estrutura cristalina.

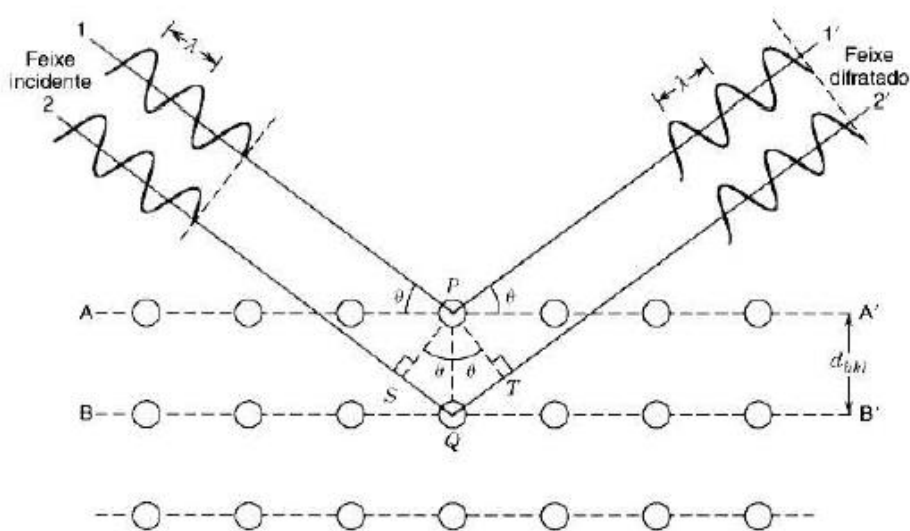


Figura 21: Difração de raios-x em uma estrutura cristalina. (Azevedo, 2010)

Nas redes cristalinas, a difração é regida segundo a Lei de Bragg. Esta lei diz que, quando uma onda monocromática de comprimento λ é incidida sobre um conjunto de planos cristalinos a um certo ângulo θ , haverá um aumento na intensidade espalhada em uma certa direção, e se a diferença de caminho óptico entre os raios (ondas) espalhados pelo plano superior e inferior for múltiplo inteiro do comprimento de onda, haverá a formação de um padrão de difração, ou seja:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

(EQ. 1)

Onde:

n é a ordem da difração;

d é a distância interplanar;

$2d\sin\theta$ é a diferença de caminho óptico;

θ é o ângulo de incidência;

λ é o comprimento de onda da radiação incidente.

Maiores informações da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais, podem ser obtidas por meio de análise dos difratogramas utilizando o método de Rietveld (Nogueira et al., 2014). Esta técnica de refinamento permite análise quantitativa de fases, obter informações de parâmetros estruturais, coordenadas atômicas e densidade ocupacional. (Young, 1995).

O índice de cristalinidade (CrI) das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in* e pré-tratados foi medido utilizando um difractômetro de raios-x (Empyrean, Philips-PANalytical PW1710) usando radiação $\text{CuK}\alpha$. A tensão e a corrente de operação foram mantidas a 40 kV e 40 mA, respectivamente. A gama 2θ era de 10° a 40° com um tamanho de passo de $0,02^\circ$ num intervalo de tempo de 0,4 s. A cristalinidade da celulose foi calculada de acordo com o método descrito por (Segal et al., 1959).

4.3.5. Tomografia de raios X por contraste de fases

A tomografia de raios X por contraste de fases, é bastante utilizada quando se tem um material praticamente transparente à energia dos raios X, como no caso de amostras biológicas, ou quando diferentes detalhes em uma amostra apresentam praticamente a mesma atenuação, as imagens obtidas possuem baixo contraste.

A imagem por contraste de fase é obtida pela interferência entre um feixe de referência e o feixe transmitido pela amostra. Os gradientes de fase no feixe transmitido pela amostra são originários das variações no índice de refração e espalhamento, principais responsáveis pelo contraste na imagem.

Atualmente, as técnicas mais utilizadas são: método de propagação, imagem realçada por difração, interferometria de raios X e interferometria usando grades (Pfeiffer et al., 2006, Momose, 2005). Particularmente, o contraste de fase baseado na propagação tem sido o método mais amplamente utilizado.

O método de propagação ou holografia pode ser considerado o mais simples dos métodos de TCF, uma vez que usa somente a natureza ondulatória da luz. Esta técnica explora a interferência entre os feixes que sofrem desvio ao atravessar meios com diferentes índices de refração ao se propagarem na amostra, com os que não sofrem desvio. A interferência, construtiva ou destrutiva, resultará em mudança de intensidade dos raios que atingem o detector.

A organização tridimensional do tecido vegetal das amostras de bagaço de cana-de-açúcar foi estudada por tomografia de contraste de absorção. As medições foram realizadas usando um micro-CT Scanner (modelo Skyscan 1272, Bruker). Durante a rotação da amostra, 1.200 radiografias foram feitas projeções. A tensão e a corrente da fonte utilizadas durante as medições foram de 100 kV e 100 mA, respectivamente. A distância do detector de amostras foi de 70 mm e o tamanho do pixel foi de 7,5 μm . Devido ao campo de visão restrito da câmera CCD, foram escolhidas partículas de bagaço com diâmetros de menos de 1 mm para as inspeções tomográficas. O pacote SkyScan NRecon

foi usado para reconstruir imagens de seção transversal de imagens de projeção de tomografia usando o algoritmo de reconstrução de Feldkamp (Rodet et al., 2004).

A avaliação do volume tomográfico foi focada no tecido vegetal arquitetura. Os voxels foram identificados como pertencendo ao lúmen celular (ou simplesmente chamado poros) ou paredes celulares de plantas, aplicando um limite de intensidade com base em seu nível de cinza. Para a visualização do volume tomográfico, utilizou-se o software comercial Amira-Avizo 3D (FEI).

4.3.6. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia no infravermelho baseia-se nas características vibracionais de grupos funcionais químicos de moléculas. As ligações químicas possuem frequências de vibração específicas, que correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais) (Reddy et al., 2013; Workman Jr e Weyer, 2012; Katon, 1996). De uma forma geral, as ligações moleculares podem vibrar em seis modos: deformação axial simétrica (estiramento simétrico), deformação axial assimétrica (estiramento assimétrico), deformação angular simétrica no plano (tesoura), deformação angular simétrica fora de plano (sacudida), deformação angular assimétrica no plano (balanço) e deformação angular assimétrica fora do plano (torção) (Reddy et al., 2013).

Em temperaturas acima do zero absoluto ($-273,15^{\circ}\text{C}$), todos os materiais estão em vibração contínua e, portanto, emitem radiação infravermelha (*infrared*, IR). Entretanto, quando radiação IR incide em uma molécula, a luz pode ser absorvida, desde que a frequência da radiação incidente seja idêntica à necessária para uma das transições entre os níveis discretos de energia da molécula e alteração no seu momento dipolo. Por exemplo, quando os dois átomos de oxigênio do dióxido de carbono se movem simetricamente para dentro ou para fora, a radiação infravermelha não será absorvida porque não houve alteração no momento dipolo. Pode-se dizer, portanto, que o estiramento simétrico é inativo no infravermelho. Entretanto, se os dois átomos de oxigênio se movem para a esquerda ou para a direita - estiramento assimétrico -, haverá uma mudança no momento dipolo e a luz IR é absorvida em 2350 cm^{-1} .

Grupos funcionais específicos tendem a absorver radiação em números de onda também específicos. Essa absorbância ocorre independentemente da resposta de outras ligações químicas presentes na molécula. Por exemplo, a ligação dupla C = O do grupo carbonila ocorre em aproximadamente 1.700 cm^{-1} em cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos.

A instrumentação utilizada pela técnica de espectroscopia IR consiste em uma fonte policromática na região do infravermelho, que é guiada por um interferômetro de Michelson. Os dados são coletados na forma de interferogramas; e o espectro, mostrando a absorbância medida como função do número de onda, é obtido a partir deste interferograma por meio do processamento matemático via transformada de Fourier (Workman Jr e Weyer, 2012).

A análises espectrofotométricas na região do infravermelho ajudaram na identificação dos grupos funcionais existentes no bagaço de cana-de-açúcar por meio das vibrações das moléculas provenientes da absorção da radiação eletromagnética pelas ligações químicas presentes nesse material. As análises foram feitas pela técnica de transmissão, com pastilhas de KBr, em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1760-X (FTIR), na região do espectro entre 4000 e 500 cm^{-1} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização

5.1.1. Visualização dos tecidos da biomassa derivada de cana-de-açúcar

A reconstrução tomográfica de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* está apresentada na Figura 22, na qual uma estrutura celular ordenada e rígida pode ser visualizada. A integridade do tecido é observada para uma grande extensão da amostra e o colapso local de algumas paredes celulares pode ser identificado. Isso deve ser, provavelmente, consequência da secagem das amostras, que podem causar rupturas irreversíveis nas paredes celulares. Cada voxel corresponde às dimensões de $0,438 \times 0,438 \times 0,438 \mu\text{m}$.

Além disso, os componentes anatômicos do bagaço (fibras e tecido parenquimatoso) são facilmente identificados a partir da perspectiva tridimensional mostrada na Figura 22a e também na seção transversal da partícula na Figura 22b. Em concordância com a literatura (Ding et al., 2012), os feixes vasculares são circundados por células esclerenquimáticas e dispersos em um tecido parenquimatoso. Próximo à epiderme, esses feixes vasculares aparecem bem próximos uns dos outros; mostram-se, porém, bem mais espaçados no interior do caule.

Independentemente da região, os feixes vasculares são encontrados na partícula transversal, as células de esclerênquima possuem paredes espessas de aproximadamente $5 \mu\text{m}$, contendo lúmens com diâmetros entre 6 e $75 \mu\text{m}$. As células parenquimatosas possuem paredes mais finas e poros com diâmetro entre 25 e $60 \mu\text{m}$.

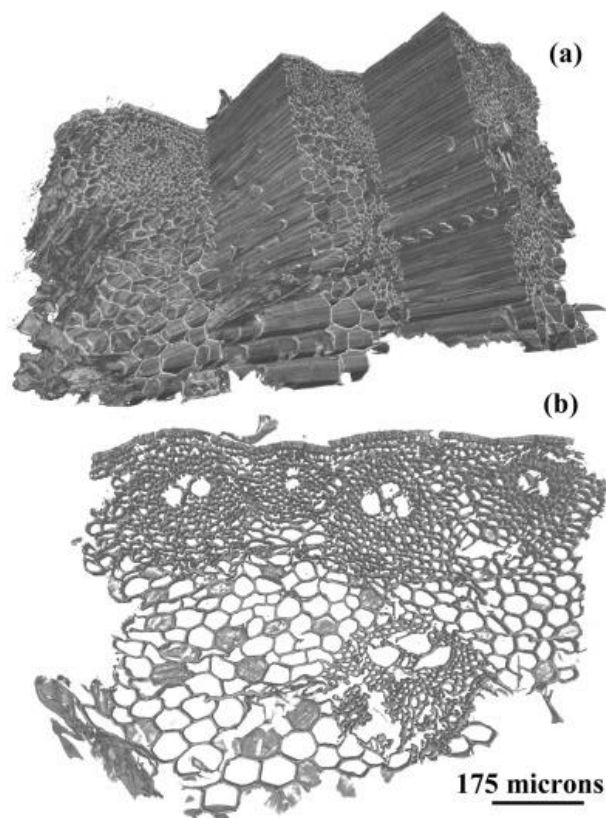


Figura 22: Imagens de tomografia por contraste de fase de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. (a) Imagem TCF de uma única fibra e (b) uma seção transversal a partir da tomografia reconstruída

O pré-tratamento alcalino possui um efeito marcante na morfologia do bagaço (Figura 23). A arquitetura de tecidos de amostras pré- tratadas é praticamente desestruturada. Longas trincas podem ser observadas ao longo do parênquima, fazendo com que os feixes fibrovasculares (feixe vasculares e as células de esclerênquima circunvizinhas) se encontrem separados uns dos outros. Essa fragmentação das partículas bagaço de cana culmina em um aumento da área superficial externa (superfície da fibra). O esclerênquima também se mostra alterado pela solução NaOH, exibindo células danificadas e distorcidas.

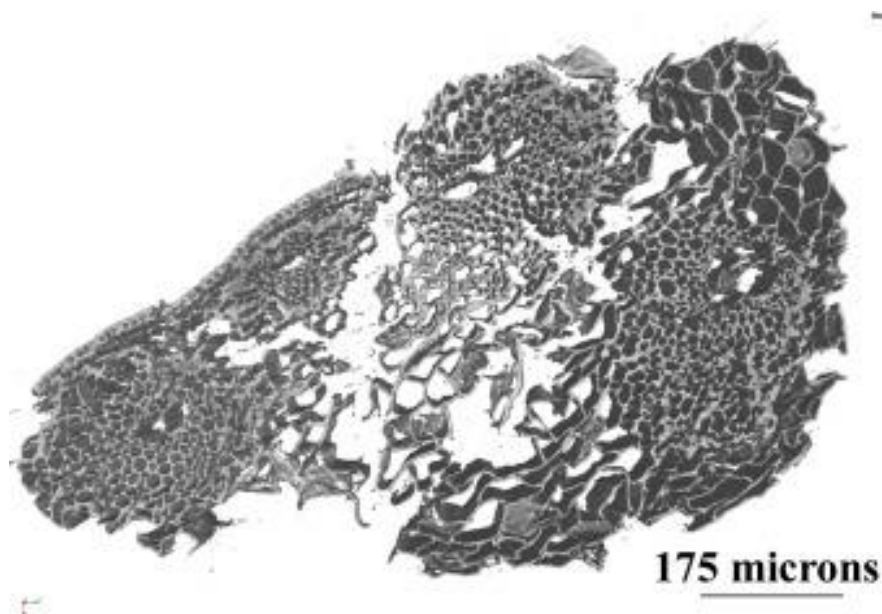


Figura 23: Reconstrução tomográfica de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uma solução alcalina (1% NaOH por 40 minutos em 120° C).

5.1.2. Informação quantitativa sobre a arquitetura de tecido pré-tratada.

Análise quantitativa dos tecidos da biomassa, devido à limitação computacional, foi desenvolvida para uma região representativa do volume de tomografia correspondente à 300 slices (130 μm de altura). Informação de mais de 3.500 e 2.900 lúmens celulares foi extraída das partículas em seu estado *in natura* e após pré- tratamento alcalino, respectivamente.

Com o intuito de mostrar o impacto do pré-tratamento alcalino na estrutura do bagaço, histogramas da área superficial dos poros (isto é, a área superficial interna de cada lúmen) foram calculados. A Figura 24 mostra as distribuições das áreas superficiais dos poros para as partículas nas duas condições em estudo. Classes de área superficial dos poros foram definidas em escala logarítmica, em microns quadrados.

Como apresentado na Figura 24, os histogramas das áreas superficiais dos poros individuais, comportam-se como distribuições bimodais, que consistem na combinação de uma curva de decaimento exponencial e uma distribuição log-normal. O maior pico da distribuição bimodal de amostras *in natura* corresponde aos poros com área superficial entre 2.595 e 8.024 μm^2 , englobando cerca de 25% da quantidade total dos poros 32

detectados pela tomografia por contraste de fase. O segundo pico desta distribuição é resultado da contribuição dos pequenos poros com área superficial de até $9 \mu\text{m}^2$, que totalizam aproximadamente 16% do número total dos lúmens celulares.

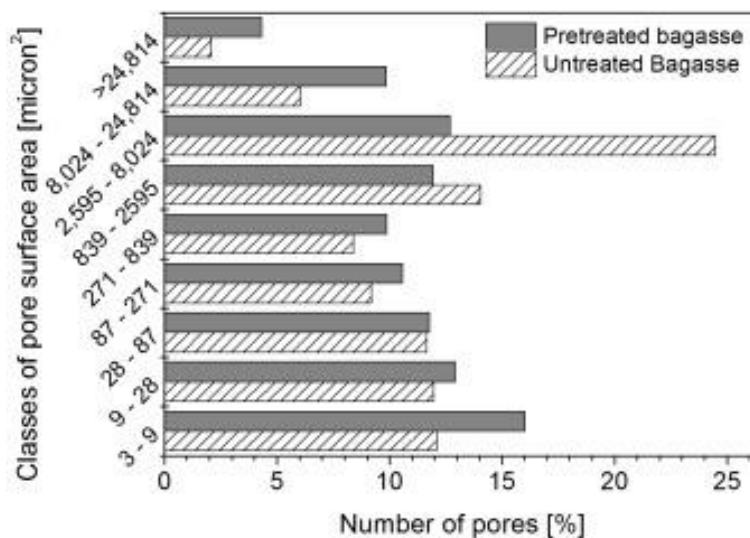


Figura 24: Histogramas das classes de áreas superficiais de poros individuais das partículas de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas com NaOH.

Quando a biomassa é pré-tratada com hidróxido de sódio, o perfil da área superficial dos poros é caracterizado por um decaimento pronunciado no número de poros com área superficial entre 2.595 e 8.024 microns quadrados. Este pré-tratamento também causa o aumento da quantidade de poros com área superficial maior ($> 8.024 \mu\text{m}^2$). Poros maiores são, predominantemente, resultado da coalescência de células vizinhas que possuíam uma parede celular em comum e colapsou-se devido à ação da solução alcalina.

Para visualizar a distribuição espacial das áreas de superfície dos poros, a Figura 25 apresenta um gráfico com informação do volume tomográfico. A Fig. 25a mostra todos os poros detectados e analisados quantitativamente nos fragmentos *in natura*. Cada poro individual está associado a uma cor diferente. Enquanto isso, a Fig. 25b destaca apenas os poros que contribuem para o maior pico do histograma da área de superfície apresentado na Fig. 3 (isto é, 2.595 e 8.024 μm^2). Assim, é claro que este pico reflete a contribuição significativa das células do esclerênquima para a distribuição da área de superfície dos poros.

Com o intuito de esclarecer a redução na quantidade de células de esclerênquima com área superficial entre 2.595 e 8.024 μm^2 após o pré-tratamento (Figura 26), os lúmens que mantêm a área superficial entre esses limites podem ser visualizados na Figura 27. A partir desta figura, pode notar-se que muitas células têm seu tamanho e forma amplamente alterados. Os poros pequenos aparecem no meio de paredes celulares de maior espessura, enquanto que os lúmens celulares maiores resultam da coalescência de células vizinhas no esclerênquima.

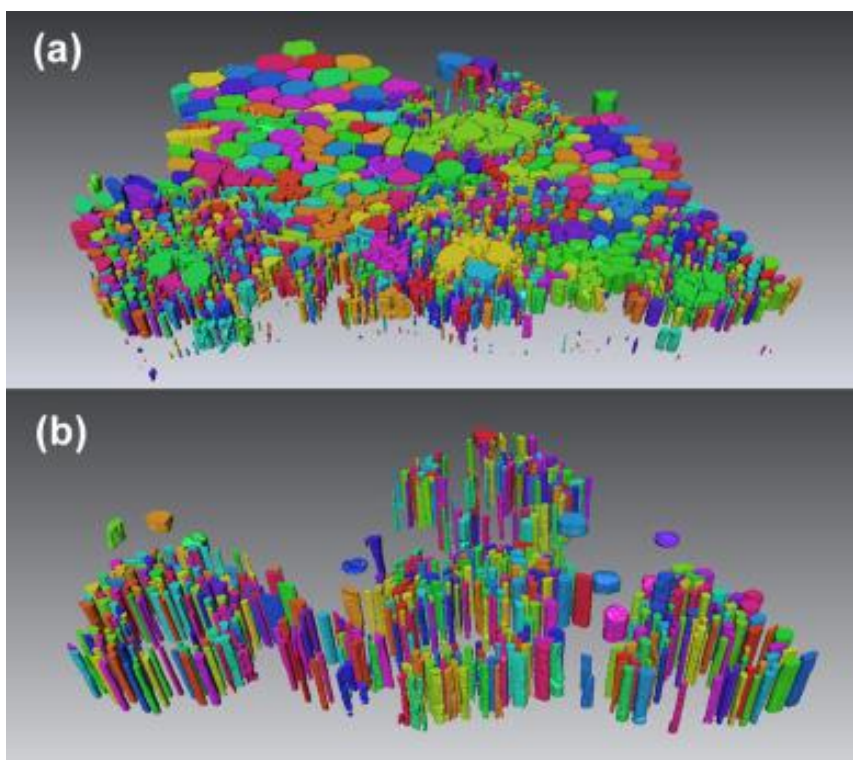


Figura 25: Imagens tomográficas de uma única amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Imagens de (a) todos os poros na seção transversal da partícula e (b) poros individuais das áreas superficiais (entre 2.595 e 8.024 μm^2). Cada poro individual está associado à uma cor diferente.

Adicionalmente, o impacto do tratamento alcalino na espessura da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado. Mapas de espessura de parede ao longo da seção transversal foram computados para as amostras no estado *in natura* e tratado (Figuras 27a e Figura 27b, respectivamente). A maioria das células do tipo esclerênquima exibem 34 paredes com espessura entre 9 e 12 μm ; o tecido de parênquimas apresentou valores de espessura menores. Após a solução alcalina, a espessura é significativamente reduzida em toda a seção transversal do bagaço, o que leva à ruptura de células vizinhas especialmente no parênquima (Figura 27b). Apesar desta abordagem mostrar uma

tendência de redução da parede celular, ressalta-se a limitação das técnicas combinadas de tomografia e processamento de imagens em resolver e identificar vazios menores ou mais finos, como os poros presentes na junção de três ou mais células e as delaminações no interior das paredes.

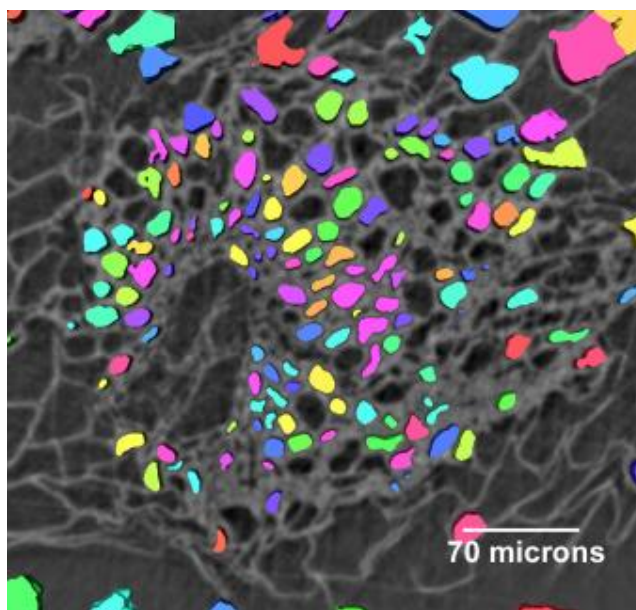


Figura 26: Região selecionada do volume tomográfico da fibra de bagaço pré-tratada com NaOH. Poros individuais com áreas superficiais (entre 2.595 e 8.024 μm^2) estão coloridas na imagem.

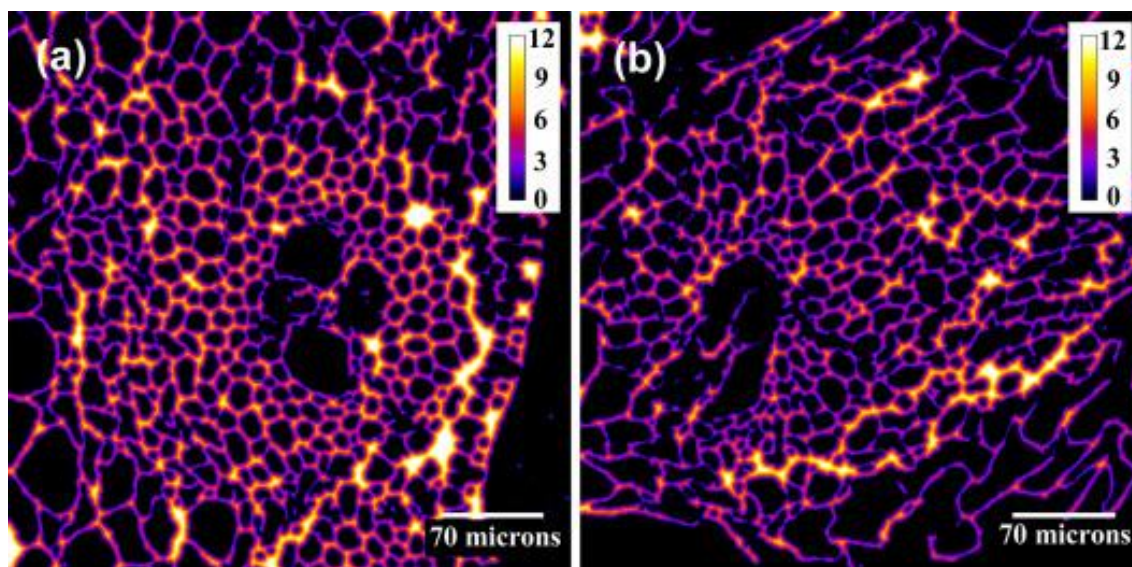


Figura 27: Mapas da espessura da parede celular das seções transversais das partículas de bagaço de cana-de-açúcar. Imagens de (a) seção transversal da partícula in natura e (b) seção transversal de partículas tratadas em meio alcalino. A legenda e a barra de escala estão em microns.

Como reportado por Ding e seus colaboradores (2012) e em concordância com a anatomia geral de plantas, o esclerênquima geralmente apresenta concentração de lignina superior à do tecido parenquimatoso. Além disto, sabe-se que a solução básica é capaz de decompor a estrutura da lignina e quebrar as ligações com outros carboidratos no material, tornando a celulose mais acessível (Agbor et al., 2011). A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o pré-tratamento com NaOH tem um efeito preponderante nas células parcialmente lignificadas e de paredes finas do tecido parenquimatoso.

5.1.3. Mudanças na área de superfície específica pelo pré-tratamento alcalino.

A área superficial acessível à hidrólise enzimática é um parâmetro importante para a avaliação da eficiência dos pré-tratamentos. O contato físico entre a enzima e o substrato é necessário para que a hidrólise ocorra; e a área superficial disponível para tal contato influencia diretamente na velocidade de reação (Chang e Holtzaple, 2000; Zhang e Lynd, 2004).

Para uma maior compreensão dos mecanismos de ação dos pré-tratamentos, a contribuição da área superficial externa e interna das partículas com relação à área total foram separadamente computadas. A superfície externa está relacionada ao tamanho e forma das partículas, enquanto a superfície interna depende da sua estrutura interna

porosa (Arantes e Saddler, 2011; Chang et al., 1981). A área da superfície interna é estimada pela adição da área de superfície interna aos lúmenes de células detectados por tomografia por contraste de fases. A área de superfície externa da partícula também é calculada.

A Tabela 3 mostra os valores das áreas superficiais específicas externa, interna e total das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidos a partir dos volumes de tomografia. Estes dados revelaram que a áreas superficiais específicas total para o bagaço não-tratado é de aproximadamente 0,121 m²/g. Já as áreas superficiais externa e interna são 0,017 e 0,104 m²/g, respectivamente. A contribuição da área superficial interna representa, portanto, cerca de 86% de toda a área superficial específica da amostra *in natura*. Deve-se ressaltar que a área superficial específica total (0.121 m²/ g) do substrato analisado corresponde a uma área de superfície de 2,964x10⁻⁶ m². Considerando que a resolução da área é basicamente a área de pixels (1,92x10⁻¹³ m²), os valores calculados apresentados na Tabela 3 podem ser considerados precisos o suficiente para essa análise.

Tabela 3: Valores das áreas superficiais específicas externa, interna e total das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidos a partir dos volumes de tomografia.

Tipos de SSA (m²/g)	In natura	Pré-tratado
Área superficial externa	0,017	0,158
Área superficial interna	0,104	0,273
Área superficial total	0,121	0,431

Em concordância com os resultados apresentados por Zhang e Lynd (2004) e Chang et al. (1981), a área interna do material foi praticamente ordem 1 de grandeza superior à sua área externa. Entretanto, com o pré-tratamento alcalino, a área superficial específica externa das partículas aumentou 9,2 vezes; enquanto que a SSA interna, somente 2,3 vezes. Esse aumento da área superficial externa se deve tanto à redução do tamanho das partículas, quanto ao aparecimento de grandes trincas em seu interior. Com isso, a razão entre as áreas superficiais externas e internas se reduz à 1,7.

A abordagem utilizada para medir a área superficial foi limitada aos mecanismos de degradação da biomassa e a superfície disponível no nível micrométrico. A área de superfície *in natura* acessível às enzimas apresentadas na Tabela 3, embora relevante, é apenas uma fração da área superficial total medida por outras técnicas, como a adsorção de nitrogênio (Isaac et al., 2015; Adani et al., 2011). Para uma compreensão completa da recalcitrância estrutural, esta análise deve ser estendida à escala de dimensões moleculares (nanômetros). A importância relativa da área superficial dos poros com diâmetros nas escalas de nanômetro e micrômetro para a eficiência da hidrólise enzimática continua a ser amplamente desconhecida.

Identificamos que a estrutura lignocelulósica do bagaço sofreu simultaneamente: fragmentação e desestruturação das paredes celulares. A fragmentação produz fissuras internas, particularmente no tecido do parênquima, levando eventualmente à redução do tamanho de partícula, pelo que a área de superfície específica externa das partículas de bagaço é aumentada. Por outro lado, a desestruturação das paredes celulares resulta da redução significativa da espessura da parede celular e também do colapso local das células vizinhas. Essas observações sugerem que pode ter uma correlação entre o aumento da área superficial específica por meios de pré-tratamento e a fração volumétrica e anatomia de feixes fibrovasculares. Isso pode ser interpretado como uma estratégia para a seleção de substratos menos recalcitrantes e, conseqüentemente, processos de pré-tratamento mais eficientes

5.2. Caracterização

A estrutura hierárquica das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar foi espacialmente investigada antes e depois dos pré-tratamentos assistidos por micro-ondas, em solução diluída de H₂SO₄ e NaOH a temperaturas de 130°C e 160°C.

5.2.1. Mudanças químicas no bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos

As alterações químicas no bagaço de cana-de-açúcar foram analisadas qualitativamente por espectroscopia FTIR. A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidade de β -D-glucopiranosose ligada entre si por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) (Chen et al., 2011). Os resíduos sólidos de bagaço de cana-de-açúcar após 30 min pré- tratado com H₂SO₄ e NaOH em duas temperaturas diferentes (130 ° C e 160 ° C) foram analisados por FTIR (Figura 28). A Figura 28b mostra as bandas entre 850 - 1200 cm⁻¹ que estão associadas às estruturas de celulose e hemicelulose (Chen et al., 2012; Liu et al., 2006). Esta região espectral não houve uma modificação significativa após o tratamento com NaOH, o que indica que as estruturas de celulose e hemicelulose não são significativamente afetadas por este processo químico. No entanto, esta mesma região é modificada após o pré-tratamento com H₂SO₄. A Figura 28a mostra que o pico a 1239 cm⁻¹, atribuído ao alongamento acetil C-O da estrutura de hemicelulose, está ausente após o pré-tratamento com ácido, o que implica que a hemicelulose foi efetivamente desacetilada (Li et al., 2011). Isto sugere uma remoção efetiva da hemicelulose nestas condições. O pico a 1728 cm⁻¹ é observado a partir das ligações complexas entre hemicelulose e lignina, tais como grupos acetil, feruloil e grupos p-cumarílico ligados (Boonmanumsin et al., 2012). Após o pré-tratamento ácido, não há absorvância nesta posição, indicando que essas ligações também foram quebradas. Devido à natureza do aquecimento por micro-ondas, os grupos polares são amplamente afetados por micro-ondas, enquanto que as partes menos polares (lignina) são menos interativas com micro-ondas (Zhu et al., 2016).

A lignina possui bandas de absorção características de 1450 cm^{-1} a 1730 cm^{-1} (Chen et al., 2012). Bandas típicas a 1456 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} podem ser usadas como uma impressão digital de lignina nas amostras. A absorção a 1456 cm^{-1} é atribuída a uma flexão C-H, e a banda a 1513 cm^{-1} é relacionada a extensões aromáticas C = C (Kaparaju e Felby, 2010). Além disso, os alongamentos típicos da lignina C-H são observados em torno de 832 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} . Essas impressões digitais de lignina são claramente observadas no bagaço *in natura* e amostras pré-tratadas com H_2SO_4 , mas estão ausentes nas amostras pré-tratadas com NaOH (Figura 28b), indicando que a lignina foi removida eficientemente. Além disso, não há absorbância a 1728 cm^{-1} após este pré- tratamento alcalino, indicando que as ligações entre hemicelulose e lignina também foram quebradas

Em resumo, H_2SO_4 e NaOH podem efetivamente degradar hemicelulose e romper ou enfraquecer as ligações entre lignina e hemicelulose. No entanto, NaOH pode efetivamente remover a lignina, enquanto H_2SO_4 remove mais hemicelulose.

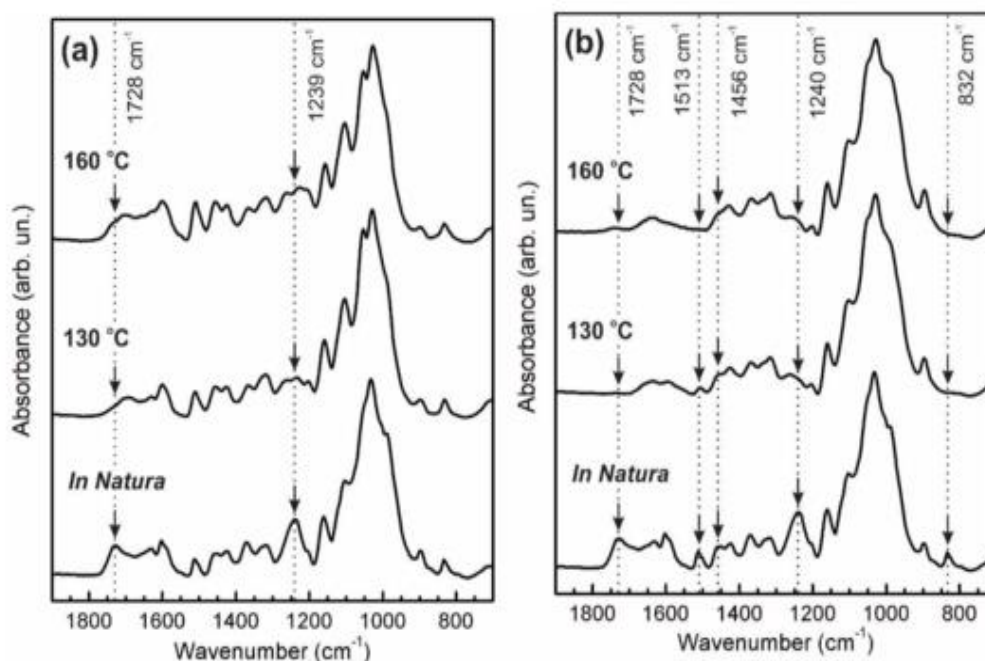


Figura 28: Espectro FTIR do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por 30 min sob processamento de microondas. (a) pré-tratamentos com H_2SO_4 a 130°C e 160°C e (b) pré-tratamentos com NaOH a 130°C e 160°C .

5.2.2. Mudanças estruturais do bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos

O índice de cristalinidade (CrI) é um parâmetro comumente utilizado para quantificar a quantidade de celulose cristalina presente em materiais lignocelulósicos e geralmente é aplicado para avaliar mudanças estruturais após pré-tratamentos termoquímicos (Himmel, 2009). O método mais simples e amplamente utilizado para calcular o CrI a partir de dados DRX foi desenvolvido por (Segal et al., 1959). Este parâmetro é calculado a partir da relação entre a intensidade (altura) do pico (002), onde é feita a subtração da intensidade total do pico (002) com a (I_{amorfo}).

$$\text{CrI} = (I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}.$$

Os perfis de difração de raios-x do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré- tratados com ácido e em meio alcalino assistidos por micro-ondas a temperaturas de 130 ° C e 160 ° C, são mostradas na Figura 29. Todas as amostras apresentaram padrões de difração típicos da celulose I (Park et al., 2010). O CrI do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi de 66,93%. O CrI do bagaço de cana-de-açúcar pré- tratado com ácido a 130 ° C e 160 ° C foi 73,74% e 77,49%, respectivamente. Valores semelhantes foram obtidos para as amostras pré- tratadas com NaOH assistidas por micro-ondas. Os valores do CrI obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar pré- tratado em meio alcalino à temperatura de 130 ° C e 160 ° C foram 75,05% e 73,05%, respectivamente. O aumento do índice de cristalinidade é uma evidência do aumento da fração de celulose devido à remoção de hemicelulose e / ou lignina. Estes resultados mostraram que a temperatura de pré- tratamento não mostrou qualquer efeito significativo no CrI nas amostras, com exceção do tratamento com ácido a 160 ° C.

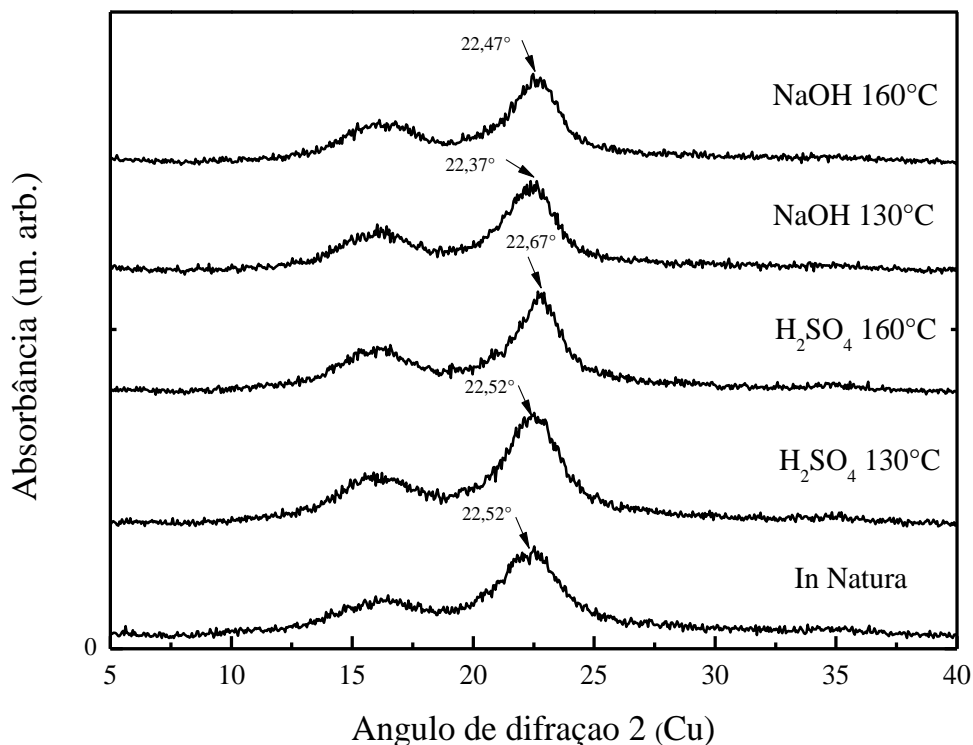


Figura 29: Espectros DRX do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por 30 min sob micro-ondas em processamento. Perfis DRX da amostra de controle (a), amostras pré-tratadas com mw-ácido a 130 ° C e 160 ° C (b e c, respectivamente) e amostras pré-tratadas com mw-álcali a 130 ° C e 160 ° C (d e e, respectivamente).

5.2.3. Características ultra- estruturais e química das paredes celulares.

Os efeitos dos diferentes pré-tratamentos nos tecidos vegetais e paredes celulares em escalas micro e nanométricas foram investigadas usando microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Além disso, a coloração citoquímica foi aplicada para localizar a lignina dentro das paredes celulares. Verificou-se que uma série de manchas citoquímicas foram úteis para detectar e localizar a lignina por MET, incluindo mercúrio, bromo e permanganato de potássio. Neste trabalho, o citrato de chumbo foi utilizado como agente de coloração para melhorar o contraste da imagem.

A Figura 30 exibe imagens representativas do MET e MEV realizadas em substratos *in natura* e pré- tratados secados à temperatura de 160 ° C. Imagens de MET da estrutura seccionada dos substratos pré- tratados a esta temperatura exibiram diferenças significativas em relação ao bagaço de cana-de-açúcar original (Figura 30). As camadas

intercelulares do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* podem ser claramente distinguidas entre lamelas intermediárias (ML), parede celular primária (PW) e parede celular secundária (SW). O canto da célula (CC) também pode ser facilmente identificado (Figura 30a). Como esperado, o maior teor de lignina é localizado no CC seguido pelo ML (Wang et al., 2014). A camada PW consecutiva aparece também opaca ao feixe de elétrons do que a parede secundária, o que é uma evidência direta da maior quantidade de conteúdo de lignina (Figura 30a). A transição entre PW e SW é mais brilhante do que qualquer outra região da parede celular e a camada mais externa (cobertura cerosa) foi claramente mais densa do que a parede secundária interna (Figura 30a).

Dos nossos resultados FTIR, podemos confirmar que o pré-tratamento com ácido sulfúrico com diferentes severidades retiraram a hemicelulose, o que também poderia ter alterado a interação entre celulose e outros componentes da parede secundária, especialmente a lignina. Isso é confirmado pelo fato de que os glóbulos ricos em lignina (até dezenas de nanômetros de diâmetro) foram extraídos para fora através da parede secundária e depositados em camadas ultra-estruturais específicas (Figura 30b). A Figura 30c exibe a organização da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar tratado em meio alcalino, que difere consideravelmente do observado para o pré-tratamento com ácido. A morfologia do bagaço de cana-de-açúcar tratada com solução diluída de NaOH foi mais preservada em termos de sua integridade física. No entanto, um inchaço das paredes secundárias pode ser claramente observado, o que resultou em um notável aumento na espessura da parede. Além disso, a solução alcalina induziu uma redução considerável da lignina através das paredes celulares e a remoção da camada cerosa (Figura 30c). Vários autores descreveram alteração semelhante dos materiais de lignocelulósicos após pré-tratamentos alcalinos (Haque et al., 2012; Hendriks e Zeeman, 2009; Wang et al., 2014).

As Figuras 30d-f fornecem informações sobre a heterogeneidade morfológica através de substratos de cana-de-açúcar. A arquitetura do tecido vegetal dos substratos *in natura* é altamente ordenada, consistindo em fibras de esclerênquima envolvendo os feixes vasculares (Figura 30d). A imagem de MEV do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido mostra que a delaminação de paredes secundárias era suficientemente extensa para quase separar camadas inteiras (Figura 30e). O evento de delaminação pode derivar

da despolimerização de hemiceluloses e deslocalização de lignina (Ji et al., 2016). A partir da imagem de MEV dos substratos tratados com NaOH (Figura 30f), uma orientação helicoidal de microfibrilas de celulose na superfície da parede celular pode ser visualizada na superfície interna das células. Observações semelhantes foram feitas sobre fibras de madeira (Bogolitsyn et al., 2015), sisal e fibras de linho (Bledzki e Gassan, 1999; Sreekala e Thomas, 2003).

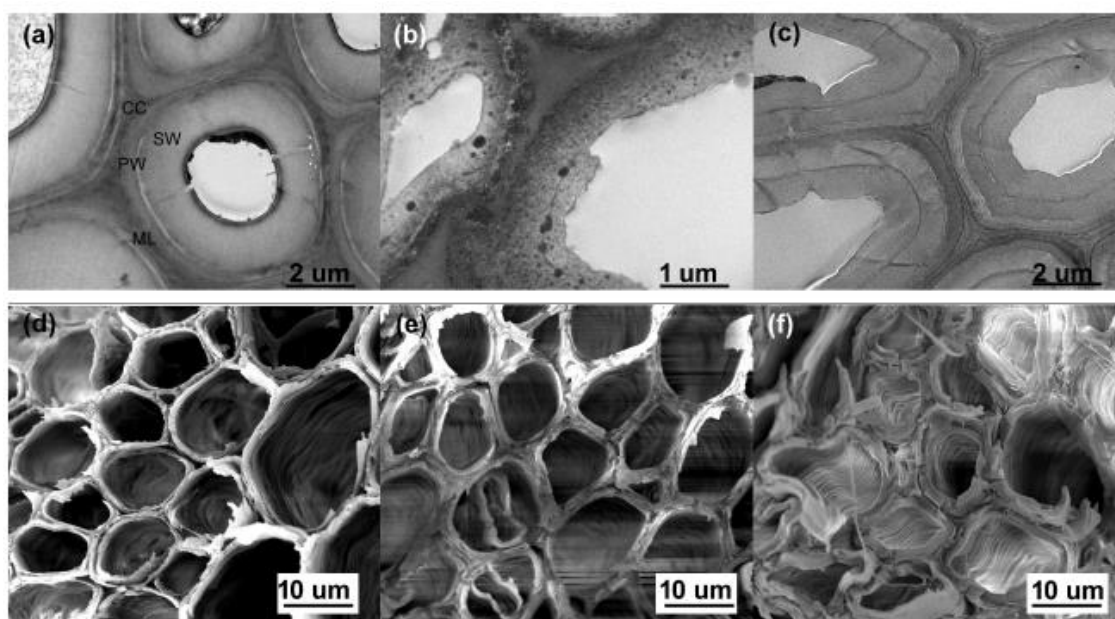


Figura 30: Imagens MET e MEV de células de esclerenquima do bagaço de cana-de-açúcar. Imagens MET da amostra de controle antes do pré-tratamento (a) e amostras pré-tratadas a 160 ° C durante 30 min em H₂SO₄ a 1% (b) e 1% de NaOH (c). Imagens MEV do substrato não tratado (d) e amostras pré-tratadas a 160 ° C durante 30 min em H₂SO₄ a 1% (e) e 1% de NaOH (f). CC: canto celular, ML: lamela média, PW: parede celular primária e SW: parede celular secundária.

5.2.4. Características tridimensionais das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar

A arquitetura de tecido da cana-de-açúcar *in natura* resolvida por tomografia de raios X (TRX) foi comparado com substratos pré- tratados com H₂SO₄ e NaOH. Como as paredes celulares pré- tratadas a 160 ° C não puderam ser devidamente resolvidas pelo TRX (aqui, tamanho de pixel de 7,5 μm), apresentamos apenas os resultados das amostras tratadas com menor severidade de reação (Figura 31). Na visão transversal do volume de cana-de-açúcar *in natura*, os feixes fibrovasculares (vasos envolvidos por fibras) poderiam ser facilmente identificados. As células do parênquima podem ter sido destruídas durante os

processos anteriores de moagem e secagem. Após o tratamento com H_2SO_4 a 130°C , os feixes fibrovasculares foram menos organizados e as células do parênquima exibiram uma forma muito distorcida (Figura 31b). Finalmente, as paredes celulares inchadas das amostras pré-tratadas em meio alcalino foram apenas resolvidas pela TRX. Esses resultados concordam bem com as informações fornecidas pelas técnicas de microscopia eletrônica (Figura 31). Não foram distinguidas características minúsculas, tais como paredes celulares intra e interespaçantes com um tamanho inferior a $\sim 15\ \mu\text{m}$ (isto é, 2 vezes o tamanho do pixel), não puderam ser identificadas.

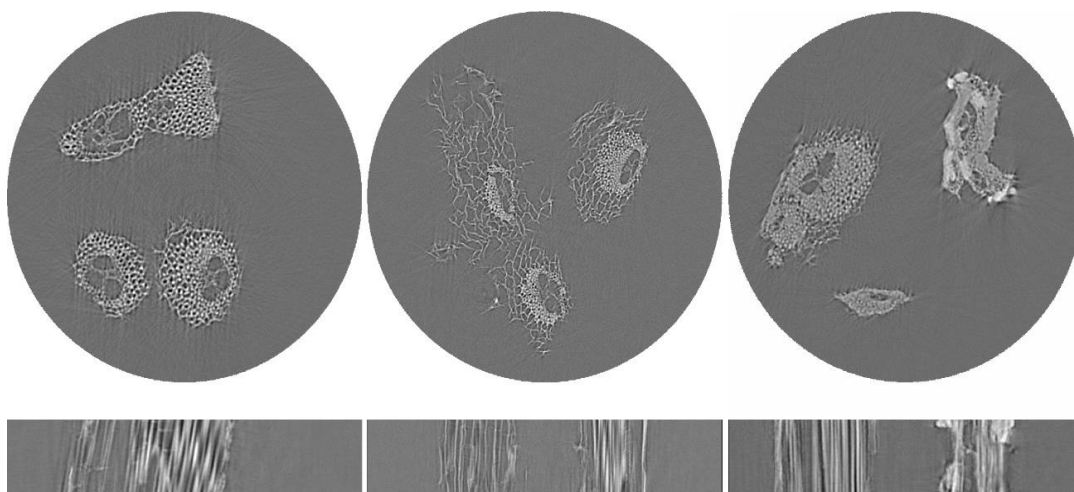


Figura 31: Imagens de tomografia de raios-X de fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar in natura e após pré-tratamentos. Seções transversais e vistas longitudinais geradas a partir dos volumes reconstruídos da amostra de controle (a), amostra pré-tratada com ácido mw a 130°C durante 30 min (b) e amostra pré-tratada com mw-álcali a 130°C durante 30 min (c).

5.2.4.1. Mapeando a distribuição de lignina por imagem de contraste de absorção

Neste trabalho, as capacidades de imagem de contraste de absorção foram estendidas para o mapeamento da distribuição de lignina nos tecidos das plantas. O contraste da imagem revela a distribuição de densidade em massa, que pode ser indiretamente atribuída a mudanças químicas. As regiões mais brilhantes dessas imagens correspondem a domínios ricos em lignina dentro das paredes celulares.

Como esperado, a composição química das plantas é específica do tecido e varia dentro das paredes celulares (Figura 31) (Ji et al., 2016). Para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, o mapeamento espacial da lignina em substratos seccionados exibiu o maior teor de lignina nos cantos celulares no tecido do esclerênquima (Figura 31a). Após o pré-tratamento ácido, uma redução considerável no tamanho dos domínios ricos em lignina e sua quantidade relativa poderia ser notada, sendo este último dependendo do brilho local das imagens (Figura 31b). A Figura 31c mostrou que a remoção da lignina das paredes das células do esclerênquima era bastante considerável após o pré-tratamento em NaOH. Curiosamente, a distribuição da lignina na direção longitudinal das partículas *in natura* e pré-tratada com ácido foi altamente heterogênea, enquanto que era bastante homogênea para o pré-tratado em meio alcalino (Figura 31).

Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão combinados com a coloração utilizando o KMnO_4 mostrada nas Figuras 31a-c reforça esta abordagem inovadora para inferir a distribuição de lignina a partir de imagens de contraste de absorção.

5.2.5. Ultraestrutura macromolecular das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar

Para identificar ainda mais as características arquitetônicas da parede celular que podem contribuir para diferenças na digestibilidade e na acessibilidade das enzimas, usamos a microscopia de força atômica (AFM) para imagens de paredes celulares à escala nanométrica. As imagens de amplitude e fase foram capturadas para apresentar modificações em células de esclerênquima após o pré-tratamento de ácido e pré-tratamento alcalino com diferentes severidades (a 130 ° C e 160 ° C) (Figura 32 e S1). A rugosidade superficial natural das células do esclerênquima foi significativamente diferente das células pré-tratadas e é mais evidente com o aumento da severidade do pré-tratamento. As imagens representativas de AFM das paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas à temperatura de 160 ° C são mostradas na Figura 35, enquanto que as relacionadas aos pré-tratamentos a temperatura mais baixa são encontradas nos Materiais Suplementares.

A imagem AFM do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* indica uma superfície de célula áspera que mascara qualquer característica fibrilar, indicando que o conjunto de microfibrilas de celulose pode ser revestido com os polímeros da matriz (Figuras 32a, b). As fibras pré- tratadas com ácido, no entanto, exibiram uma rede altamente densa de microfibrilas de celulose orientadas em uma direção. A largura média das microfibrilas foi de 100nm (Figuras 32c, d). Além disso, as estruturas globulares de cerca de 100nm de diâmetro foram visualizadas na superfície da parede celular que são características das gotículas de lignina (Bogolitsyn et al., 2015; Donohoe et al., 2008; Ji et al., 2016; Sant'Anna et al., 2013). Curiosamente, a largura média das microfibrilas de celulose da cana-de-açúcar pré- tratada com NaOH foi significativamente menor do que a visualizada após o pré-tratamento com ácido; além disso, microfibrilas menos ordenadas foram observadas (Figuras 32e, f).

Nossos resultados concordam bem com estudos recentes da ultraestrutura macromolecular de substratos pré- tratados com ácido em condições semelhantes (Bogolitsyn et al., 2015; Ji et al., 2016). Mais especificamente, Zubov et al. relataram que a largura das microfibrilas de celulose e o diâmetro das gotículas de lignina na madeira eram entre 20-50 nm e 5-60 nm, respectivamente.

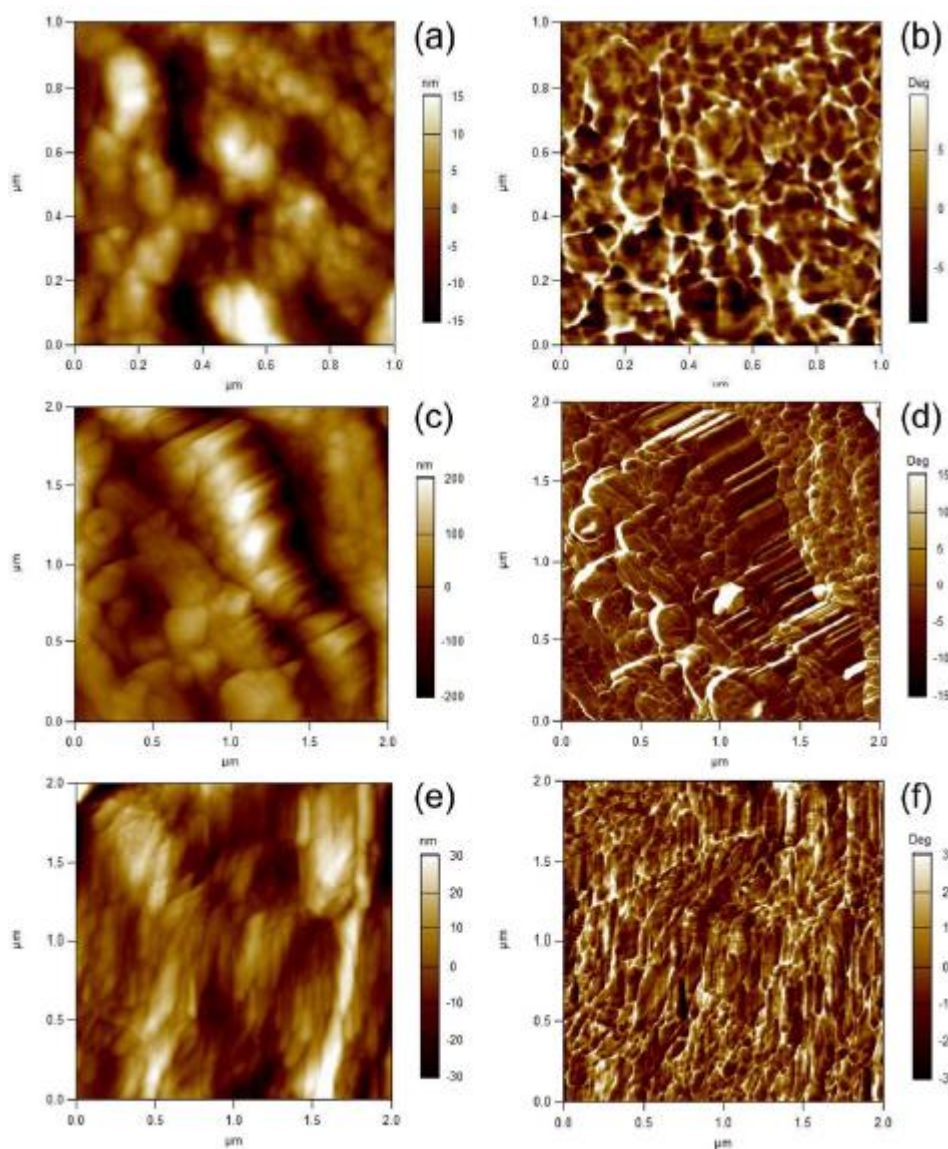


Figura 32: Comparação da ultraestrutura macromolecular das paredes celulares da cana-de-açúcar não tratada e pré-tratada. Imagens de amplitude e fase AFM das cana-de-açúcar pré-tratadas: *in natura* (a e b), ácido (c e d) e alcalino (e e f) à temperatura de 160 ° C durante 30 minutos.

5.2.6. Desconstrução da parede celular de bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamentos

Durante o pré-tratamento ácido assistido com micro-ondas, hemicelulose foi hidrolisada em oligoxilanos, monossacarídeos e outros compostos, resultando em perda de massa de biomassa recuperada. Além disso, parece que a degradação de ligações de polímeros causou a remoção seletiva e deslocalização de lignina em camadas ultraestruturais específicas em paredes secundárias. Lignina poderia migrar dentro da matriz da parede celular, porque a temperatura de pré-tratamento excedeu o seu ponto de fusão (Donohoe

et al., 2008). A redeposição da lignina em zonas de delaminação promoveu o desprendimento parcial ou mesmo total de camadas de parede, aumentando a superfície exposta para enzimas. A questão da acessibilidade da enzima que bloqueia a lignina é, portanto, não apenas restrita à superfície mais externa das paredes celulares, mas também ocorre nas superfícies que foram criadas pelo evento de delaminação. Além disso, as alterações nanoarquitetônicas causadas pelo pré-tratamento ácido mostraram o aumento das microfibrilas de celulose com remoção de hemicelulose. O efeito do afrouxamento das microfibrilas pode contribuir para a acessibilidade da celulose.

Tem sido discutido o efeito das gotículas de lignina na enzima hidrólise. Alguns autores relataram que essas gotículas podem ter um impacto negativo na hidrólise enzimática à medida que atuam como barreira física e ligação não produtiva a enzimas hidrolíticas (Ji et al., 2016, Selig et al., 2007). Pelo contrário, (Pu et al., 2013) sugeriram que o processo de migração, coalescência e deslocalização de lignina provavelmente aumentaria a acessibilidade das microfibrilas de celulose penetradas nas paredes celulares. Nossos resultados apontaram que as gotículas de lignina podem ter um efeito positivo na digestibilidade da biomassa, já que elas se acumulam e redefinem em alguns pontos distribuídos de forma desigual na superfície da parede celular ou dentro das paredes celulares. Mais importante ainda, o que foi revelado foi o efeito combinado da deslocalização de lignina e remoção de hemicelulose que aparentemente abriram dramaticamente não apenas a estrutura da matriz da parede celular, mas também a microfibrila de celulose. Na verdade, esse fenômeno provavelmente explica um mecanismo crítico para a digestibilidade aprimorada da biomassa pré- tratada com ácido diluído (Zhu et al., 2016).

O pré- tratamento alcalino pode facilitar a dissociação inteira das paredes de polímeros, quebrando hidrogênio e ligações covalentes, e a lignina pode ser removida (Himmel, 2009). Aqui, o processo de deslignificação das paredes celulares quebrou ou enfraqueceu a associação de microfibrilas, o que, por sua vez, levou a um inchaço das paredes celulares secundárias. Além disso, as técnicas de caracterização 2D e 3D mostraram que o pré-tratamento alcalino com micro-ondas poderia remover completamente a lignina das paredes celulares (isto é, na direção radial e longitudinal das fibras). A remoção completa

da camada cerosa altamente lignificada revelou mesmo a estrutura de celulose microfibrilada penetrada nas paredes celulares. No entanto, observou-se um menor impacto na organização geral das microfibrilas de celulose. A largura das microfibrilas de celulose foi praticamente metade do observado para as fibras pré- tratadas com ácido. Ao distinguir as múltiplas mudanças ocorridas simultaneamente durante os tratamentos alcalinos, os principais fatores que afetam o desempenho da liberação de açúcar podem ser primários devido à remoção de lignina com subsequente afrouxamento das paredes celulares e exposição a microfibrilas de celulose. A cristalinidade da celulose em substratos pré- tratados alcalinos pode não ser tão relevante para a degradabilidade enzimática dos materiais lignocelulósicos.

5.2.7. Ultraestrutura macromolecular de paredes celulares

A exploração da biomassa lignocelulósica é dificultada pela nossa ignorância da base molecular para suas propriedades, tais como força e digestibilidade (Simmons et al., 2016). Sabe-se que as fibras consistem principalmente de microfibrilas de celulose em uma matriz de hemicelulose entrelaçada e lignina chamada complexo de lignina-carboidrato (LCC) (Fernandes et al., 2011; Wegst et al., 2014; Zou et al., 2009). A natureza dessa interação ainda não está clara, apesar da sua importância. Aqui, fornecemos a primeira prova direta do papel da hemicelulose e da lignina na montagem de microfibrilas de celulose.

Nossos resultados mostraram que a largura das microfibrilas de celulose foi ampliada aparentemente com a redução do teor de hemicelulose, enquanto as microfibrilas foram relativamente mais rígidas no bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, paredes secundárias foram alargadas com a remoção de lignina resultando em um aumento na espessura da parede celular. Com base nisso, parece que a hemicelulose em vez da lignina pode ser a principal responsável por resistir ao alargamento do espaçamento entre as microfibrilas, um fator-chave das paredes celulares da planta para controlar a sua taxa de crescimento (Simmons et al., 2016).

Além disso, levantamos a hipótese de que a hemicelulose é responsável pela rigidez do complexo lignina-carboidrato que envolve microfibrilas de celulose, mantendo cada microfibrila no lugar; e a lignina exibe maior adesão às microfibrilas de celulose, fornecendo suporte rígido à montagem de microfibrilas, atuando como "cola". Este confirma com o modelo recente de origem molecular de força e rigidez em materiais lignocelulósicos propostos por (Youssefian e Rahbar, 2015). Eles utilizaram técnicas de dinâmica molecular para elucidar a estrutura, as propriedades termodinâmicas e mecânicas e as interações dos materiais de fibra de bambu. Relataram que a superioridade das propriedades mecânicas da hemicelulose é devido ao grande número de grupos hidroxilo, que aumenta a densidade de energia da ligação de hidrogênio. A adesão forte de lignina às microfibrilas de celulose vem essencialmente das grandes energias Van der Waals entre lignina e celulose (Youssefian e Rahbar, 2015). Essas observações contribuem para uma melhor compreensão da natureza das interações entre os componentes da parede celular, que é a base da recalcitância da planta na digestibilidade e na desconstrução.

6. CONCLUSÕES

Relatamos uma descrição 3D e quantitativa das mudanças em arquitetura de tecido pré-tratada de partículas de bagaço de cana-de-açúcar. As características em massa e superficial das partículas de bagaço de cana-de-açúcar in natura e tratada em meio alcalino foram avaliadas por tomografia de contraste de fase usando radiação síncrotron. As técnicas de processamento de imagem e processamento forneceram informações sobre a superfície de lúmens celulares individuais, mapas de espessuras de paredes celulares e a área de superfície específica interna e externa de partículas. Tais parâmetros são relevantes para uma compreensão mais profunda da desconstrução da biomassa lignocelulósica para açúcares fermentáveis por meios termoquímicos.

As análises quantitativas revelaram que a superfície externa individual da fibra de bagaço *in natura* tem uma pequena contribuição para avaliar a área superficial disponível a um nível micrométrico para as enzimas. No entanto, após o pré-tratamento com NaOH em condições de operação suave (1% de NaOH a 120 ° C durante 40 min), a área de superfície da fibra aumenta 9,2 vezes, enquanto a quantidade total de áreas internas da superfície dos poros apenas duplica o valor. Esse aumento dramático da superfície externa resultou da fragmentação das partículas especificamente no tecido do parênquima, tornando os feixes fibrovasculares livres e independentes.

As mudanças morfológicas na arquitetura do tecido de fibras de bagaço de cana-de-açúcar também são reveladas. A área superficial de poros individuais das fibras de bagaço *in natura* e pré- tratada apresentaram distribuição bimodal. No entanto, o pré-tratamento alcalino induz a aparência de poros internos maiores devido à fusão de células vizinhas. Além disso, a distribuição das espessuras da parede celular mostrou que as paredes celulares foram significativamente diluídas pela solução de NaOH, levando eventualmente à ruptura nas regiões locais.

Na segunda parte dos estudos, concluímos que as plantas desenvolveram estratégias bioquímicas complexas sustentadas por uma rígida, parede celular recalcitrante para o contra-ataque por fungos e microrganismos. Apesar dos extensos estudos bioquímicos que foram realizados para desvendar a estrutura e a função das paredes celulares, houve poucos estudos de imagem e modelagem em várias escalas para complementar esse esforço. Relatamos a primeira abordagem multimodal da imagem e caracterizamos as paredes celulares do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois do pré-tratamento termoquímico assistido por microondas (solução diluída de H₂SO₄ e NaOH). Os resultados mostraram que os dois pré-tratamentos termoquímicos degradaram a hemicelulose e quebraram / diminuíram as ligações hemicelulose-lignina. Estes resultados mostraram que o NaOH foi mais eficaz para a remoção de lignina, enquanto o H₂SO₄ remove mais hemicelulose.

A partir de uma abordagem integrada, os mecanismos subjacentes da desconstrução da parede celular da planta por pré-tratamentos foram esclarecidos. Primeiramente, a degradação da hemicelulose pelo pré-tratamento ácido causou a remoção seletiva e deslocalização de lignina em camadas ultraestruturais específicas em paredes secundárias, resultando em um desprendimento parcial ou total de camadas de parede. Nossos resultados apontaram que as gotículas de lignina podem ter um efeito positivo na digestibilidade da biomassa, já que elas se acumulam e redefinem em alguns pontos distribuídos de forma desigual na superfície da parede celular ou dentro das paredes celulares. Além disso, as mudanças nano-arquitetônicas avaliadas pelo AFM forneceram evidências claras do aumento visível das microfibrilas de celulose.

Os mecanismos de desconstrução da parede celular por pré-tratamento alcalino assistidos por micro-ondas foram bastante diferentes dos observados para os tratamentos com ácido. O processo de deslignificação das paredes celulares enfraqueceu a montagem das microfibrilas, levando a um inchaço das paredes celulares secundárias. O pré-tratamento com NaOH poderia remover completamente a lignina das paredes celulares (isto é, na direção radial e longitudinal das fibras). Quando comparado com a largura das microfibrilas no bagaço de cana-de-açúcar tratado com ácido, um menor impacto na organização geral das microfibrilas de celulose foi observada. Estes mecanismos explicam a maior digestibilidade da biomassa pré- tratada com ácido diluído.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas têm desenvolvido estratégias bioquímicas complexas de modo a proteger suas estruturas celulares contra ataques de fungos e bactérias. Apesar dos esforços realizados para se entender o papel e os mecanismos associados aos diferentes tecidos e estruturas das paredes celulares, poucos trabalhos tem se dedicado ao estudo e modelamento por técnicas de imagem em diferentes escalas dimensionais. Neste trabalho, foi realizada uma análise multi-dimensional, por técnicas de imagem e de caracterização físico-química, das estruturas celulares de bagaço de cana de açúcar, antes e após tratamentos termoquímicos assistidos por micro-ondas em meio ácido (H_2SO_4) e básico (NaOH). Os resultados mostram que ambos os pré- tratamentos degradam a hemicelulose e quebram (ou enfraquecem) ligações e interações hemicelulose-lignina. Entretanto, NaOH se mostra mais eficiente para a remoção de lignina, enquanto H_2SO_4 remove mais eficientemente a hemicelulose. A partir do uso combinado das diferentes técnicas de caracterização empregadas (FTIR, XRD, AFM, SEM, TEM e XRT) os mecanismos de desconstrução das paredes celulares foram evidenciados. Inicialmente, a degradação da hemicelulose pelo tratamento ácido levou a uma remoção seletiva e realocação da lignina em camadas ultraestruturais específicas dentro das paredes secundárias, resultando em uma separação total ou parcial das camadas nas paredes. Nossos resultados indicam a formação de gotas de lignina condensadas e distribuídas de maneira polidispersa na superfície e no interior das paredes celulares. Análises obtidas por AFM sugerem mudanças na nanoarquitetura celular, com evidências claras de uma dilatação das microfibrilas de celulose. Estes mecanismos podem ajudar a explicar o aumento na capacidade de digestão de amostras de biomassa tratadas em meio ácido.

Os mecanismos de desconstrução da parede celular pelo tratamento alcalino em micro-ondas foram significativamente diferentes dos observados em meio ácido. O processo de deslignificação das paredes celulares enfraquece o arranjo, ou organização, das microfibrilas, levando a uma expansão significativa das paredes celulares secundárias nas fibras de esclerênquima. O tratamento com NaOH promove a remoção de lignina das paredes celulares em ambas as direções radial e longitudinal das fibras.

Neste estudo, a tomografia de raios X se apresentou como uma ferramenta complementar às técnicas de caracterização de materiais convencionais, fornecendo informações novas e relevantes sobre a arquitetura celular de biomassa lignocelulósica, bem como de suas características recalcitrantes à degradação causada por pré-tratamentos termoquímicos. Mais particularmente, a tomografia de contraste de fase (com resolução sub-micrométrica) possibilitou a realização de análises 3D e quantitativas das alterações morfológicas que ocorrem nos tecidos vegetais de plantas. Características *bulk* e superficiais de substratos não-tratadas e tratados puderam ser obtidas com sucesso. Além disto, informações sobre a área superficial de poros individuais, mapas da espessura da parede celular e área superficial específica externa e interna foram obtidas. Essas variáveis são relevantes para uma maior compreensão do processo de degradação da biomassa por meios termoquímicos.

Com o objetivo de se estudar os mecanismos de decomposição da biomassa em função de pré-tratamentos termoquímicos assistidos por micro-ondas, foram escolhidos dois métodos amplamente utilizados: (i) solução diluída de H₂SO₄ e (ii) solução diluída de NaOH, para duas temperaturas distintas (130°C e 160°C), com duração de 30 min.

A primeira etapa trata-se de uma avaliação preliminar do uso da técnica de tomografia de raios X associada ao processamento de imagens, para a obtenção de informações tridimensionais (3D) sobre as características recalcitrantes de substratos. Neste estudo exploratório, o bagaço de cana-de-açúcar foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio com aquecimento convencional.

A segunda etapa consistiu na caracterização das alterações estruturais e químicas das paredes celulares do bagaço de cana de açúcar causadas por pré-tratamentos termoquímicos assistidos por radiação micro-ondas. Para isso, foi utilizada uma abordagem sistemática, multimodal e integrada, cobrindo uma ampla escala de tamanhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv*, v.29, p675–685, 2011.

Arantes, V., Saddler, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechn Biofuels*, v.4, p3, 2011.

Assumpção, S.M.N. Pré-tratamento químico combinado do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Bahia, p31, 2015.

Bledzki, A.K., Gassan, J., 1999. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog. Polym. Sci.* 24, 221–274. doi:10.1016/S0079-6700(98)00018-5

Bogolitsyn, K.G., Zubov, I.N., Gusakova, M.A., Chukhchin, D.G., Krasikova, A.A., 2015. Juniper wood structure under the microscope. *Planta* 241, 1231–1239. doi:10.1007/s00425-015-2252-1

Boonmanumsin, P., Treeboobpha, S., Jeamjumnunja, K., Luengnaruemitchai, A., Chaisuwan, T., Wongkasemjit, S., 2012. Release of monomeric sugars from *Miscanthus sinensis* by microwave-assisted ammonia and phosphoric acid treatments. *Bioresour. Technol.* 103, 425–431. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.136

Brienzo, M., Siqueira, A.F., Milagres, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, v46, p199-204, 2009.

Chandel, A.K., Antunes, F.A.F., Anjos, V., Bell, M.J.V., Rodrigues, L.N. et al. Multiscale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biof*, v.7, p63, 2014.

Chang, V.S., Holtzapple, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *App Bioch Biotech*, v.84-86, p5-37, 2000.

Chen, W.H., Tu, Y.J., Sheen, H.K., 2011. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Appl. Energy* 88, 2726–2734. doi:10.1016/j.apenergy.2011.02.027

Chen, W.H., Ye, S.C., Sheen, H.K., 2012. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Appl. Energy* 93, 237–244. doi:10.1016/j.apenergy.2011.12.014

Chundawat, S.P.S., Donohoe, B.S., da Costa, S.L., Elder, T., Agarwal, U.P., Lu, F., et al. Multiscale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall

deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energ Environ Sci*, v4. p973-84, 2011.

Converse, A.O., Ware, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. IEA/Biofor – workshop on applications of biotechnology in bioenergy systems, 1997.

DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H., Hahn, M.G., Wyman, C.E. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ Sci*, v.6, p898-909, 2013.

Ding, S.-Y., Liu, Y.-S., Zeng, Y., Himmel, M.E., Baker, J.O., Bayer, E.A. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science*, v.388, p1055-59, 2012.

Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 913–925. doi:10.1002/bit.21959

Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J., Jarvis, M.C., 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1195–E1203. doi:10.1073/pnas.1108942108

FTA. ThermoWood ® Handbook. Finland, Finnish Thermowood Association, 2003.

Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalho, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol. A review. *Bioresource Technology*, v101, p4775-4800, 2010.

GranBio. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/>. Acesso em 11 de abril de 2017.

Haque, M.A., Barman, D.N., Kang, T.H., Kim, M.K., Kim, J., Kim, H., Yun, H.D., 2012. Effect of dilute alkali on structural features and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare*) at boiling temperature with low residence time. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1681–1691. doi:10.4014/jmb.1206.06058

Herrman, P.S.P., Silva, M.A.P., Bernardes, R., Job.A.E., Colnago, L.A., E. Jane., Mattosos, L.H.C. Microscopia de Varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. Universidade Federal de São Carlos, p51-61, 1997.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027

Himmel ME and Picataggio SK, Our challenge is to acquire deeper understanding of biomass recalcitrance and conversion, in *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, ed by Himmel ME. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 1–6 (2008).

Himmel, M.E. Biomass conversion, methods and protocols. Golden, CO, USA: Humana Press: Biosciences Center, National Renewable Energy Laboratory, 2012.

Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v.315, p804-807, 2007.

Himmel, M.E., 2009. Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy, Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. doi:10.1002/9781444305418

Holopainen-Mantila, U., Marjamaa, K., Merali, Z., Käsper, A., de Bot, P., Jääskeläinen, A.-S., Waldron, K., Kruus, K., Tamminen, T. Impact of hydrothermal pre-treatment to chemical composition, enzymatic digestibility and spatial distribution of cell wall polymers. *Bioresource Technol*, v138, p156-62, 2013.

Hu, Z.H., Wen, Z.Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochem Eng I*, v.38, p369-78, 2008.

Isaac, A., Barboza, V., Sket, F.I., D'Almeida, J.R.M., Montoro, L.A., Hilger, A., Manke, I. Towards a deeper understanding of structural biomass recalcitrance using phase-contrast tomography. *Biotechnol Biofuels*, v.8, p40-7, 2015.

Ji, Z., Zhang, X., Ling, Z., Zhou, X., Ramaswamy, X.F. Visualization of *Miscanthus x giganteus* cell wall deconstruction subjected to dilute acid pretreatment for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels*, v.8, p103, 2015.

Ji, Z., Zhang, X., Ling, Z., Sun, R.-C., Xu, F., 2016. Tissue specific response of *Miscanthus x giganteus* to dilute acid pretreatment for enhancing cellulose digestibility. *Carbohydr. Polym.* 154, p247–256. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.086

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

Joly, A.B. *Botânica: Introdução a taxonomia vegetal*. 13. Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. p.777 .

Kaparaju, P., Felby, C., 2010. Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre-treatment processes of wheat straw and corn stover. *Bioresour. Technol.* 101, p3175–3181. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.008

Katon, J.E. Infrared microspectroscopy - A review of fundamentals and applications. *Micron*, v.27, n.5, p303-314, 1996.

Kim, I.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bior Tech*, v.199, p.42-48, 2016.

Klemm, D., Phipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W. *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods*. v.1, Weinheim, Wiley VCH, 1998.

Krässig, H., Schurz, J., Steadman, R.G., Schliefer, K., Albrecht, W., Mohring, M., Schlosser, H. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Wiley VCH, 2004.

Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.*, v.100, p3948-3962, 2009.

Lee, I., Evans, B.R., Foston, M., Ragauskas, A.J. Silicon cantilever functionalization for cellulose-specific chemical force imaging of switchgrass. *Anal Methods*, v.7, p4541, 2015.

Li, C., Cheng, G., Balan, V., Kent, M.S., Ong, M., Chundawat, S.P.S., Sousa, L. da Costa, Melnichenko, Y.B., Dale, B.E., Simmons, B.A., Singh, S., 2011. Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 102, 6928–6936. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.005

Liu, C.F., Xu, F., Sun, J.X., Ren, J.L., Curling, S., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2006. Physicochemical characterization of cellulose from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). *Carbohydr. Res.* 341, 2677–2687. doi:10.1016/j.carres.2006.07.008

Ma, J., Zhang, X., Zhou, X., Xu, F. Revealing the changes in topochemical characteristics of poplar cell wall during hydrothermal pretreatment. *Bioenerg Res*, v.7, p1358-68, 2014.

Maliska, A.M. *Microscopia eletrônica de varredura e microanálise*. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, p7-9, 2013.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Ministério da Agricultura. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em 15 de novembro de 2015.

Mohnen, D., Bar-Peled, M., Somerville C. Cell wall polysaccharide synthesis, in *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, ed by Himmel ME. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 94–159 (2008).

Medina, K.J.D. Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregado as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena, p36-51, 2013.

Miranda, J. R. História da cana-de-açúcar. Campinas: Komedi, p167, 2008.

Momose, A. Recent advances in X-ray phase imaging. *Jpn J App Phy*, v.44, n.9A, p6355-67, 2005.

Moraes, E.J.C. Estudo da viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, p157, 2008.

Nascimento, V.M. Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, p41, 2011.

Odisi, E.J. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio adicionado de álcali ou cinzas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, p115, 20.

Oshima, H., Aso, K., Harano, Y. Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Lett*, v.5, p289-94, 1984.

Paës, G. Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction: a review. *Molecules*, v.19, n.9380-9402, 2014.

Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels* 3, 10. doi:10.1186/1754-6834-3-10

Paturau J.M. *By-Products of Sugar Cane Industry*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, 1989.

Pfeiffer, F., Weitkamp, T., Bunk, O., David, C. Phase retrieval and differential phase-contrast imaging with low-brilliance X-ray sources. *Nature Physics*, v.2, n.4, p258–261, 2006.

Philippini, R.R. Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, p17-27, 2012.

Quilhó, L.F.T.L., Produção de Bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos de sorgo sacarino. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

Rabelo, S.C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, p20-25, 2010.

Raízen. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em 11 de abril de 2017.

Reddy, R.K., Walsh, M.J., Schulmerich, M.V., Carney, P.S. e Bhargava, R. High-definition infrared spectroscopy imaging. *Appl Spectrosc*, v.67, n.1, p93–105, 2013.

Reddy, N., Yang, Y. Biofibers from agricultural by products for industrial applications. *Trends Biotechnology*, v23, p22-27, 2005.

Rodet, T., Noo, F., Defrise, M., 2004. The cone-beam algorithm of Feldkamp, Davis, and Kress preserves oblique line integrals. *Med. Phys.* 31, 1972–1975. doi:10.1118/1.1759828

Rosa, A.T. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e microanálise com raios-x e filmes dielétricos crescidos termicamente sobre carvão de silício. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p11-12, 2008.

Sant’Anna, C., Costa, L.T., Abud, Y., Biancatto, L., Miguens, F.C., de Souza, W., 2013. Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 76, 829–834. doi:10.1002/jemt.22235

Santos, F.A. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, vol.35, p1004-1010, 2012.

Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794. doi:10.1177/004051755902901003

Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.* 23, 1333– 1339. doi:10.1021/bp0702018

Sreekala, M.S., Thomas, S., 2003. Effect of fibre surface modification on water-sorption characteristics of oil palm fibres. *Compos. Sci. Technol.* 63, 861–869. doi:10.1016/S0266-3538(02)00270-1

Schlittler, L.A.F.S. Engenharia de um Bioprocesso para a Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil, 2006.

Silva, V.F.N. Estudos de Pré- tratamento e Sacarificação Enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, p116, 2009.

Silveira, A. L. S., Milagres, A. M. F. Obtenção e caracterização de ligninas de madeira. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, MG, 2009.

Simmons, T.J., Mortimer, J.C., Bernardinelli, O.D., Pöppler, A.-C., Brown, S.P., de Azevedo, E.R., Dupree, R., Dupree, P., 2016. Folding of xylan onto cellulose fibrils in

plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* 7, 13902. doi:10.1038/ncomms13902

Sun, Y., Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v83, n1, p1-11, 2002.

Taherzadeh, M.J. e Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int J Mol Sci*, v.9, n.9, p1621-1651, 2008.

União da Agroindústria Cabavieira de São Paulo – UNICA. Perfil da produção. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/40728229920343585770/inaugurada-na-italia-a-primeira-usina-comercial-de-etanol-celulosico-do-mundo/>. Acesso em 12 de abril de 2017.

Vidal, W.M., Vidal, M.R.R. Botânica – organografia; quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas. Viçosa: UFV Ed.; 2003. 124p.

Wyman, C. E.; Decker, S. R.; Himmel, M. E.; Brady, J. W.; Skopec, C. E.; Viikari, L. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Dumitriu, S., Dekker Ed.; New York, 2005, cap. 43.

Wang, W., Chen, X., Donohoe, B.S., Ciesielski, P.N., Katahira, R., Kuhn, E.M., Kafle, K., Lee, C.M., Park, S., Kim, S.H., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Johnson, D.K., 2014. Effect of mechanical disruption on the effectiveness of three reactors used for dilute acid pretreatment of corn stover Part 2: morphological and structural substrate analysis. *Biotechnol. Biofuels* 7, 47. doi:10.1186/1754-6834-7-57

Weng, J.K., Li, X., Bonawitz, N.D., Chapple, C. Emerging strategies og lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, p166–172. doi:10.1038/nmat4089

Wegst, U.G.K., Bai, H., Saiz, E., Tomsia, A.P., Ritchie, R.O., 2014. Bioinspired structural materials. *Nat. Mater.* 14, 23–36, 2008. doi: 10.1016/j.copbio.2008.02.014

Wood, T.M., Saddler, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in Enzymology*, v.160, p3-11, 1988.

Workman, Jr. J. e Weyer, L. Jerry Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy. 2^a Edição, CRC Press Inc, 2012.

Zeng, Y., Zhao, S., Wei, H., Tucker, M.P., Ding, S.-Y. et al. In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid. *Biotechnol Biofuels*, v.8, p126, 2015.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, v.88, p797-824, 2004.

Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z.N. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*, v.40, p3082-6, 2005.

Zhu, Z., Rezende, C.A., Simister, R., McQueen-Mason, S.J., Macquarrie, D.J., Polikarpov, I., Gomez, L.D., 2016. Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 93, 269–278. doi:10.1016/j.biombioe.2016.06.017

Zou, L., Jin, H., Lu, W.-Y., Li, X., 2009. Nanoscale structural and mechanical characterization of the cell wall of bamboo fibers. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 1375–1379. doi:10.1016/j.msec.2008.11.007

Young, R.A. *The Rietveld Method*. International Union of Crystallography Monographys on Crystallography, ed. Oxford Science Publications. 1995 n.5, p5-38,1995.

Youssefian, S., Rahbar, N., 2015. Molecular Origin of Strength and Stiffness in Bamboo Fibrils. *Sci. Rep.* 5, 11116. doi:10.1038/srep11116