UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALEXANDER PAULO DA ROCHA

**Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico
durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**

Pirassununga

2019

ALEXANDER PAULO DA ROCHA

**Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico
durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais voltados à agroindústria.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin.

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P672e Paulo da Rocha, Alexander
Estudo do efeito da presença de espécies
derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento
alcalino na sacarificação de palha de soja /
Alexander Paulo da Rocha ; orientador Fernando
Gustavo Tonin. -- Pirassununga, 2019.
117 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

1. Etanol de segunda geração.. 2. Deslignificação.
. 3. Lignocelulose.. 4. Hidrólise enzimática.. 5.
Celulose.. I. Gustavo Tonin, Fernando, orient. II.
Título.

ALEXANDER PAULO DA ROCHA

Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais voltados à agroindústria.

Data de aprovação: 15/03/2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin_____

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ Dep. De Engenharia de Biossistemas_____

Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Delia Rita Tapia Blácido_____

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/Dep. de Química_____

Profa. Dra. Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone_____

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ Dep. De Engenharia de Biossistemas_____

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke_____

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Dep. de Química_____

Dedico esse trabalho ao bom Deus por me capacitar e me ajudar nesta difícil tarefa e minha mãe Conceição Aparecida de Paulo por ser meu pilar de sustentação nos meus piores momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, saúde e intelecto para enfrentar cada desafio e obstáculo posto na minha vida.

A minha mãe Conceição e Pai Paulo Fernando pelo amor incondicional que recebi, por estar ao meu lado me auxiliando em cada necessidade durante esse trabalho. A meus irmãos Raíssa e Eduardo por compor a minha família sendo minha base e minha estrutura, por cada palavra de otimismo.

A minha namorada Joseliene pelo amor dedicado a mim, por entender a necessidade de passar por esse processo junto comigo, por nunca ter me abandonado durante esses anos e por ser minha principal fonte de inspiração.

A todos meus amigos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA-USP) por me alegraram durante esses anos, com uma conversa ou uma palavra amiga, em especial a Daniel Antonelo por ser mais que um irmão e Rafael Filomeno pelos conselhos científicos.

Ao meu orientador Prof.Dr. Fernando Gustavo Tonin, por compartilhar comigo o seu conhecimento, pelos anos de convivência e pela paciência diante das minhas limitações.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia, por ceder espaço físico, estrutura e por fornecer profissionais capacitados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro sem o qual esse trabalho não seria realizado.

Agradeço a todos que ajudaram na confecção desse trabalho de forma direta ou indireta.

Com a força que Cristo me dá, posso enfrentar qualquer situação.

Apostolo Paulo (FELIPENSES – 4; 13).

RESUMO

ROCHA, A. P. **Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**. 2019. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Dentre as etapas de produção do etanol de segunda geração tem-se no pré-tratamento da biomassa um dos pontos cruciais, uma vez que a eficiência deste processo está diretamente ligada à maior produção de monossacarídeos fermentáveis após hidrólise e consequentemente maior produtividade de etanol. Dentro deste contexto, no presente trabalho estudou-se o efeito da presença de espécies químicas derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino de palha de soja (matéria-prima abundante no Brasil e ainda inexplorada), visando uma solubilização mais seletiva da lignina em condições brandas, onde a recuperação de carboidratos possa ser superior. Numa primeira etapa estudou-se através de metodologia de superfície de resposta (planejamento composto central) o efeito da concentração inicial de ácido bórico (0,06 a 0,49 mol/l), pH (9,27 a 13,00) e tempo de pré-tratamento (80 min a 280 min) na porcentagem de solubilização da biomassa e recuperação de carboidratos (glicose e xilose) após hidrólise enzimática – experimentos foram conduzidos em temperatura de refluxo. Os resultados mostraram que o tempo não tem efeito significativo dentro do intervalo estudado, e que as superfícies de resposta da porcentagem de solubilização e recuperação de monossacarídeos possuem comportamentos distintos. A máxima recuperação de monossacarídeos pode ser obtida teoricamente utilizando-se 0,33 mol/l de ácido bórico com tendência crescente da resposta conforme se aumenta o pH do meio, enquanto a porcentagem de solubilização indica um crescimento contínuo conforme se aumentam concomitantemente a concentração de ácido bórico e pH. Na melhor condição testada foram obtidos rendimentos de monossacarídeos superiores em 181,2% (glicose) e 507,8% (xilose) com relação à biomassa não tratada. Numa segunda etapa estudou-se comparativamente o pré-tratamento em três valores de pH diferentes (9,27, 11,10 e 13,00) na presença (0,28 mol/l) e ausência de ácido bórico inicial, constatando-se que em todas as condições onde existiam espécies derivadas do ácido bórico (comparadas para um mesmo pH) foram obtidos maiores valores de recuperação de monossacarídeos. Resultados obtidos pelas técnicas de FTIR, TG/DTG, MEV e DRX comprovaram a maior deslignificação em condições onde se tinha ácido bórico inicial presente. Pode-se concluir que a presença de espécies químicas derivadas do ácido bórico (pKa aproximadamente 9,27) em meio alcalino promovem uma maior deslignificação do material lignocelulósico, e que tal comportamento se deve provavelmente à complexação de íons borato (principal íon presente em soluções alcalinas) aos grupos fenólicos da lignina, promovendo desta

forma uma maior solubilização e/ou impedindo que fragmentos obtidos da degradação desta se repolimerizem e se depositem novamente sobre a biomassa.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração. Deslignificação. Lignocelulose. Hidrólise enzimática. Celulose. Hemicelulose.

ABSTRACT

ROCHA, A. P. **Study of the effect of the presence of species derived from boric acid during alkaline pretreatment in the saccharification of soybean straw.** 2019. 117 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2019.

Among the second-generation ethanol production stages, one of the crucial points is the biomass pretreatment since its efficiency is directly linked to the higher production of fermentable monosaccharides after hydrolysis and consequently higher ethanol productivity. In this context, the effect of the presence of boric acid-based chemical species during alkaline pretreatment of soybean straw (a raw material abundant in Brazil and still unexplored) was studied, aiming at a more selective solubilization of lignin in soft conditions, where cellulose and hemicellulose recoveries may be higher. In a first step, the effects of the initial concentration of boric acid (0,06 to 0,49 mol / l), pH (9,27 to 13,00) and pretreatment time (80 min to 280 min) were studied through response surface methodology (central composite design) considering as responses the percentage of biomass solubilization and recovery of monosaccharides (glucose and xylose) after enzymatic hydrolysis - pretreatment experiments were conducted at reflux temperature. The results showed that the time has no significant effect within the range studied, and that the response surfaces of the solubilization and recovery percentage of monosaccharides have different behaviors. The maximum recovery of monosaccharides can be theoretically obtained using 0.33 mol/l of boric acid with increasing tendency as the pH of the medium is increased, while the percentage of solubilization indicates a continuous growth as the boric acid concentration and pH concomitantly increases. In the best tested condition, yields of monosaccharides with 181.2% (glucose) and 507.8% (xylose) were obtained in relation to the crude biomass. In a second step, the pretreatment was studied in three different pH values (9,27, 11,10 and 13,00) in the presence (0,28 mol / l) and absence of boric acid, being verified that in all conditions where boric acid had been added (compared to the same pH) there was a greater recovery of monosaccharides. Results obtained by FTIR, TG / DTG, SEM and XRD showed higher delignification under conditions where boric acid was present. It can be concluded that the presence of boric acid-derived chemical species (pKa approximately 9,27) in alkaline media promotes a greater delignification of the lignocellulosic material, and that this behavior is probably due to the complexation of borate ions (main ion present in alkaline solutions) to the phenolic groups of the lignin, promoting in this way a greater solubilization and / or preventing fragments of this one from being repolymerized and deposited again on the biomass.

Keywords: Second generation ethanol. Delignification. Lignocellulose. Enzymatic hydrolysis. Cellulose. Hemicellulose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BIORREFINARIA – PRODUTOS QUE PODEM SER GERADOS A PARTIR DA CELULOSE.	31
FIGURA 2 - BIORREFINARIA – PRODUTOS QUE PODEM SER GERADOS A PARTIR DA HEMICELULOSE.....	32
FIGURA 3 - BIORREFINARIA – PRODUTOS QUE PODEM SER GERADOS A PARTIR DA LIGNINA.	33
FIGURA 4 - PAREDE CELULAR DE UM MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E A RELAÇÃO DA LIGNINA, CELULOSE E HEMICELULOSE NA PAREDE SECUNDÁRIA. DIÂMETRO DA CÉLULA DE APROXIMADAMENTE 25 μ M.	34
FIGURA 5 - MOLÉCULA DE CELULOSE.....	36
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA LIGNOCELULOSE E SEUS COMPONENTES MICROFIBRILA DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA.....	37
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MICROFIBRILA DE CELULOSE, DESTACANDO REGIÃO CRISTALINA E REGIÃO AMORFA.....	37
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA HEMICELULOSE: (1) B-D-XILOSE; (2) D-ARABINOPIRANOSE; (3) A-L-ARABINOFURANOSE; (4) B-D-GLUCOSE; (5) B-D-MANOSE; (6) A-D-GALACTOSE; (7) ÁCIDO-B-D-GLUCURÔNICO; (8) ÁCIDO-A-D-4-O- METILGLUCORÔNICO; (9) ÁCIDO-A-D-GALACTURÔNICO.....	38
FIGURA 9 - ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA.....	40
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE LIGNINA.....	41
FIGURA 11 - FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES LIGNOCELULÓSICO APÓS O PRÉ- TRATAMENTO.	42
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÕES POPULACIONAIS DE ESPÉCIES DE BORATO COMO FRAÇÃO DO BORO TOTAL PARA UMA SOLUÇÃO EQUIVALENTE A 0,4 MOL/L DE ÁCIDO BÓRICO A 25 °C.	54
FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E GRÁFICO DE CONTORNO (B) PARA A PORCENTAGEM DE SOLUBILIZAÇÃO.....	76
FIGURA 14 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E GRÁFICO DE CONTORNO (B) PARA A O RENDIMENTO TOTAL DE GLICOSE.....	79
FIGURA 15 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E GRÁFICO DE CONTORNO (B) PARA A O RENDIMENTO TOTAL DE XILOSE.	82
FIGURA 16 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA DE PALHA DE SOJA NÃO TRATADA.	88
FIGURA 17 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS NÃO TRATADA E TRATADA EM PH 9,27.	91

FIGURA 18 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS NÃO TRATADA E TRATADA EM PH 11,10.....	92
FIGURA 19 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS NÃO TRATADA E TRATADA EM PH 13,00.....	93
FIGURA 20 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COMPARANDO AS AMOSTRAS TRATADAS EM PH 9,27 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPÉCIES QUÍMICAS DERIVADO DE ÁCIDO BÓRICO.	94
FIGURA 21 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COMPARANDO AS AMOSTRAS NO PH 11,10 PRESENTES E AUSENTES DE ESPÉCIES QUÍMICAS DERIVADO DE ÁCIDO BÓRICO.....	95
FIGURA 22 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COMPARANDO AS AMOSTRAS NO PH 12,23 PRESENTES E AUSENTES DE ESPÉCIES QUÍMICAS DERIVADO DE ÁCIDO BÓRICO.....	96
FIGURA 23 - DIFRATOGRAMA DE RAIO- X DA PALHA DE SOJA NÃO TRATADA.	97
FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DOS DIFRATOGRAMAS NORMALIZADOS DAS AMOSTRAS QUE PASSARAM POR PRÉ-TRATAMENTO COM ÍONS BORATO CONTRA A AMOSTRA NÃO TRATADAS (A = AMOSTRAS SEM BORATO E B = AMOSTRAS COM BORATO).	98
FIGURA 25 - ANÁLISE TÉRMICA NÃO-ISOTÉRMICA (TGA) DA AMOSTRA NÃO TRATADA, DESTACANDO A FAIXA PRINCIPAL DE PERDA DE MASSA (CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA).	99
FIGURA 26 - TERMOGRAVIMÉTRICA DERIVADA (DTG) DA AMOSTRA NÃO TRATADA COM OS PRINCIPAIS EVENTOS PELAS TEMPERATURAS DE DEGRADAÇÃO.....	100
FIGURA 27 - COMPARAÇÃO DOS PERFIS DTG ENTRE A AMOSTRA NÃO TRATADA E AS AMOSTRAS QUE PASSARAM POR UM PRÉ-TRATAMENTO COM E SEM BORATO (SEM BORATO A = 9,27; B = 11,10 E C = 13,00; COM BORATO D = 9,27; E = 11,10 E F = 13,00).....	102
FIGURA 28 - PALHA DE SOJA NÃO TRATADA, MOSTRADA SOBRE DIFERENTES AMPLIAÇÕES (A = 100X, B = 500X, C = 1.500X E D = 3.000X).....	103
FIGURA 29 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS APÓS PRÉ-TRATAMENTO (SEM BORATO A = (9,27, B = 11,10, C = 13,00) E (COM BORATO D = 9,27, E = 11,10, F = 13,00).	105

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - MILHÕES DE ALQUEIRES DE MILHO UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL NOS ESTADOS UNIDOS DE 1986 A 2016.....	24
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA PALHA DE SOJA APÓS MOAGEM INICIAL ..	67
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA FRAÇÃO ENTRE 20 E 80 MESH.	68
GRÁFICO 4 - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA (AUSENTE DE UMIDADE).	69
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DO TEOR DE GLICOSE E XILOSE RECUPERADA APÓS A HIDROLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE SOJA PRÉ-TRATADA COM NaOH CONTRA ÁCIDO BÓRICO EM MEIO ALCALINO (A = GLICOSE E B = XILOSE).	85
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE CRISTALINIDADES DAS AMOSTRAS COM BORATO, SEM BORATO E NÃO TRATADA.	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRODUÇÃO MUNDIAL DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL POR PAÍS OU REGIÃO (MILHÕES DE LITROS).....	23
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATÍVEIS, LIGNINA, TEOR DE CINZAS E HOMOCELULOSE (CELULOSE + HEMICELULOSE) DE MATERIAIS DE ORIGEM VEGETAL. ...	28
TABELA 3 - CAPACIDADE MUNDIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL 2 G INSTALADA EM MILHÕES DE LITROS.	29
TABELA 4 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - VALORES ENTRE PARÊNTESES SE REFEREM AOS VALORES DOS NÍVEIS CODIFICADOS...	63
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA BIOMASSA APÓS SEGUNDA MOAGEM.....	67
TABELA 6- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE SOJA (AUSENTE DE UMIDADE).....	68
TABELA 7 – RESULTADOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PALHA DE SOJA DESCRITOS NA LITERATURA.	70
TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO DE BIOMASSAS ESTUDADAS PARA PRODUÇÃO DE 2G.....	71
TABELA 9 – COMPARATIVO ENTRE O TEOR DE HOLOCELULOSE TOTAL NOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR E PALHA DE SOJA.	72
TABELA 10 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COM RESULTADOS OBTIDOS PARA PORCENTAGEM DE SOLUBILIZAÇÃO, RENDIMENTO TOTAL DE GLICOSE E RENDIMENTO TOTAL DE XILOSE (VALORES ENTRE PARÊNTESES SE REFEREM AOS NÍVEIS CODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS). CONTINUA.	72
TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O MODELO AJUSTADO PARA A RESPOSTA PORCENTAGEM DE MASSA SOLUBILIZADA.	75
TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O MODELO AJUSTADO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO TOTAL DE GLICOSE.....	78
TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O MODELO AJUSTADO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO TOTAL DE XILOSE.....	81
TABELA 14 - RESULTADOS OBTIDOS PARA PORCENTAGEM DE SOLUBILIZAÇÃO, RECUPERAÇÃO DE GLICOSE, E RECUPERAÇÃO DE XILOSE PARA EXPERIMENTOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPÉCIES DERIVADAS DO ÁCIDO BÓRICO (* EXPERIMENTOS RELATIVOS AO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA).....	83
TABELA 15 – VALORES DE RECUPERAÇÃO DE GLICOSE DA PALHA DE SOJA APÓS PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE RELATADOS NA LITERATURA CONTINUA.	86
TABELA 16 - ATRIBUIÇÃO DOS PICOS E/OU BANDAS NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO.....	89

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE GRÁFICOS.....	13
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVO GERAL	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO.....	21
3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	25
3.3 BIORREFINARIA E PRODUTOS QUE PODEM SER GERADOS	30
3.4 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	33
3.4.1 Celulose.....	35
3.4.2 Hemicelulose	38
3.4.3 Lignina	40
3.5 PRÉ-TRATAMENTOS.....	42
3.5.1 Pré-tratamento com ultrassom.....	43
3.5.2 Pré-tratamento ácido	44
3.5.3 Pré-tratamento alcalino.....	45
3.5.4 Pré-tratamento com solventes orgânicos (organosolv).....	46
3.5.5 Pré-tratamento por explosão de vapor.....	47

3.5.6	Pré-tratamento Expansão de Fibra com Amônia (AFEX)	48
3.5.7	Pré-tratamento hidrotérmico	49
3.5.8	Pré-tratamento biológicos	50
3.5.9	Pré-tratamento com Agentes Oxidantes	51
4	A QUÍMICA DO ÁCIDO BÓRICO EM MEIO ALCALINO	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	56
5.1	REPARAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	56
5.2	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DA PALHA DE SOJA	56
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA	57
5.3.1	Extrativos	57
5.3.2	Análise de umidade	57
5.3.3	Teor de Cinzas na biomassa	58
5.3.4	Hidrólise ácida	58
5.3.5	Lignina insolúvel, lignina solúvel e carboidratos estruturais	59
5.3.6	Teor de Cinzas do resíduo insolúvel em ácido	60
5.4	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA BIOMASSA	60
5.4.1	Infravermelho com Transformada de Fourier	60
5.4.2	Difração de Raios-X	61
5.4.3	Análise morfológica da palha de soja	62
5.4.4	Análise Termogravimétrica	62
5.5	EXPERIMENTOS DE PRÉ-TRATAMENTO – METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	62
5.6	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	64
5.7	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE SOJA	65

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	66
6.1.1	Distribuição granulométrica após moagem.....	66
6.1.2	Caracterização Química da biomassa	68
6.2	ESTUDOS DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	72
6.2.1	Análise da porcentagem de solubilização da biomassa durante pré-tratamento 74	
6.2.2	Análise do rendimento total de glicose	76
6.2.3	Análise do rendimento total de xilose	80
6.3	ESTUDOS COMPARATIVOS DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPÉCIES DERIVADAS DE ÁCIDO BÓRICO	82
6.3.1	Solubilização de biomassa, recuperação de glicose e recuperação de xilose	83
6.3.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	88
6.3.3	Análise da cristalinidade por difração de raio-X.....	96
6.3.4	Análise Termogravimétrica	99
6.3.5	Análise morfológica das fibras por microscopia eletrônica de varredura.	103
7	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Devido a uma maior demanda energética, o crescimento mundial tem trazido uma grande preocupação sobre a conservação dos recursos naturais não renováveis. O sistema energético mundial é atualmente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 85% da energia consumida no mundo é proveniente de fontes não renováveis, os quais também são utilizados para a produção de outros produtos, o que os leva a um consumo anual crescente (NAKANISHI et al., 2018).

Dentro desse contexto, se inicia uma exaustão das reservas de combustíveis fósseis, no qual é evidente a necessidade de pesquisas por outras alternativas que sejam de fontes renováveis, não somente pela conservação dos recursos naturais não renováveis, mas também pelos efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, entre os quais destaca-se o aquecimento global (IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2010).

Apesar do grande efeito positivo ligado ao consumo do etanol, como por exemplo, menor emissão de gases poluentes, existem muitas críticas em relação a expansão sucessiva do cultivo da cana-de-açúcar com a finalidade de produção de combustível no Brasil, pois essas áreas podem começar a competir diretamente com as áreas destinadas às culturas voltadas para a alimentação (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). Desse modo, o etanol de segunda geração se apresenta como uma solução em potencial para essa questão, podendo gerar teoricamente um biocombustível a partir de qualquer fonte de biomassa sem a necessidade de aumentar a área de cultivo (CHATURVEDI; VERMA, 2013; BESSA et al., 2016; LI et al., 2016).

A utilização da biomassa vegetal como fonte de energia renovável em um sistema de produção de álcool, principalmente no Brasil, onde há grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, o entendimento da estrutura celular e o porquê esse material é tão resistente ao ataque químico e bioquímico torna-se necessário (MOSIER et al., 2005; MENDES et al., 2010). Portanto, melhorias de processo a partir de um pré-tratamento do material lignocelulósico têm sido utilizado a fim de facilitar a atividade enzimática sob os polissacarídeos em monossacarídeos, que

serão então fermentados e destilados para produção do etanol, bem como utilizar a lignina e hemicelulose para fabricação de outros produtos químicos.

No entanto, alguns autores reportam que a repolimerização com rearranjo e/ou deposição da lignina podem ser um dos possíveis problemas enfrentados pelos atuais pré-tratamentos (não há estudos específicos para avaliar essa hipótese) (ARANTES et al., 2011; ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012; SINGH et al., 2014), pois após a biomassa passar por um processo de deslignificação, a lignina possui a capacidade de se rearranjar ou se depositar sobre a superfície do material pré-tratado, fechando os espaços criados inicialmente pelo pré-tratamento. Esse fato causa a redução da eficiência da hidrólise enzimática (CHEN et al., 2018).

Apesar dos materiais lignocelulósicos terem uma estrutura muito rígida, reagentes químicos como o ácido bórico em meio alcalino, podem se apresentar como uma boa alternativa para o decaimento da lignina (CHEN et al., 2017). Esse fato é possível devido à ação de complexação do ácido bórico nos compostos fenólicos, principalmente, com alto peso molecular como a lignina (ROESKY; ATWOOD, 2003). Este ácido possui também a capacidade de reduzir as reações de repolimerização concomitantes durante a despolimerização da lignina (CHEN et al., 2018), o qual poderia aumentar o rendimento da hidrólise enzimática.

Portanto, se faz necessário um estudo de otimização dos parâmetros relacionados (concentração de borato, pH e tempo), para viabilizar o máximo rendimento de monossacarídeos. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando íons borato/tetraborato em meio básico como um pré-tratamento da palha de soja para produção de etanol de segunda geração. Desse modo, essa pesquisa demonstra um grande potencial para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, o qual representa uma importante atividade econômica para as biorrefinarias, além de atuar em questões ambientais, tais como a redução da emissão de gases poluentes que contribuem para o aumento do efeito estufa e a necessidade de grandes latifúndios para aumento da produção de etanol, que provoca uma disputa entre a terra destinada para plantio de alimentos e o plantio para produção do biocombustível.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da presença de íons derivados de ácido bórico no pré-tratamento alcalino de palha de soja, visando um pré-tratamento menos agressivo no qual haja maior recuperação de carboidratos fermentescíveis (C6 e C5) após a hidrólise enzimática, vislumbrando a aplicação deste tipo de biomassa e pré-tratamento na produção de etanol de segunda geração.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar através de metodologia de superfície de resposta a influência e interação dos fatores pH, concentração inicial de ácido bórico, e tempo de pré-tratamento na porcentagem de solubilização da biomassa e recuperação de glicose (C6) e xilose (C5) após hidrólise enzimática.
- Estudar as modificações químicas e morfológicas causadas pela presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino de palha de soja.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O uso de combustíveis fósseis tem representado para diversos países desafios: econômico, político e ambiental. Isso acontece devido às fontes não renováveis, que geram níveis elevados de poluição do ar e causam grande dependência energética dos países dominadores dessa fonte. Esses fatos apontam para uma substituição total ou parcial desses tipos de combustíveis, principalmente motores de queima, pois segundo a Aliança Global de Combustíveis Renováveis (GRFA) representa de 20 a 30% de todas emissões globais (BOLAND; UNNASCH, 2014). Até o presente momento, o etanol foi a solução mais bem-sucedida entre os biocombustíveis, e vem se consolidando cada vez mais em muitos países (TÁVORA, 2011).

O uso do etanol é extremamente estratégico, pois é eficiente como combustível e ambientalmente viável e sustentável. Outra vantagem é que o álcool etílico pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas como, por exemplo: milho, cevada, trigo, cana-de-açúcar, beterraba, sorgo. Do ponto vista sustentável possui várias vantagens para o seu estabelecimento, podendo citar algumas delas como: origem de fonte vegetal, atingindo o escopo de ser um produto renovável, emitir menor quantidade de gases poluentes quando comparado aos combustíveis fósseis e ainda do rejeito que é gerado é possível produzir energia térmica, mecânica ou elétrica (BOLAND; UNNASCH, 2014). Além disso, os carros que usam etanol como combustível possuem maior potência e desempenho do motor que a gasolina (SOUSA et al., 2016).

Diante do exposto, o etanol coloca-se como uma alternativa já consagrada aos combustíveis fósseis, além de movimentar a economia nacional por gerar empregos e diminuir as agressões ao meio ambiente.

3.1 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

O etanol considerado de primeira geração (1G) é a denominação que se dá ao álcool etílico produzido a partir de culturas cerealíferas, como o trigo na Europa, milho nos EUA ou de culturas açucareiras como a cana-de-açúcar no Brasil ou a beterraba na Europa (EISENTRAUT, 2010; ABDULKHANI et al., 2017). O composto

C_2H_5OH possui como nome oficial etanol, segundo as regras de nomenclatura da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Esse álcool é importante na fabricação de vários produtos comercializados no nosso dia-a-dia, como: cervejas, vinhos, cachaça, produtos de limpeza, solventes, perfumes entre outros.

No mundo, o 1G tem ganhado destaque como um biocombustível e sua utilização têm crescido em vários países (Índia, Colômbia, China etc.), dando segurança no fornecimento energético e no desenvolvimento do setor agrícola, reduzindo assim, a importação de combustíveis fósseis e a emissão de gases poluentes. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2017), o etanol possibilitou uma redução na emissão de 408 milhões de toneladas de CO_2 de 2003 a 2017.

Este fato só é possível, pois a combustão do álcool etílico em veículos é capaz de reduzir em até 61% a quantidade de CO_2 produzido, quando comparado à gasolina, utilizando um prazo de compensação de 30 anos para emissões ligadas a efeitos indiretos do uso da terra (UNICA, 2017). Segundo Goldemberg, Coelho e Guardabassi (2008), durante todo o ciclo de vida da cana-de-açúcar (do plantio até a incineração da biomassa), a planta apresenta um equilíbrio energético positivo, fazendo com que o setor de açúcar/etanol evite o equivalente a 13% das emissões de todos os setores industriais, comerciais e residenciais brasileiros.

Alguns países assumiram a liderança na tecnologia de produção de etanol e tem trabalhado em pesquisas para substituição dos combustíveis fósseis. Isso acontece para que as unidades de produção do etanol possam ser melhoradas, buscando operar com maior eficiência, como na geração de energia elétrica, responsável por auxiliar na redução dos custos e contribuir para a sustentabilidade das atividades energéticas (SOUSA et al., 2016).

Tabela 1 - Produção mundial de álcool combustível por país ou região (milhões de litros).

País	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
USA	24.68	35.23	41.40	50.33	52.79	50.34	50.34	54.13	56.04	58.027	59.81
Brasil	18.99	24.49	24.90	26.20	21.09	21.11	23.72	23.43	26.85	27.615	27.000
Europa	2.158	2.778	3.937	4.577	4.421	4.463	5.190	5.470	5.250	5.213	5.356
China	1.840	1.900	2.052	2.052	2.101	2.101	2.635	2.404	3.078	3.199	3.312
Canadá	799	901	1.102	1.351	1.749	1.700	1.980	1.931	1.650	1.650	1.703
Outros	1.192	1.473	3.460	3.729	2.642	2.847	4.815	5.640	4.342	4.925	5.489
Mundo	49.67	66.79	76.85	88.24	84.8	82.56	88.688	93.008	97.217	100.631	102.395

Fonte: RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA. **World fuel ethanol production - Industry statistics.** Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

Dentre esses países que já possuem uma alternativa consolidada para os combustíveis fósseis, pode-se destacar o Brasil e os Estados Unidos, pois desde os anos 70, após uma crise petrolífera, passaram a investir de forma mais intensiva em tecnologias de obtenção de biocombustíveis. Segundo o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), na safra de 2016/2017 os norte-americanos produziram

cerca de 60 bilhões de litros de etanol, se firmando mais uma vez como o maior produtor. Em segundo lugar esteve o Brasil com uma produção de 27 bilhões de litros de etanol na safra 2016/2017 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2018b).

O maior produtor mundial utiliza o milho como matéria prima para a produção do álcool etílico (gráfico 1), e o processo mais utilizado pelos americanos é chamado de processo seco. O processo seco acontece quando os grãos de milho são moídos e transformados em farinha. Em seguida, é então acrescentado água e amilases, formando assim uma pasta. Posteriormente, o material é fervido e ocorre uma redução por bactérias, em seguida é separado do etanol por destilação. O outro processo utilizado em 10% dos casos é conhecido como processo úmido, no qual os grãos do milho são submersos em uma solução ácida para liberação de amido, e em seguida a água e amilases são adicionadas para transformar os polissacarídeos em monossacarídeos. Novamente é obtida uma pasta que é fervida e em sequência

ocorre uma redução bacteriana, e finalmente o etanol possa ser separado por destilação (NOVOZYMES, 2017).

Gráfico 1 - Milhões de alqueires de milho utilizado para produção de etanol nos Estados Unidos de 1986 a 2016.

Fonte: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **U.S. Bioenergy statistic**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/>>. Acesso em: 14 apr. 2017.

Contudo, mesmo com uma produção anual média bem menor em relação aos E.U.A, o Brasil é considerado como referência mundial na produção sustentável e eficiente de etanol, pois a produção desse álcool nos Estados Unidos é considerada mais cara que a brasileira. Alguns motivos contribuem para que a produção de etanol brasileira seja considerada mais vantajosa que a norte americana como, por exemplo, o baixo custo da mão de obra, grandes extensões de terras férteis que geram grande produtividade e o processo a partir da cana-de-açúcar que produz menores quantidades de CO₂, devido ao ciclo de vida das plantas (milho e cana-de-açúcar) (MAFIOLETTI; MARTINS; TURRA, 2011).

O processo produtivo do Brasil consiste basicamente em lavar a cana-de-açúcar cortada e moer, em que é obtido o caldo de cana-de-açúcar (sacarose) que

sofre uma fermentação bacteriana, e em seguida o etanol é separado por destilação. O bagaço de cana-de-açúcar é reaproveitado para cogeração de energia térmica e elétrica, garantindo o autoconsumo ou ainda a venda do excedente de energia. Diferentemente de outros países, a tecnologia das usinas brasileiras permite que haja uma flexibilidade do destino da cana-de-açúcar, podendo gerar álcool etílico ou açúcar, maximizando assim os lucros (WAAK; NEVES, 1998).

É possível destacar outros países que são referência na produção do etanol como, por exemplo: Canadá, que produz a partir do trigo; a China que utiliza a mandioca, sorgo e milho; e a Índia e Colômbia que assim como o Brasil utilizam a cana-de-açúcar (UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT - UNCTAD, 2016).

No entanto, a utilização comercial em larga escala do etanol desencadeou vários debates sobre a subida de preços de alimentos que são utilizados como base na fabricação de álcool etílico, gerando competição entre alimentos e biocombustível. Outros fatores também têm contribuído para estagnação da produção de etanol mundial, tais como: o baixo preço do barril de petróleo que dificulta a competição com o preço da gasolina, a dificuldade de conscientização da população ao apelo ambiental do etanol, o surgimento de novas tecnologias na área de transporte como o carro elétrico entre outros (SOUSA et al., 2016).

Nesse sentido o etanol de segunda geração vem como uma possível solução sustentável, possibilitando produzir maiores quantidades de biocombustíveis, a partir da mesma área plantada (CANILHA et al., 2012). Esse fato conduziria a obtenção de melhores preços para o etanol e ajudaria a dar um valor agregado a resíduos agroindustriais. Segundo El-Zawawy et al. (2011) teria uma redução líquida na emissão de CO₂ em cerca de 85% em relação a gasolina. Vale a pena destacar que não há diferença do ponto de vista químico entre o etanol 1G e 2G, apenas a fonte de obtenção (SOUSA et al., 2016).

3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Etanol Celulósico, também chamado etanol de lignocelulose, é a denominação dada ao álcool etílico de segunda geração (2G). O etanol 2G é obtido a partir da quebra, por reações químicas, físicas ou biológicas, da estrutura fibrosa

dos vegetais, composta basicamente por lignina, hemicelulose e celulose (SÁNCHEZ, 2009; UNCTAD, 2016).

Para a produção de 2G, o material lignocelulósico precisa sofrer um pré-tratamento para despolimerizar a proteção natural deste componente que é a lignina. Assim, obtém-se acesso aos polissacarídeos (hemicelulose e celulose) que posteriormente sofrem hidrólise para despolimerização, convertendo-os em açúcares simples como a glicose e xilose. A partir disso, esses monossacarídeos sofrem fermentação alcoólica e purificação por destilação, não diferenciando sua estrutura química do etanol 1G (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012; CANILHA et al., 2012).

O etanol lignocelulósico normalmente é gerado a partir de resíduos celulósicos, tais como: palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, caule de trigo, palha de soja etc. Porém, grande parte desses materiais são descartados, apesar de existir a possibilidade de serem reutilizados na produção do etanol 2 G (RAMOS E PAULA et al., 2011).

Das mais variadas fontes de biomassa usadas para produção do etanol celulósico, pode-se destacar o bagaço da cana-de-açúcar (matéria-prima comumente utilizada pelas indústrias sucroalcooleiras) e como alternativa, a utilização da palha de soja. Esses materiais são rejeitos encontrados em abundância a baixo custo e com grande potencial para geração de etanol, pois suas composições são favoráveis para a produção do etanol 2 G.

A área colhida estimada no Brasil de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2018/19, foi de 8,61 milhões de hectares. Em números absolutos estima-se uma produção de 625,96 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, que representa uma redução de 1,2% em relação à safra anterior (2017/2018). Nesta safra (2018/19), estima-se um aumento de 1,4% na produção de etanol, passando de 28 bilhões de litros (CONAB, 2018b).

As agroindústrias sucroalcooleiras geram uma grande quantidade de resíduos, como o bagaço e a palha, os quais poderiam ser considerados matéria prima para a obtenção de produtos de alto valor agregado. Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, é gerado aproximadamente 270-280 kg de bagaço e 140 kg de palha (CANILHA et al., 2012). Estima-se que para o ano de

2018 a produção de bagaço e palha de cana-de-açúcar será aproximadamente de 169 a 175 milhões de toneladas e 87,5 milhões de toneladas, respectivamente.

Outro grande potencial para a produção de etanol é a palha de soja, pois a soja ganhou espaço como o terceiro produto agrícola mais produzido no mundo, após o trigo e o milho (ABDULKHANI et al., 2017). A área estimada de cultivo de soja no Brasil na safra 2017/18 foi de 33.787,2 milhões de hectares. Nesta safra (2018/2019) estima-se um aumento de 2,6% passando para uma área de 35,1 milhões de hectares e com uma expectativa de produção de 117 milhões de toneladas, o que corresponde a aproximadamente 57% de toda produção brasileira de grãos semeado (CONAB, 2018a).

A palha de soja corresponde de 120% a 150% do peso da soja (RAMOS E PAULA et al., 2011). Com a estimativa de produção de soja citada acima, especula-se que 140 a 175,5 milhões de toneladas de palha de soja seja produzida na safra de 2018/19. Porém, devido à falta de infraestrutura técnica, o uso industrial da palha de soja ainda é raro (ABDULKHANI et al., 2017).

Análises químicas feitas com os resíduos de soja (caule e vagem) proporcionaram valores diferentes em comparação do caule com a vagem, com 21,64% e 17,16% de lignina, 69,21% e 53,82% de holocelulose (hemicelulose + celulose) respectivamente. Porém, os valores encontrados para lignina e holocelulose para o caule e vagem de soja, foram muito semelhantes a outras biomassas comumente estudadas para avaliar o seu potencial de produção de álcool etílico, conforme a tabela 2.

Esses resultados encontrados para a palha de soja residual mostram um grande potencial para a produção de uma variedade de biomateriais, biocombustíveis e bioquímicos, devido sua abundância no Brasil e no mundo (RAMOS E PAULA et al., 2011).

Dados da Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2016) mostram que o Brasil é o segundo maior produtor de etanol 1 G, com uma produção de 27 bilhões de litros fabricados. No entanto, segundo Canilha et al. (2012), o etanol celulósico poderia ter sua produção aumentada entorno de 60% (L /hectare plantado), se apenas a metade do bagaço de cana-de-açúcar gerado fosse aproveitado para a produção do álcool.

Tabela 2 – Composição química de extratíveis, lignina, teor de cinzas e homocelulose (celulose + hemicelulose) de materiais de origem vegetal.

	Material	(%) extratíveis	(%) Lignina	(%) Cinzas	(%) Holocelulose
Arroz	Casca de Grão	4,06	26,90*	16,43	52,61
Café	Caule	10,49	22,88	1,12	65,51
	Folha	7,63	23,04	1,46	67,87
Cana-de-açúcar	Bagaço	31,76	20,88	0,80	46,56
	Palha	9,18	20,85	4,32	65,65
Feijão	Haste	7,55	21,61	4,61	66,23
	Vagem	18,19	11,99	6,65	63,17
Milho	Caule	11,31	20,49	3,43	64,77
	Folha	10,51	19,26	3,53	66,70
	Palha	5,85	9,29	1,58	83,28
	Sabugo	5,85	15,75	1,16	77,24
Soja	Caule	6,87	21,64	2,28	69,21
	Vagem	21,77	17,16	7,25	53,82
Madeira	Serragem	9,37	21,88	0,18	68,57
	Aparas de Plaina	5,60	20,62	0,13	73,65

Fonte: RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.

Estima-se que o Brasil possua instalada uma capacidade produtiva (tabela 3) de 125,65 milhões de litros de etanol celulósico, que representa uma média de 9% de toda produção mundial, sendo o quarto potencial nesse setor, ficando atrás apenas de Estados Unidos, China e Canadá. Entretanto, previsões realizadas pela UNCTAD (2016) indicam que o Brasil poderá atingir até 2025 uma produção anual de 1,5 bilhões de litros de 2 G (Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento - UNCTAD, 2016).

Tabela 3 - Capacidade mundial de produção de etanol 2 G instalada em milhões de litros.

Região	Capacidade de produção instalada (milhões de litros)	Porcentagem mundial
Estados Unidos	490,37	35%
China	340,19	24%
Canadá	303,45	22%
União Europeia	130,83	9%
Brasil	125,65	9%
Mundo (2015)	1390,48	100%

Fonte: UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT - UNCTAD. **Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing country perspectives.** Geneva: UNCTAD, 2016. (UNCTAD/DITC/TED/2015/8).

O etanol de segunda geração contribui com a redução de gases poluentes em comparação com a gasolina. Os valores emitidos de gás carbônico (CO_2), metano (CH_4) e óxido nítrico (NO_2) são de 89% maiores na combustão da gasolina quando comparados ao etanol (BALAT, 2011). No Brasil existem apenas duas empresas que realizam a produção do 2G a Granbio e Raízen. As duas juntas produziram 5 milhões de litros no ano de 2016 e suas capacidades de produção são atualmente de 82 milhões e 42 milhões de litros respectivamente, mas devido ao elevado custo a produção é consideravelmente baixa (UNICA, 2016).

Os principais motivos para que esse produto não esteja em expansão no Brasil é a falta de aperfeiçoamento tecnológico, bem como um montante elevado para produção. De acordo com Lynd, Elander e Wyman (1996), a etapa de pré-tratamento, que decompõe a lignina é responsável por um terço dos custos da produção do Etanol 2G. Outro fator que encarece o processo é o valor das enzimas usadas para quebrar os polissacarídeos em monossacarídeos na hidrólise enzimática. Por esse motivo, o pré-tratamento representa uma grande oportunidade para melhorar a eficiência de produção e baixar os custos de produção de 2G.

Contudo, não é possível restringir essa quantidade de biomassa apenas para conversão de etanol, esse material tem a capacidade de movimentar uma

biorrefinaria inteira, atuando em conjunto com os produtos derivados do petróleo (RABELO et al., 2011).

3.3 BIORREFINARIA E PRODUTOS QUE PODEM SER GERADOS

O mundo ainda se mostra muito dependente do petróleo, com tanta fonte de biomassa disponível e o investimento em pesquisas não somente na área de etanol celulósico, mas também em muitas outras áreas que podem ser exploradas através desses materiais e das tecnologias desenvolvidas a partir dos mesmos, como por exemplo, as biorrefinarias que pode funcionar em paralelo as refinarias de petróleo sendo alternativa ao combustível fóssil (RABELO et al., 2011). A biorrefinaria é definida como instalações, equipamentos e processos unitários que convertem a biomassa em biocombustíveis ou produtos químicos que ainda podem gerar eletricidade (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL - BNDES, 2007).

O funcionamento das biorrefinarias acontece a partir, principalmente, de polissacarídeos e lignina que por meio de um conjunto de processos, são fracionados e convertidos em produtos, incluindo combustíveis de transporte, coprodutos e energia direta. Usando a indústria do petróleo como um exemplo ilustrativo, apenas 4% da produção total de petróleo de uma refinaria convencional é destinado para produção produtos químicos e 60% é utilizado como combustível em meios de transporte e produção de energia (CHERUBINI, 2010; ABDULKHANI et al., 2017).

A biorrefinaria é um complexo industrial similar a uma refinaria petroquímica, onde são obtidos produtos de alto valor agregado e energia a partir da biomassa (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). Essa biomassa é utilizada por duas plataformas, a bioquímica e a termoquímica. A primeira é baseada na conversão de açúcares obtidos a partir de hidrólise ácida ou enzimática. Enquanto a outra se baseia na conversão termoquímica da matéria-prima bruta com altas temperaturas, na presença de oxigênio para produção de bio-óleo, que após sofrer um processo de hidrodeoxigenação que resulta em uma mistura similar ao petróleo bruto (ZHANG et al., 2007; PEREIRA; COUTO; ANNA, 2008).

Após a biorrefinaria conseguir efetuar a quebra da estrutura lignocelulósica é possível transformar todos componentes constituintes da biomassa em produtos de valor agregado como, por exemplo, a celulose (figura 1) separada quase pura é usada principalmente na indústria do papel. Após o processo de separação e solubilização da celulose na deslignificação da madeira com NaOH, o tratamento alcalino resulta em um resíduo de lignina e hemicelulose chamado “licor negro” que é incinerada nas caldeiras de recuperação, sendo o principal combustível para o funcionamento da fábrica de celulose.

O calor produzido mantém as necessidades energéticas da fábrica de celulose, tornando-a autossustentável em termos energéticos e mostrando novamente que é uma matéria prima com um potencial para a geração de energia elétrica (KARP et al., 2013; ABDULKHANI et al., 2017).

Figura 1 - Biorrefinaria – produtos que podem ser gerados a partir da celulose.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, N.; COUTO, M.; ANNA, L. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series in Biotechnology, 2).

É possível também a obtenção de outros produtos a partir da hidrólise completa da celulose, resultando na despolimerização para glicose. Assim, pode-se converter a hexose em diversas substâncias como o etanol, ácidos orgânicos, glicerol, sorbitol, manitol, frutose entre outras. A glicose pode ser ainda convertida quimicamente em meio ácido com altas temperaturas ou enzimaticamente em hidroximetilfurfural, que é um importante intermediário para a produção de

dimetilfurfural (DMF) (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - CGEE, 2010).

Outra parte da estrutura lignocelulósica é a hemicelulose, um heteropolissacarídeo principalmente utilizado na produção de furfural. O furfural nada mais é que um solvente seletivo muito reativo, empregado em larga escala na purificação de óleos vegetais, animais, minerais e na concentração de vitamina A de óleo de fígado de peixe (CGEE, 2010).

Pode-se também converter os monossacarídeos a uma variedade de combustíveis e solventes como, por exemplo, o etanol por leveduras com habilidade de fermentar pentoses (*Pichia stipitis*, *Candida sheratae* ou *Pachysolen tannophilus*). A partir da hemicelulose é também possível ser obtido gomas vegetais para a produção de espessantes, adesivos, emulsificantes, estabilizantes e outros produtos químicos (figura 2) (CGEE, 2010; CANILHA et al., 2012; RAQUEL et al., 2014).

Figura 2 - Biorrefinaria – Produtos que podem ser gerados a partir da hemicelulose.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, N.; COUTO, M.; ANNA, L. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series in Biotechnology, 2).

A última parte dessa estrutura na lignocelulose é a lignina, que vem sendo empregada como matéria prima para a produção de emulsificantes, com aplicação

na área alimentícia e na produção de vanilina, que pode ser usado na formulação de produtos fármacos (figura 3). A lignina produzida industrialmente também é utilizada para fabricação de agentes dispersantes em tintas, pesticidas, inseticidas, aditivos para tintas e vernizes, agente aglomerante ou de flutuação no tratamento de efluentes, agente de liberação lenta de nitrogênio no solo, entre outras aplicações (CGEE, 2010).

Figura 3 - Biorrefinaria – Produtos que podem ser gerados a partir da lignina.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, N.; COUTO, M.; ANNA, L. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series in Biotechnology, 2).

A complexidade dos componentes da parede celular vegetal a torna resistente aos ataques físicos, químicos e bioquímicos, dificultando o acesso das várias enzimas envolvidas em sua degradação, por esse motivo o entendimento da sua estrutura é fundamental para a viabilização do uso comercial da biomassa como fonte de energia renovável (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

3.4 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular das plantas é uma estrutura biológica complexa (figura 4) contendo polímeros e outras moléculas cujas proporções e organização estrutural variam de acordo com o tipo e a idade da planta (GRAMINHA et al., 2008). A parede celular possui várias funções como definir tamanho e a forma da célula, conferir

A parede celular primária é a camada mais fina, com espessura menor que 0,1 μm , e é constituída basicamente por água (65%), e o restante que corresponde à matéria seca, divide-se em uma estrutura de microfibrila moderadamente cristalina com aproximadamente 30% de celulose curtas, 30% hemicelulose e 30% pectina e 10% de proteínas. A principal função da parede primária é ser suficientemente flexível para permitir o crescimento e expansão da planta (FENGEL; WEGENER, 1989; RAMOS, 2003; SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Quando a célula atinge sua forma final, uma parede celular secundária mais espessa é depositada como microfibrilas longas e altamente cristalinas. A parede celular secundária é subdividida em três partes: parede secundária externa (S1), parede secundária intermédia (S2) e parede secundária interna (S3), sendo a S2 mais espessa que S1 e S3. A parede secundária representa cerca de 80% do peso seco da parede vegetal e possui teor de água reduzido, sendo basicamente formada por microfibrilas de celulose que estão moderadamente paralelas entre si, e correspondem a 65 a 85% de polissacarídeos (50 a 80% de celulose e 5 a 30% de hemicelulose) e 15 a 35% de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989; RAMOS, 2003; SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Observa-se na figura 4 que a parede primária apresenta a mesma estrutura em quase todos os tipos de células e em todas as espécies, enquanto a parede secundária possui características diferentes em cada tipo de espécies e em cada tipo de tecido vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989; KRAUS; LOURO; ESTELITA, 2009).

3.4.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo natural mais abundante na biosfera e este é o constituinte majoritário da biomassa, sendo encontrada em todas as plantas terrestres (SUN et al., 2015). Sua estrutura está ligada à hemicelulose (principalmente xiloglucanos ou xilanos) através de ligações de hidrogênio dando o formato de rede característico, e ligado à lignina por interações secundárias (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

A celulose é um homopolissacarídeo linear com ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4) entre os meros celobiose que é um dissacarídeo $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ de glicose (figura 5). As

ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4) juntamente com as ligações de hidrogênio, formada pelo grupo hidroxila, permitem que haja uma boa propagação do mero celobiose (KARP et al., 2013).

Figura 5 - Molécula de celulose.

Fonte: SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 246–291, 2005.

Devido a essa propagação, cadeias de celulose em parede celular primária de plantas possuem grau de polimerização (DP) que variam de 5.000 a 7.500. O DP da celulose pode variar de acordo com a sua origem, espécie e grau de maturação da parede celular. Por exemplo a madeira, que possui o DP em torno 10.000 e a celulose de algodão, que possui DP de 15.000 (ODEGA; PETRI, 2010). Muitas propriedades da celulose encontram-se dependentes do seu grau de polimerização (DP), isto é, do número de moléculas de glicose que constituem uma molécula de celulose como, por exemplo, a cristalinidade (BANSAL et al., 2010).

Pode-se observar através de estudos por difração de raios-x que as cadeias de celulose estão em conformação em dupla hélices, achatadas e estendidas (podendo sofrer algumas variações) e devido às forças de interações secundárias (Van der Waals), provocam uma aproximação entre as cadeias lineares de celulose, criando uma estrutura conhecida como microfibrila (ODEGA; PETRI, 2010; KARP et al., 2013).

As microfibrilas são compostas pela agregação de fibras lineares de celulose normalmente empacotadas, formando uma estrutura cristalina que está ligada a hemicelulose através de ligações de hidrogênio, criando assim uma rede que fornece o esqueleto estrutural para a parede celular das plantas (figura 6) (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Quanto maior for empacotamento e a organização das microfibrilas, maior será o grau de cristalinidade da celulose, criando assim uma estrutura rígida que dificulta a penetração de solvente para seu interior, tornando a planta mais resistente a degradação. Contudo, as microfibrilas de celulose possuem defeitos onde não estão devidamente empacotadas, formando regiões amorfas (figura 7) que são pontos de vulnerabilidade, permitindo acesso de solventes (PEREIRA; COUTO; ANNA, 2008; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

Figura 6 - Representação da lignocelulose e seus componentes microfibrila de celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: adaptado de CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 44, p. 48-54, jan. 2010.

Figura 7 - Estrutura química da microfibrila de celulose, destacando região cristalina e região amorfa.

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

3.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo carboidrato natural mais comum no mundo, ficando atrás somente da celulose. Sua estrutura é constituída de polímeros heterogêneos dentre pentoses hexoses e ácidos urônicos (CARVALHO et al., 2010).

As hemiceluloses, também conhecidas por polioses, são polissacarídeos compostos por vários monossacarídeos, podendo conter pentoses como a β -D-xilose, α -D-arabinopiranoose, α -D-arabinofuranose e hexoses como a β -D-glucose, β -D-manose, α -D-Galactose e ainda ácidos urônicos como o ácido β -D-glucurônico, ácido α -D-4-O-metilglucurônico e ácido α -D-galacturônico e desoxioses (α -D-Ramnose e α -L-frucose) (figura 8) (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Figura 8 - Representação dos constituintes da hemicelulose: (1) β -D-Xilose; (2) D-arabinopiranoose; (3) α -L-arabinofuranose; (4) β -D-glucose; (5) β -D-manose; (6) α -D-galactose; (7) Ácido- β -D-glucurônico; (8) Ácido- α -D-4-O-metilglucurônico; (9) Ácido- α -D-galacturônico.

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

A grande diversidade de sua formação e vasto número de ramificações faz com que a hemicelulose possua baixa massa molecular (em relação aos demais polímeros constituintes da lignocelulose) com uma variação média DP de 100 a 200 (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005; KARP et al., 2013). Esse número de ramificações resulta em um polímero com enormes regiões amorfas, o que facilita o acesso aos agentes químicos em solução (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Estruturalmente as hemiceluloses são semelhantes às celuloses, pois a cadeia principal é formada por ligações β -glicosídicas (β -1,3-glicosídicas e β -1,4-glicosídicas) e uma grande variedade de açúcares nas ramificações (JOVANOVIĆ et al., 2009; KARP et al., 2013). Como característica, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida e básica, pois oferecem maior acessibilidade aos solventes que comumente são usados como catalisadores. Geralmente são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar da cadeia principal como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas (CANILHA et al., 2012; QING et al., 2017).

O principal constituinte da hemicelulose é a xilana, um heteropolissacarídeo que possui um esqueleto de β -(1-4) -D-xilopirranose, contendo ramificações laterais de pentoses e hexoses, como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose e por seus ácidos urônicos. A composição e ligação das cadeias secundárias determinam o tipo específico de variação da xilana (GÍRIO et al., 2010). No geral, a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses dependem do tipo de parede celular e pode variar de espécie para espécie (POLIZELI et al., 2005; CGEE, 2010).

Dentro da parede celular, a xilana está fortemente ligada com a celulose, revestindo a microfibrila e dificultando a ação das celulasas, além de ser covalentemente ligada à lignina (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017). Porém, segundo os autores Sandgren, Stahlberg, Mitchinson (2005), Odega e Petri (2010), as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose são mais fortes que as interações entre as hemiceluloses e ligninas. Deste modo, a xilana é importante na conexão entre celulose e lignina (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Uma das formas de obtenção do etanol é a partir da xilose que pode ser convertida biologicamente por leveduras com habilidade de fermentar essa pentose como, por exemplo, *Pichia stipitis*, *Candida sheatei* ou *Pachysolen tennophilus* (CHANDEL et al., 2015) ou por bactérias de origem aeróbica como *Bacillus*, *Klebsiella*, *Aeromonas* e fungos como *Fusarium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Monilia*,

Rhizopus que são capazes de fermentar xilose em álcool etílico (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

3.4.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula mais abundante existente na biosfera. A lignina apresenta várias funções importantes para a planta como transporte de água, nutrientes e metabólitos (PANG et al., 2014).

A lignina é um polímero aromático complexo, pois é formado pela polimerização de três álcoois precursores (figura 9) e seu mecanismo de polimerização resulta em uma estrutura tridimensional e amorfa (figura 10) (CHEN et al., 2017).

Encontrada em vegetais, estando intimamente ligada à celulose e hemicelulose. Possui como característica a impermeabilidade, que proporciona resistência à compressão hídrica e rigidez à parede celular, apresenta funções mecânicas de sustentação, aumenta a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos e reduz a digestibilidade do material vegetal devido a sua estrutura molecular, onde formam uma rede com uma variedade de ligações éster, éter e carbono-carbono (SÁNCHEZ, 2009; BASSO; GALLO; BASSO, 2010; KARP et al., 2013).

Figura 9 - Estrutura dos Álcoois precursores da lignina.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, N.; COUTO, M.; ANNA, L. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series in Biotechnology, 2).

Figura 10 - Representação de uma molécula de lignina.

Fonte: adaptado GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 1–22, 2008.

A lignina é um polímero com um grau de polimerização de 10 000 DP (FENGEL; WEGENER, 1989), desenvolvidos a partir da condensação desidrogenativa de três álcoois cinâmílicos precursores, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que são diferentes entre si, pelo grau de metoxilação (YANG et al., 2017).

Ao decorrer do envelhecimento da planta, a tendência é que a quantidade de lignina aumente, o que faz com que sua digestibilidade diminua (FUKUSHIMA et al., 2000). Geralmente esse componente é presente em menor quantidade na planta, no entanto, a lignina atribui limitação suficiente para retardar ou evitar completamente a ação enzimática, dificultando a hidrólise (ODEGA; PETRI, 2010).

Estudos demonstraram que a remoção de 47.4% da lignina da palha de soja, se mostrou eficiente para recuperar 74% da celulose e 4% da hemicelulose na amostra pré-tratada, resultando num aumento da eficiência da hidrólise enzimática de 33% (amostra não tratada) para 90% (KIM, 2018). Baseado nesses fatos torna-se fundamental a quebra da lignina para utilização industrial da biomassa.

3.5 PRÉ-TRATAMENTOS

Para a produção de etanol de segunda geração, bem como para outros produtos químicos, é necessário que a biomassa passe por um processo de pré-tratamento que visa desorganizar a estrutura do material lignocelulósico (figura 11) e, posteriormente, separar os polissacarídeos para hidrólise. Esses processos de separação podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação desses. O que dependerá do grau de separação e a sua finalidade (CHEN et al., 2017).

Cerca de 30% dos custos de produção do Etanol 2 G se encontra no processo de pré-tratamento e os rendimentos de monossacarídeos após hidrólise enzimática na ausência de um pré-tratamento são de aproximadamente 20%. Em comparação com estudo realizado por Kato et al. (2014) que ao utilizar um pré-tratamento antecedendo a hidrólise enzimática, alcançou rendimentos superiores a 90%.

Figura 11 - Fracionamento dos componentes lignocelulósicos após o pré-tratamento.

Fonte: adaptado de CANILHA, et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 44, p. 48-54, jan. 2010.

Para que o pré-tratamento do complexo lignocelulósico possa ser considerado eficiente, é necessário que alguns pré-requisitos sejam atendidos, como: evitar a

necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, quebrar a estrutura lignocelulósica, preservar as frações de pentose (hemicelulose), limitar a formação de inibidores das etapas de hidrólise enzimática e fermentação e ser capaz de reciclagem (BINOD et al., 2012). Um agente de pré-tratamento que respeite todos os requisitos exigidos, poderia tornar a produção do etanol celulósico economicamente viável (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

3.5.1 Pré-tratamento com ultrassom

O uso do ultrassom como pré-tratamento de biomassa, vem se tornando comum nos últimos 5 anos. Normalmente, esse pré-tratamento é combinado com outro pré-tratamento, buscando otimização da sacarificação enzimática (ZHANG et al., 2016).

O ultrassom funciona por um mecanismo acústico com ondas que se propagam na direção da biomassa, em uma frequência de 10 kHz a 20 MHz, transmitindo energia para o meio reacional, que causa cavitações na biomassa através de microbolhas com um diâmetro médio de 4 a 300 μ , criando maior acesso dos reagentes dentro das cavitações formadas.

Quando as frequências de ressonância das bolhas ultrapassam o campo do ultrassom, as bolhas entram em colapso se chocando de uma forma descoordenada em uma velocidade maior que 100 m/s. Esse colapso de bolhas faz com que o fluído se choque contra o material em pré-tratamento com uma pressão de até 10 MPa (LUO; FANG; SMITH, 2014).

Esse pré-tratamento também pode ser usado em conjunto com a hidrólise enzimática, pois a persistência dos choques abre a superfície do sólido em que, posteriormente, as ondas transportam as enzimas por convecção para dentro das aberturas acelerando a cinética de reação (ZHANG et al., 2016). Outra vantagem é que o ultrassom costuma trabalhar em uma temperatura em torno de 50 °C, considerada como temperatura ótima de muitas enzimas utilizadas na hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos (CHEN et al., 2017).

3.5.2 Pré-tratamento ácido

Entre os pré-tratamentos ácidos, o ácido sulfúrico diluído tem sido considerado como um dos métodos mais rentáveis e o mais favorável para aplicação em indústria, pois durante o ataque químico o ácido diluído hidrolisa parte dos polissacáridos, principalmente hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002).

O pré-tratamento ácido, normalmente é utilizado em baixas concentrações (<4% m/m) e sob temperatura controlada, pois este processo em altas concentrações combinado com altas temperaturas gera produtos de degradação a partir dos açúcares livres resultantes do pré-tratamento, como a partir de pentoses que podem se degradar em furfural e as hexoses que podem se degradar em 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) (CANILHA et al., 2011; KARP et al., 2013).

Tanto o furfural como o HMF quando produzidos representam perda de rendimentos de açúcares fermentáveis e elevação do custo de produção de etanol, uma vez que são indesejáveis para a etapa de fermentação, pois são inibidores fermentativos, tornando necessária a remoção (KOOTSTRA et al., 2009; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Os estudos realizados por Chen et al. (2017) relatam que a concentração de ácido e a temperatura possuem um efeito significativo no rendimento de xilose e o mesmo efeito não é significativo na concentração de sólidos. Os autores ainda relatam que foi possível obter um rendimento de 90% de xilose e uma baixa produção de furfural, em pré-tratamento com ácido sulfúrico 0,1% a 180 °C, com uma carga de sólidos de 7,5%. Outros ácidos também têm sido utilizados em estudos de pré-tratamento como os ácidos clorídrico, nítrico, fosfórico e o ácido oxálico (KARP et al., 2013; CHEN et al., 2017).

Mesmo com bons resultados, tem-se buscado alternativas para o pré-tratamento ácido, pois além da produção de inibidores, outro problema em usar ácidos como pré-tratamentos de lignocelulósicos é o alto custo do ácido (em grandes concentrações) e a sua recuperação, bem como a necessidade de equipamentos resistentes a corrosão (ODEGA; PETRI, 2010).

3.5.3 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é um processo bem conhecido na indústria de papel e celulose. Normalmente é possível a obtenção de grandes taxas de deslignificação, mas para a polpação de material lignocelulósico se faz necessário altas concentrações de NaOH e temperatura elevada, podendo resultar na degradação da celulose e hemicelulose (conhecidamente como reações de peeling), em que os açúcares redutores são convertidos em ácidos orgânicos (NAKANISHI et al., 2018).

As bases têm sido estudadas como alvo de um pré-tratamento, pois pode remover a lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos hidratos de carbono e removendo os grupos acetil e ácidos urônicos nas hemiceluloses, favorecendo o acesso das enzimas às hemiceluloses. O grau de acetilação é importante na digestão enzimática das hemiceluloses, uma vez que os grupos acetil juntamente com a lignina, encontram-se ligados ao esqueleto das hemiceluloses podendo dificultar sua hidrólise (KARP et al., 2013).

O pré-tratamento alcalino provoca um intumescimento, aumentando a área de superfície interna da biomassa pré-tratada. Esse fato, é possível devido à solvatação e as reações de saponificação que reduzem as forças intermoleculares e assim tornando as moléculas mais reativas, pois há um afastamento das ligações entre as cadeias de lignina, hemicelulose e celulose. Portanto, ao longo do fenômeno de intumescimento, há uma redução simultânea do grau de polimerização (DP) e da cristalinidade da celulose (KARP et al., 2013; CABRERA et al., 2015).

Acredita-se, que o mecanismo de reação dos álcalis na biomassa seja por meio da saponificação e solvatação. Esses mecanismos podem levar a ruptura das ligações cruzadas ésteres que reticulam as hemiceluloses e a lignina, causando a deslignificação, aumentando assim, a porosidade do material pré-tratado (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; KARP et al., 2013).

Comparando os pré-tratamentos básicos e ácidos, o alcalino (baixas concentrações) possui a vantagem de ter uma baixa degradação dos polissacarídeos. Em condições brandas (temperatura, pressão e concentração de reagente) esse pré-tratamento não forma inibidores para etapas de hidrólise enzimática ou fermentação. Também a maior parte dos sais cáusticos podem ser

recuperados ou regenerados no final do pré-tratamento, dependendo da base utilizada (CANILHA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Porém, existe a desvantagem de perda parcial dos açúcares contidos na hemicelulose e algumas bases podem ser convertidas em sais irre recuperáveis ou são incorporadas como sais na biomassa através das reações (BALAT, 2011; RABELO et al., 2011; KIM, 2018).

Em comparação com outros tipos de pré-tratamento como AFEX, organosolv, líquidos iônicos, o processo de pré-tratamentos alcalino seria muito mais simples, pois utiliza temperaturas e pressões baixas e podendo até ser realizado em circunstâncias ambiente sem a necessidade de qualquer equipamento especial, mas a desvantagem é que em condições brandas esse pré-tratamento pode levar horas ou dias (BALAT, 2011; KIM, 2018; CABRERA et al., 2015).

Os álcalis mais utilizados para a deslignificação da biomassa são hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e ureia. Embora o hidróxido de sódio seja o mais eficiente na digestibilidade da biomassa, existe certa dificuldade em sua reciclagem, e ainda é uma base relativamente cara. A amônia, possui a vantagem de ser volátil, portanto, facilmente reciclada, mas é considerado um agente de pré-tratamento caro e representa um risco maior para manipulá-la. A ureia é um agente de fácil manipulação, mas é considerada um produto de alto custo e baixa deslignificação em comparação com outros álcalis (Xu et al., 2007; RABELO et al., 2011; CHATURVEDI; VERMA, 2013).

3.5.4 Pré-tratamento com solventes orgânicos (organosolv).

O uso do pré-tratamento com solventes orgânicos para obtenção de celulose, deu-se inicialmente na indústria de papel. No pré-tratamento por organosolv são utilizados solventes orgânicos, normalmente em temperaturas entre 100 a 200 °C, diluídos, possibilitando um ajuste da polaridade do solvente.

Esse pré-tratamento é aplicado o conceito de fracionamento por solvente que hidrolisa parcialmente vários componentes da parede celular vegetal e assim resulta em uma pasta de celulose. O organosolv atua nas ligações internas da lignina e hemicelulose, fazendo com que esses componentes sejam extraídos juntos com o solvente, promovendo um aumento na área superficial e no volume do material.

Esse processo, além de aumentar a porosidade da biomassa, facilita a entrada do coquetel enzimático, promovendo assim, maior rendimento dos açúcares fermentais (CANILHA et al., 2012; TERAMURA et al., 2016).

Os solventes mais comumente usados são etanol, metanol, acetona, etileno glicol e álcool tetraidrofurfurílico na presença ou não de catalizadores ácidos ou básicos (HCl, H_2SO_4 ou NaOH) (KARP et al., 2013; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Os catalisadores ácidos e básicos dão maior seletividade pelas ligações internas da lignina e/ou hemiceluloses, possibilitando uma celulose mais pura. (ODEGA; PETRI, 2010; MESA et al., 2016).

Esse processo é ideal para altos rendimentos na recuperação de lignina. Normalmente visando a transformação de produtos aromáticos oxigenados, e a recuperação de polioses (hemicelulose) do licor. O organosolv ainda possui a capacidade de reciclar o solvente por destilação. No entanto, a reciclagem é o principal gargalo, pois é uma etapa de custo elevado e esses solventes atuam como inibidores das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, sendo necessário sua total remoção (KARP et al., 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; CHEN et al., 2018).

3.5.5 Pré-tratamento por explosão de vapor

A explosão de vapor é um dos métodos mais comuns para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). No pré-tratamento por explosão de vapor a biomassa triturada é submetido a um vapor saturado a temperaturas entre 160 e 260 °C, sob altas pressões de 0,69 a 4,83 MPa, em que pode existir ou não adição de produtos químicos (catalisadores) como NaOH, H_2O_2 , H_2SO_4 , SO_2 e CO_2 . O tempo de residência também pode variar de segundos a minutos. Em seguida, a pressão é retirada subitamente, exercendo uma pressão negativa (descompressão) explosiva (KARP et al., 2013).

Esse processo físico-químico provoca a ruptura da estrutura da biomassa, degradação da hemicelulose e transformação da lignina, facilitando a hidrólise enzimática subsequente da celulose. Segundo Maurya, Singla e Negi (2015), somente a combinação de temperatura (160-260 °C) e pressão pode causar um fenômeno de auto hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose, o qual forma o ácido acético que acaba ajudando quimicamente no processo do pré-tratamento.

Devido a este fato, a explosão a vapor é reconhecida como um dos processos mais eficazes para redução de custos em madeiras duras e resíduos agrícolas, mas é menos eficaz para madeiras moles devido ao baixo conteúdo dos grupos acetil na porção hemicelulósica de madeiras moles (MESA et al., 2016).

Os catalizadores possuem nesse processo, a característica de limitar a formação de compostos de inibição da hidrólise enzimática, uma vez que permitem trabalhar sob temperaturas e tempo de residência menores (MODENBACH; NOKES, 2012). Os pontos negativos desse pré-tratamento é a formação de produtos de degradação que podem inibir a fermentação e a necessidade de uma etapa adicional para a remoção da lignina (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

3.5.6 Pré-tratamento Expansão de Fibra com Amônia (AFEX)

A expansão de fibra com amônia (AFEX) é um pré-tratamento termal alcalino muito semelhante à explosão de vapor, mas nesse caso temos amônia líquida anidra que é submetida a uma pressão que pode variar de 1 a 5,2 MPa, sob uma temperatura entre 90 e 100 °C. O tempo de residência necessário é menor que 30 min, em que posteriormente a pressão exercida é retirada abruptamente, ocasionando a expansão do gás de amônia, o qual existe uma variação muito rápida de temperatura. Essa variação de temperatura é responsável por quebrar as ligações éster e outras ligações complexas contidas na estrutura fibrosa da biomassa (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; KARP et al., 2013; CHEN et al., 2017).

Em comparação com a explosão de vapor, o AFEX exige condições mais brandas (temperatura, pressão), pois o ponto de ebulição da amônia é baixo, deixando um resíduo sólido ao invés de uma pasta como na explosão de vapor. Porém, devido a esse fato, o AFEX não chega a quebrar a estrutura lignocelulósica, apenas abre esse complexo aumentando a área superficial dos polímeros e com baixa solubilidade de hemicelulose (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Este processo traz uma vantagem de reduzir a cristalinidade da celulose, não produzir inibidores fermentativos, retém boa quantidade de polissacarídeos e aumentando os poros na parede celular. Sendo assim, o AFEX possibilita maior acessibilidade por enzimas e ao final do processo, a amônia pode ser recuperada para ser usada novamente (CANILHA et al., 2012; CHEN et al., 2017).

A digestão enzimática em baixas cargas enzimáticas também mostra melhor resultado que outros processos de pré-tratamento (CHEN et al., 2017). Esse fato, faz com que o AFEX seja considerado o pré-tratamento alcalino com melhor resultado de açúcares redutores (80-90%), demonstrando ser menos eficaz em biomassa com alto teor de lignina, como matérias-primas de fibra curta e madeira dura (CHATURVEDI; VERMA, 2013; CHEN et al., 2017). A desvantagem do AFEX é a necessidade de grandes quantidades de amônia tornando esse processo em geral caro, o que faz necessário a reciclagem do reagente, tanto por questões ambientais quanto para redução de custos (CHEN et al., 2017).

3.5.7 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico submete a biomassa a elevadas temperaturas entre 170 e 230 °C. Para a água se manter no estado líquido nesta temperatura, é necessária uma pressão acima de 5 MPa, por um período de residência de até 15 min (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

Este processo químico não utiliza um catalisador, mas em elevadas temperaturas e pressão promove a auto hidrólise do material, o que acarreta a formação de ácido acético e outros ácidos orgânicos. Tais produtos podem atuar como catalisadores no processo de pré-tratamento (WAN; ZHOU; LI, 2011).

Quando esses ácidos são liberados promovem uma catálise, responsável por quebrar em oligossacarídeos. No entanto, esses açúcares podem sofrer degradação e resultar na formação de furfural e 5-hidroxi-metil-furfural (5-HMF) e outros produtos considerados inibidores para hidrólise enzimática e fermentação (MOSIER et al., 2005). Devido a este fato, o processo pode ser feito com o pH controlado entre 4 e 7, visando reduzir os inibidores fermentativos, que necessitam da utilização de bases (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

De modo geral o pré-tratamento hidrotérmico apresenta baixo custo, pois não é necessário nenhum tipo de produtos químicos ou equipamento resistente a corrosão. Em comparação com a explosão de vapor há uma maior recuperação de pentose e menor formação de componentes inibitórios. No entanto, a alta exigência de energia e demanda de água inviabiliza esse processo em escala industrial (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Para o alto rendimento da produção de etanol,

seria ideal que não houvesse grandes perdas de hemicelulose como há no pré-tratamento hidrotérmico.

3.5.8 Pré-tratamento biológicos

Os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos e algumas bactérias. Estes micro-organismos possuem a capacidade de secretar enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover uma grande quantidade de lignina e hemiceluloses. Neste ataque, a celulose se mantém quase que intacta, devido à sua maior resistência aos ataques biológicos (ODEGA; PETRI, 2010).

Em estudos voltados para área de biodeslignificação, os fungos mais estudados são do tipo podridão brancos (white-rot-fungus-WRT). Essa espécie degrada seletivamente a lignina e tem pequeno impacto sobre os polissacarídeos sendo às seguintes espécies: basidiomicetos (*Phaenerochaete chrysosporium*, *Cyathus stercoreus*, *Trametes versicolor*, *Pycoporous cinnabarinus*, *Cyathus bulleri*, *Coriolus versicolor*, *C. subvermispora*) (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012; LUO; FANG; SMITH, 2014; MORENO et al., 2015).

Existem quatro grupos principais de enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos de podridão branca: lignina peroxidase (LiP; 1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3-diol: peróxido de hidrogênio oxidorreductase), Peroxidase (MnP; Mn (II): peróxido de hidrogênio oxidoreductase, ou peroxidase de manganês), peroxidase versátil e lacase (benzenodiol: oxigenase oxidorreductase). No entanto, o processo de biodegradação da lignina pode ser ainda melhorado pela ação de outras enzimas mediadoras, tais como a glioxal oxidase, a aril álcool oxidase (álcool veratrilo oxidase), piranose 2-oxidase (glucose 1- Oxidase), celobiose /quinona oxidorreductase e celobiose desidrogenase (KARP et al., 2013; MORENO et al., 2015).

Este pré-tratamento é visto como o método menos agressivo à natureza, pois é realizado totalmente na ausência de reagentes químicos, com temperatura e pressão ambiente. Outra vantagem é que não há formação de inibidores fermentativos, mas em contrapartida, esse método requer muito tempo para o material ser tratado (4 a 6 semanas) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

3.5.9 Pré-tratamento com Agentes Oxidantes

O pré-tratamento com agentes oxidantes é também conhecido como deslignificação oxidativa. Para esse processo, as técnicas mais comumente utilizadas são: oxidação por peróxido de hidrogénio em meio alcalino, oxidação úmida, ozonização e a utilização da reação de Fenton para oxidação da biomassa (JUNG et al., 2015; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Embora ainda seja um método relativamente menos explorado em comparação aos outros pré-tratamentos, vem se expandindo de forma contínua, devido às suas características, que permitem trabalhar com uma carga relativamente alta de sólidos (em média de 20 %) e pode ser operada em fluxo contínuo (MARTINS; RABELO; DA COSTA, 2015).

Além disso, a deslignificação oxidativa atua com oxidantes poderosos altamente reativos e, preferencialmente, atacam duplas ligações conjugadas e grupos funcionais com densidades eletrônicas elevadas. Portanto, presume-se que quando estes oxidantes poderosos são usados para um pré-tratamento em biomassa, preferivelmente ele irá atacar a lignina, que possui alto conteúdo de C=C limites (SUN; CHENG, 2002; CANILHA et al., 2012; CHATURVEDI; VERMA, 2013).

Em comparação ao pré-tratamento ácido, foi relatado que os agentes oxidativos são mais eficientes na remoção de lignina. No entanto, o pré-tratamento com ácido diluído é mais eficiente na solubilização da hemicelulose (GALBE; ZACCHI, 2002; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

A oxidação úmida (wet oxidation) é uma pré-tratamento hidrotérmico e oxidativo que utiliza o oxigénio ou o ar como catalisador (KARP et al., 2013). Esse pré-tratamento é realizado com uma matéria seca de 5 a 20%, tempo de residência relativamente curto (inferior a 30 min), temperatura acima de 120 °C e pressão entre 0,5 e 2 MPa de O₂ (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

A vantagem da oxidação úmida é permitir a obtenção de alto rendimento na conversão da biomassa em monossacarídeos. Com isso produz baixa quantidade de furanos e aldeído fenólicos quando combinado com álcalis. Porém, essa técnica possibilitou uma remoção parcial da hemicelulose sem um aumento correspondente na recuperação de açúcares na fração líquida e sua principal desvantagem é por ser

um processo considerado caro (CANILHA et al., 2012; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Quando em condições ácidas a oxidação úmida não se mostra vantajosa, devido à formação de inibidores para hidrólise enzimática e fermentação.

A ozonização usa-se ozônio (O_3) como um agente oxidativo poderoso, solúvel em água, que pode ser usado para degradar a lignina, pois preferencialmente irá atacar a estrutura de anéis aromáticos e dessa forma obter a hemicelulose e celulose sem ser afetada. Esse pré-tratamento além de remover a lignina não produz compostos tóxicos às etapas posteriores, e sua condição de trabalho é ambiente. Sua desvantagem é a grande quantidade de ozônio necessária, o que torna o processo caro (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

O H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) é o agente oxidante mais comumente utilizado por possuir um baixo custo, em comparação com os outros métodos oxidativos. Sua aplicabilidade é comum para o branqueamento na indústria da pasta e papel, diminuindo o impacto ambiental causado por agentes como cloro no processo de branqueamento (SUN; CHENG, 2002). O uso do H_2O_2 possui dissolução da lignina em cerca de 50%, com uma boa recuperação de hemicelulose numa solução de 1 a 2% de H_2O_2 , a 25-30 °C, em um tempo 8 h, proporcionando uma maior acessibilidade a celulose com 95% de eficiência na hidrólise enzimática a 45 °C. Estes resultados são geralmente cinco vezes maiores ao do tratamento com hidróxido de sódio (NaOH), sem adição de H_2O_2 (CHATURVEDI; VERMA, 2013; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

Em busca de melhorias, alguns pesquisadores também tentaram combinar o pré-tratamento com H_2O_2 e pré-tratamento alcalino para recuperação significativa de açúcares redutores (SUN; CHENG, 2002; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2013). Altas concentrações de glicose (374 mg/g de bagaço de cana-de-açúcar) foram obtidas a partir de um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino com 7,5% (v/v) de peróxido de hidrogênio em um pH 11,5 ajustado com hidróxido de sódio a 25 °C por 1 h por Rabelo et al. (2011).

Quando o peróxido de hidrogênio se encontra em um meio com o pH elevado, são produzidos ânions hidroperóxido (HOO^-) que podem originar radicais hidroxila (HO^-) e radicais de ânions superóxidos (O_2^-), que atacam preferencialmente os grupos etileno (CH_2 e C_2H_4) e carbonílicos ($C=O$) da lignina. Esse fato causa várias reações como substituição eletrofílica, deslocamento de cadeias laterais, clivagem

de ligações alquilo/éter arílico ou a clivagem oxidativa de núcleos aromáticos (PAN et al., 1998; FANG et al., 1999; SUN et al., 2004).

O peróxido de hidrogênio também é muito reativo com açúcares levando a um aumento da sua solubilização. Este efeito pode ainda ser incrementado com o aumento da temperatura. A principal desvantagem peróxido de hidrogênio em meio alcalino é que os custos dos pré-tratamentos combinados são altos em relação a um único pré-tratamento (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

Embora o peróxido de hidrogênio seja um oxidante poderoso, a sua cinética de reação é lenta, podendo levar dias o pré-tratamento ausente de um catalizador. No entanto, a adição de íons Fe acelera o processo de decomposição da H_2O_2 em diferentes tipos de radicais hidroxila. Os íons de Fe agem, portanto, como catalisadores em uma reação conhecida como Fenton. Outros componentes também podem ativar o H_2O_2 e decompor em radicais hidroxilos como ozono, luz UV, que são considerados fortes oxidantes (NEYENS; BAEYENS, 2003; LI et al., 2016).

4 A QUÍMICA DO ÁCIDO BÓRICO EM MEIO ALCALINO

Em relação ao ácido bórico em meio alcalino (íons borato/tetraborato), não foram encontrados registros em sua utilização como um pré-tratamento para produção de etanol de segunda geração.

Segundo Roesky e Atwood (2003), à medida que se aumenta o pH da solução de ácido bórico, outras espécies de íons de boro começam a aparecer, sendo as mais importantes os ânions triborato $[B_3O_3(OH)_4]^-$ e $[B_3O_3(OH)_5]^{2-}$, pentaborato $[B_5O_6(OH)_4]^-$ e, predominante, a concentração de tetrahidroborato $[B_4O_5(OH)_4]^{2-}$ com o pH acima de aproximadamente pH 9 (figura 12).

Porém, é visto que a concentração das espécies também é dada devido à concentração de ácido bórico e temperatura, podendo alterar o perfil mostrado na figura 12. A formação dessas espécies químicas é um resultado direto da tendência do boro de formar complexos com espécies doadoras de elétrons.

Figura 12 - Distribuições populacionais de espécies de borato como fração do boro total para uma solução equivalente a 0,4 mol/L de ácido bórico a 25 °C.

Fonte: ROESKY, H. W.; ATWOOD, D. A. **Group 13 chemistry III: industrial applications**. Berlin: Springer, 2003. (Structure and Bonding, 105).

As muitas espécies químicas derivadas do ácido bórico (figura 12) são importantes como um pré-tratamento, pois é esperado que diferentes espécies químicas possam reagir de uma forma diferente com os componentes da biomassa. Chen et al., 2018 realizou um estudo em que avalia o efeito do ácido bórico na lignina de trigo resultante de um pré-tratamento alcalino. Basicamente, ele aplicou diferentes concentrações de ácido bórico no licor negro (livre de monossacarídeos) e avaliou o grau de despolimerização da lignina, junto ao rendimento dos produtos monofenólicos.

Apesar de explorar apenas a concentração de ácido bórico, Chen et al., 2018 obteve aumento substancial no grau de despolimerização da lignina e no rendimento dos produtos monofenólicos. Esse aumento foi devido à formação do éster de borato pela reação do ácido bórico com a hidroxila fenólica atuando assim como um agente complexante da lignina.

Esse fato pode impedir reações de repolimerização da lignina que ocorreu naturalmente após o pré-tratamento, pois a macromolécula lignina foi despolimerizada. Chen et al. (2018) ainda relatou que moléculas de lignina mais pesadas possuem menores quantidades de hidroxila fenólica, necessitando assim de menor quantidade de ácido bórico para reagir.

Portanto, o ácido bórico se mostra promissor como um agente complexante da lignina para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, com intuito da disponibilização da celulose e hemicelulose para produção de etanol de segunda geração. Trabalhar com ácido bórico em uma maior faixa de pH representa aumentar as possibilidades de espécies que poderão reagir com a lignina e atuar em conjunto com NaOH.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REPARAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A palha de soja *Glycine max* foi coletado na USP-FZEA, Pirassununga, Brasil. O material coletado foi seco em uma estufa agrícola sob 45 °C e por um período de aproximadamente 96 h. Em sequência, o material foi moído em um moinho de corte rotativa de alta velocidade modelo TECNAL tipo Willey para obtenção de frações de granulometria reduzida (menores que 1,0 mm).

5.2 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DA PALHA DE SOJA

A análise granulométrica possibilitou descobrir o perfil granulométrico da amostra, uma importante resposta, uma vez que a superfície de contato é um fator importante para os pré-tratamentos.

Resumidamente, transferiu-se aproximadamente 100,00 g da palha de soja moída na parte superior da série de peneiras Mesh Tyler da marca Granutest (10, 14, 20, 28, 35, 48, 80, 100, 150, 200, 325), previamente pesadas, sequenciadas da maior abertura para menor. O agitador eletromagnético da marca Bertel foi ajustado para operar por um período de 15 minutos. Ao término desse período as peneiras foram pesadas e por diferença foi possível determinar a massa retida (HAMES et al., 2008). Este mesmo procedimento foi repetido até atingir quantidade de biomassa superior a 2,5 kg.

Após a análise do perfil granulométrico (Equação 1), todas as frações foram misturadas e quarteadas em porções de 50 g para garantir a homogeneidade amostral. Em seguida as amostras foram armazenadas em um freezer para posterior caracterização quanto ao teor de cinzas, extratíveis, lignina insolúvel, lignina solúvel, celulose, hemicelulose.

$$\bar{D}_m = \sum x_i d_{pi} \quad \text{Eq.(1)}$$

D_m = diâmetro médio mássico.

d_{pi} = abertura livre da peneira.

x_i = fração mássica.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

A análise da composição da biomassa foi conduzida seguindo o “Laboratory Analytical Procedure (LAP)” preconizada pelo “National Renewable Energy Laboratory – NREL” (SLUITER et al., 2012). A seguir tem-se a descrição de cada etapa envolvida na caracterização.

5.3.1 Extratíveis

A extração de produtos não estruturais foi executada em equipamento Soxhlet utilizando-se 5,0000g de biomassa acondicionadas em filtro previamente seco e pesado. Para a primeira extração foi utilizado como solvente 190,0 ml de água deionizada por um período de 8 horas. Posteriormente, houve uma nova extração com 190,0 ml de etanol (95%) para remoção dos produtos não estruturais remanescentes por um novo período de 8 h. Em ambas as extrações a taxa de sifonagem utilizada foi de 4 a 5 por hora. Após 24 h a 45 °C a amostra (filtro e biomassa) foi pesada e a porcentagem de extratíveis determinada por diferença com relação à massa do filtro vazio e seco (SLUITER et al., 2005b).

5.3.2 Análise de umidade

A análise de umidade permite saber a quantidade de água e produtos voláteis na biomassa. A umidade e sólidos totais foram determinados transferindo-se 2,0000 g de biomassa para um béquer de 100 ml previamente seco, sendo o conjunto mantido em estufa a 105 °C até atingir massa constante. As perdas de massa foram monitoradas a cada 24 h, utilizando-se um tempo de resfriamento de 1 hora em dessecador antes das pesagens em balança analítica. O valor de umidade e sólidos

totais foi obtido pela diferença entre o peso inicial e final e calculado sua porcentagem (SLUITER et al., 2008).

5.3.3 Teor de Cinzas na biomassa

Para determinação das cinzas (teor de inorgânicos na amostra) utilizou-se 2,0000 g da amostra acondicionada em cadinho de porcelana previamente seco; o conjunto foi aquecido em forno mufla (MARCONI-MA385) seguindo programação de temperatura sugerida por Sluiter et al. (2005a): 105 °C por 12 minutos, aquecimento até 250 °C (taxa de 10 °C/min), manutenção em 250 °C por 30 minutos, aquecimento até 575 °C (taxa de 20 °C/min) e manutenção em 575 °C por 180 minutos. Após o tempo de aquecimento o conjunto foi mantido em mufla para resfriamento até cerca de 150 °C e posteriormente resfriado em dessecador até temperatura ambiente, procedendo-se então a pesagem.

5.3.4 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida da amostra extraída possibilita determinar os carboidratos totais e teores de lignina solúvel e insolúvel, seguindo a metodologia executada por Sluiter et al. (2012). Resumidamente, foram adicionados 3,00 ml de ácido sulfúrico 72% (m/m) a cada tubo de ensaio contendo 0,3000 g da amostra, os tubos foram levados para um banho térmico a 30 °C por 60 minutos, e a cada 5 minutos as amostras foram agitadas usando um bastão de vidro, sem remover a amostra do banho.

Ao término dos 60 minutos transferiu-se as amostras para um frasco com tampa de teflon, adicionou-se 84,00 ml de água destilada para diluir a concentração de ácido para 4% (m/m). O frasco devidamente tampado foi aquecido em autoclave (Phoenix Lufanco) a 121 °C por 1 hora. Após resfriamento, o hidrolisado ácido foi filtrado para separação da fração sólida (medida de lignina insolúvel em ácido) e líquida (medida de lignina solúvel em ácido e carboidratos). Para análise de carboidratos neutralizou-se cerca de 20 ml do líquido filtrado através da adição CaCO_3 sólido até se atingir pH entre 5-6; as amostras foram armazenadas em

freezer (-20°C) até análise dos açúcares pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

5.3.5 Lignina insolúvel, lignina solúvel e carboidratos estruturais

Para mensurar a lignina insolúvel em ácido (AISL), a solução resultante da hidrólise ácida foi filtrada a vácuo em um filtro de vidro sinterizado número 4 (10 a 16 micras) e lavado com 2 L de água destilada, em seguida foi levado para uma estufa a 105 °C por 24 h. Ao término das 24 h o cadinho contendo o resíduo insolúvel foi resfriado em um dessecador por 1 hora e pesado. O processo foi repetido até a amostra atingir massa constante. A massa constante do material é determinada quando o peso registado entre duas pesagens sucessivas apresenta uma diferença inferior a 10 mg. Ao término desse procedimento as amostras foram armazenadas em um dessecador para análise do teor de cinzas insolúvel em ácido (SLUITER et al., 2012).

O hidrolisado solúvel em ácido foi utilizado para análise de lignina solúvel (ASL) em um espectrofotômetro de UV-Vis modelo Digimed DM-ESPEC a 320 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina do bagaço de cana-de-açúcar. Todas as análises foram realizadas em triplicata para se obter uma média e um coeficiente de variação.

As concentrações dos carboidratos originados da hidrólise da celulose (glicose e celobiose) e hemicelulose (xilose, manose e galactose) foram determinadas por HPLC de acordo com metodologia sugerida por Sluiter et al. (2012). Utilizou-se uma coluna Aminex HPX-87P (BioRad) em série com uma pré-coluna equipada com cartuchos de troca catiônica e ânionica (coluna “deashing”) – a coluna foi termostatizada a 80 °C e a vazão de fase móvel (água deionizada) foi de 0,600 ml/min. O volume de injeção utilizado foi de 20 µl e a detecção realizada com detector de índice refração (termostatizado em 50 °C), sendo as quantificações efetuadas através de curvas de calibração com 5 pontos na faixa de 0,1 a 4 mg/ml. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.3.6 Teor de Cinzas do resíduo insolúvel em ácido

O resíduo sólido obtido após filtração e lavagem foi calcinado em mufla na temperatura de 575 °C, seguindo a rampa de aquecimento sugerida por Sluiter et al. (2005a) – vide item 5.3.3. Na etapa de resfriamento o cadinho foi mantido em mufla (até 105 °C) e posteriormente resfriado em dessecador. O procedimento foi repetido até se atingir uma diferença máxima de 10 mg entre pesagens sucessivas. A lignina insolúvel foi determinada pela diferença entre a massa do resíduo sólido antes da calcinação e após calcinação (Equação 2).

$$\%Cinzas = \frac{MC}{MA} \times 100 \quad \text{Eq.(2)}$$

Onde:

% Cinzas – percentual em massa de cinzas.

MC – Massa de cinzas (em g).

MA – Massa da amostra de bagaço seca (em g).

5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA BIOMASSA

A caracterização estrutural e morfológica da biomassa se deu através das técnicas de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise termogravimétrica (TG/DTG).

5.4.1 Infravermelho com Transformada de Fourier

As amostras de palha de soja (antes e após pré-tratamento) foram analisadas através de espectroscopia de infravermelho (FTIR) visando a caracterização dos grupos funcionais presentes, bem como avaliar possíveis modificações provocadas pelos pré-tratamentos. A interpretação dos espectros de FTIR foram baseadas nos

artigos de Xu et al. (2013), LIU et al. (2015b, 2016) Zhang, Wu (2015), Huang et al. (2016) e Qing et al. (2017).

Os espectros de FTIR foram adquiridos entre 4000 e 500 cm^{-1} utilizando um espectrofotômetro modelo Perkin Elmer – Spectrum One, operando na modalidade refletância total atenuada (ATR), com uma resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 40 espectros. Os espectros foram interpretados e comparados após correção de linha de base e normalização com o auxílio do software OriginLab 2019.

5.4.2 Difração de Raios-X

A utilização da técnica por difração de raio-x (DRX) possibilitou a determinação da porcentagem de fase cristalina (região empacotada e organizada da celulose) através do cálculo de índice de cristalinidade (XU et al., 2007; REDDY; YANG, 2009). A modificação do índice de cristalinidade do material lignocelulósico pode ser um importante indicativo de que houve mudanças na estrutura da biomassa pré-tratada (PARK et al., 2010).

Os difratogramas foram obtidos através do equipamento MiniFlex 600 (Rigaku International Corporation) operando na faixa de 2θ de 5° a 65° com velocidade de varredura angular de $1^\circ/\text{s}$. A radiação utilizada foi a da linha Cu-Ka, gerada à partir de uma tensão de aceleração dos elétrons no tubo de 40 kV e corrente elétrica de 15 mA. O índice de cristalinidade foi calculado a partir da equação 3 (ZHANG; ZHU, 2016).

$$\text{Cris} = [(I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}] \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

Cri = indica o índice de cristalinidade.

I_{002} = é a intensidade da difração no plano (002) em $2\theta = 22,92^\circ$.

I_{am} = a intensidade da difração em $2\theta = 18,60^\circ$.

5.4.3 Análise morfológica da palha de soja

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou observar as características longitudinais da biomassa, bem como as modificações morfológicas ocasionadas pelo pré-tratamento nas fibras de palha de soja. As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico modelo HITACHI TM3000. A amostra foi colocada sobre fita de carbono e em seguida deu-se sequência na análise sob um vácuo de aproximadamente 10^{-6} Torr e tensão de aceleração do feixe de elétrons de 15 KV (REDDY; YANG, 2009; ASSUMPÇÃO et al., 2016).

5.4.4 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas (TG) podem fornecer informações sobre a composição lignocelulósica das amostras (efetividade do pré-tratamento sobre a deslignificação da palha de soja) através do comportamento de perda de massa (degradação) em função da temperatura. As análises foram conduzidas em cadinho de alumina sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 50 ml/min) na faixa de temperatura de 25 até 900 °C (taxa de 10 ° C/min), utilizando-se cerca de 8-12 mg de amostra (ZHANG; WU, 2015).

5.5 EXPERIMENTOS DE PRÉ-TRATAMENTO – METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A metodologia de superfície de resposta tem como principal objetivo obter equações preditivas (estatisticamente válidas) de uma determinada resposta em função dos fatores (variáveis) escolhidos para o estudo, podendo ser utilizada na descrição do comportamento de determinado processo frente às variáveis, bem como na obtenção de condições ótimas de operação. Neste estudo utilizou-se um Planejamento Composto Central (PCC) com 3 fatores (pH, concentração de ácido bórico inicial e tempo de reação), critério de rotabilidade de 1,68 e execução de sextuplicata no ponto central. Os valores dos níveis dos fatores estudados (reais e codificados) podem ser visualizados na matriz de experimentos da tabela 4. As respostas consideradas para o estudo foram: solubilização total de palha de soja

durante o pré-tratamento e concentrações de glicose e xilose após hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada.

Tabela 4 – Matriz de experimentos do planejamento de superfície de resposta - valores entre parênteses se referem aos valores dos níveis codificados.

Amostra	pH	[borato] - mol/L	Tempo - minutos
1	12,23 (1,000)	0,40 (1,000)	240 (1,000)
2	9,97 (-1,000)	0,40 (1,000)	240 (1,000)
3	12,23 (1,000)	0,40 (1,000)	120 (-1,000)
4	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	92 (-1,682)
5	9,27 (-1,682)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
6	13,00 (1,682)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
7	12,23 (1,000)	0,15 (-1,000)	240 (1,000)
8	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
9	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
10	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
11	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
12	9,97 (-1,000)	0,15 (-1,000)	120 (-1,000)
13	9,97 (-1,000)	0,40 (1,000)	120 (-1,000)
14	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
15	11,10 (0,000)	0,49 (1,682)	180 (0,000)
16	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	308 (1,682)
17	11,10 (0,000)	0,06 (-1,682)	180 (0,000)
18	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)
19	9,97 (-1,000)	0,15 (-1,000)	240 (1,000)
20	12,23 (1,000)	0,15 (-1,000)	120 (-1,000)

Fonte: própria autoria – gerada a partir do software Design Expert 10.

As análises de regressão de dados foram obtidas através do software Design Expert 10 (State-Ease Inc.) e utilizadas para expressar as respostas como equações polinomiais em termos dos fatores codificados. Na seleção de termos significativos

foi utilizada o método “backward”, que compara a significância de cada termo de forma isolada e posteriormente checa a interação entre os termos.

A análise de variância (ANOVA) possibilitou avaliar a significância do modelo matemático obtido, bem como sua capacidade de predição e falta de ajuste.

5.6 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

O pré-tratamento da biomassa foi do tipo hidrotermal em meio alcalino com a adição de ácido bórico, tendo sido conduzido com uma carga de 5% de sólidos (m/v). Para a execução dos experimentos pesou-se 5,0000 g de biomassa (previamente seca e quarteada) em balão de fundo redondo de 250 ml, em seguida foi adicionado 100,0 ml de solução de borato com concentração e pH ajustados de acordo com a tabela 4 – o valor do pH foi ajustado com NaOH. Após conexão a um condensador, submeteu-se o conjunto a aquecimento em manta sob condições de refluxo. O tempo (em minutos) de pré-tratamento de cada experimento foi estipulado de acordo com a matriz de experimentos da tabela 4.

Ao término do pré-tratamento a amostra foi filtrada por uma sequência de filtros (funil de Buchner, funil de vidro sinterizado nº 1 e nº 4) com auxílio de bomba de vácuo. Após medir o volume da fase líquida recuperada (licor), transferiu-se 10,0 ml para placas de Petri (triplicata) para determinação de sólidos solúveis. A correção dos sólidos solúveis gerados no processo de pré-tratamento foi feita subtraindo-se os sólidos solúveis presentes na solução de pré-tratamento (sais de borato e NaOH) sem nenhum contato com a biomassa (determinado em triplicata). A determinação de sólidos solúveis, tanto no licor obtido após pré-tratamento quanto na solução de pré-tratamento, foi feita pelo método de aquecimento em estufa a 105°C até peso constante.

A fase sólida do material retido no processo de filtração foi lavada com água destilada quente até atingir o pH da água utilizada (~2.5 L), em seguida o sólido lavado foi seco em uma estufa a 80 °C por 24 h. Após o tempo de secagem o material foi resfriado naturalmente em dessecador. Ao término de 1 h de resfriamento a biomassa foi pesada para calcular a massa final do sólido pré-tratado. As amostras foram armazenadas em dessecador até o início das análises posteriores (DRX, MEV, FTIR, TGA), bem como a hidrólise enzimática.

5.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE SOJA

Nos ensaios de hidrólise utilizou-se o coquetel enzimático comercial Cellic® CTec2 (Novozymes), tendo sido determinada sua atividade anteriormente ao início dos experimentos com biomassa (ADNEY; BAKER, 2008).

As hidrólises da palha de soja (bruta e pré-tratada) foram conduzidas na concentração de 5% (m/v) de sólidos e carga enzimática de 20 FPU/g de biomassa: em frasco Erlenmeyer de 125 ml pesou-se 2,5000 g de amostra aos quais foram adicionados 50,0 ml de uma solução composta por tampão citrato (pH 4,8, 50 mmol/l) e coquetel enzimático com atividade de 1 FPU/ml – resultando em 20 FPU/g de biomassa. Para efeito de correção da concentração de monossacarídeos já presentes no coquetel enzimático, também foram executados experimentos na ausência de biomassa (JUNG et al., 2015; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Após serem selados com rolha de borracha, os frascos foram incubados a 50 °C sob agitação orbital de 180 rpm durante um tempo total de 72h. Anteriormente às análises as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm e aquecidas a 95 °C por 5 minutos para inativação das enzimas. As amostras assim preparadas foram imediatamente analisadas ou armazenadas em freezer (-20 °C) para posterior determinação de carboidratos por HPLC – vide item 5.3.5 (LIU et al., 2015a; LI et al., 2016; ZHANG; ZHU, 2016).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

6.1.1 Distribuição granulométrica após moagem

A distribuição granulométrica obtida após moagem inicial (gráfico 2) mostra que o material obtido possui uma maior fração mássica em 35 mesh, o que pode ser atribuído às características da amostra bruta, uma vez que a palha coletada era constituída por caule, folhas e vagem, e estes podem apresentar diferentes comportamentos frente ao processo de moagem. Desta forma, optou-se por submeter o material a uma segunda moagem visando uma maior homogeneidade.

Os resultados preliminares de caracterização da biomassa após segunda moagem apresentaram altos valores de coeficiente de variação, tendo sido atribuídos a problemas relacionados a amostragem devido à falta de homogeneidade do material obtido, mesmo após a execução de uma segunda moagem. Para contornar este problema optou-se por selecionar a biomassa a ser estudada na faixa de granulometria entre 20 e 80 mesh, que apesar de restringir a utilização da biomassa, ainda representa uma grande fração com relação ao material bruto. A distribuição granulométrica dentro da faixa selecionada pode ser visualizada na tabela 5, bem como no gráfico 3.

Gráfico 2 - Distribuição granulométrica da palha de soja após moagem inicial

Fonte: Própria autoria.

Tabela 5 - Distribuição granulométrica da biomassa após segunda moagem.

Mesh	Massa (g)	Acumulativa	x_i %	d_{pi} (mm)	D_m (mm)
20	6,95	0	0,2589	0,833	0,437
28	163,39	170,34	6,0855	0,589	0,318
35	769,22	939,56	28,6496	0,417	0,310
48	456,65	1396,21	17,0080	0,295	0,234
80	497,54	1730,36	18,5309	0,175	0,142

Fonte: Própria autoria.

Gráfico 3 - Distribuição granulométrica da fração entre 20 e 80 mesh.

Fonte: Própria autoria.

Após a mistura das frações (20 a 80 mesh) e processo de quarteamento em amostras de 50 g, foram obtidos resultados satisfatórios nos coeficientes de variação das análises preliminares de caracterização da biomassa, e dessa forma deu-se continuidade aos estudos com a amostra assim preparada.

6.1.2 Caracterização Química da biomassa

Os resultados obtidos após caracterização da biomassa bruta (livre de umidade) segundo método preconizado pelo NREL (SLUITER et al., 2012) são apresentados na tabela 6 e gráfico 4.

Tabela 6- Composição química da palha de soja (ausente de umidade).

Caracterização da biomassa								
	Glicose (%)	Xilose (%)	Galactose (%)	Manose (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)
	42,72	18,51	1,99	2,28	21,48	1,46	10,41	2,6
CV	1,45	3,33	7,26	2,84	0,97	12,19	0,81	0,47

Fonte: Própria autoria.

Gráfico 4 - Caracterização da biomassa (ausente de umidade).

Fonte: Própria autoria.

Para efeito de comparação com dados relatados na literatura, converteu-se o teor de glicose em celulose (fator de conversão 0,9) e os teores dos outros monossacarídeos em hemicelulose (fator de conversão 0,9 para hexoses e 0,88 para pentoses) – (SLUITER et al., 2012).

Na tabela 7 são apresentados resultados de caracterização de palha de soja encontrados na literatura, de onde se pode observar que existe uma grande variabilidade, apesar dos resultados encontrados no presente trabalho estarem de acordo com os encontrados por Cabrera et al. (2015), Martelli-Tosi et al. (2017) e Qing et al. (2017). A variabilidade dos resultados pode ser atribuída à utilização de diferentes normas de caracterização (NREL, TAPPI, ASTM, entre outras), bem como a fatores climáticos, condições de cultivo e origem geográfica da biomassa.

Tabela 7 – Resultados de caracterização química de palha de soja descritos na literatura.

% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina	% Cinzas	Referências
25,0	11,9	17,6	-	(XU et al., 2007)
34,1	16,1	21,6	5,2	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
35,3	16,9	21,7	10,6	(CABRERA et al., 2015)
43,6	25,5	24,1	2,6	(LIU et al., 2015)
43,6	25,5	23,2	-	(LIU et al., 2016)
42,3	16,7	21,6	0,2	(QING et., 2017)
39,8	22,6	12,8	-	(MARTELLI-TOSI et al., 2017)
44,2	5,9	19,2	-	(KIM, 2018)
38,5	20,1	22,9	2,6	Este trabalho

Fator de conversão: $(C_6) * 0,9 = \text{Teor de celulose}$ e $(C_5) * 0,88 = \text{Teor de Hemicelulose}$.

Fonte: Própria autoria.

Na tabela 8 são apresentados dados de composição de diversos resíduos agroindustriais, de onde se podem estabelecer comparações quanto à viabilidade da palha de soja como matéria prima para a fabricação de etanol de segunda geração. O teor de lignina encontrada no presente trabalho figura como o quarto maior da tabela, no entanto, a quantidade de lignina não representa necessariamente um empecilho à sua utilização, pois de acordo Zhang et al.(2007) a recalcitrância do material lignocelulósico não está ligada somente ao teor de lignina, mas preponderantemente à forma como está arranjada tridimensionalmente junto à celulose e hemicelulose.

Tabela 8 - Caracterização de biomassas estudadas para produção de 2G.

	Material	(%) Lignina	(%) Holocelulose
Arroz	Casca de Grão	26,9	52,6
Café	Caule	22,9	65,5
	Folha	23,0	67,9
Cana-de-açúcar	Bagaço	20,9	46,6
	Palha	20,9	65,7
Feijão	Haste	21,6	66,2
	Vagem	12,0	63,2
Milho	Caule	20,5	64,8
	Folha	19,3	66,7
	Palha	9,3	83,3
	Sabugo	15,8	77,2
Madeira	Serragem	21,9	68,6
	Aparas de Plaina	20,6	73,7
Neste Trabalho	Palha de Soja	22,9	58,6

Holocelulose (Celulose + Hemicelulose).

Fonte: Adaptado RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.

Ao comparar o teor de holocelulose (celulose + hemicelulose) da palha de soja com a matéria prima de maior potencial para produção de etanol de 2G no Brasil (bagaço e palha de cana-de-açúcar), nota-se que a biomassa utilizada nesse trabalho possui maior quantidade de polissacarídeos potencialmente fermentáveis (tabela 9), pois em cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera-se 270 kg de bagaço e 140 kg de palha, ou seja, 65,9% dos resíduo lignocelulósico gerado é bagaço e 34,1% palha. Devido à grande produção anual de palha de soja no Brasil e no mundo (vide item 3.2), aliada aos teores de polissacarídeos presentes, a palha de soja se apresenta como uma boa alternativa para atuar em conjunto, ou substituir o bagaço de cana-de-açúcar na produção de 2G.

Tabela 9 – Comparativo entre o teor de holocelulose total nos resíduos agroindustriais de cana-de-açúcar e palha de soja.

	Material	(%) Lignina	(%) Holocelulose	% resíduo	% Holocelulose total
Cana-de-açúcar	Bagaço	20,9	46,6	65,9	53,1
	Palha	20,9	65,7	34,1	
Neste Trabalho	Palha de Soja	22,9	58,6		58,6

Fonte: Própria autoria e Adaptado RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.

6.2 ESTUDOS DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

As respostas utilizadas no planejamento de superfície de resposta compreendem a porcentagem de solubilização (massa seca do licor com relação à massa bruta utilizada para pré-tratamento), rendimento total de glicose, e rendimento total de xilose. Todas as análises estatísticas do planejamento de superfície de resposta realizadas nas seções subsequentes referem-se aos resultados apresentados na tabela 10. A numeração de cada experimento está de acordo com a ordem cronológica de execução (aleatória).

Tabela 10 - Matriz de planejamento de experimentos com resultados obtidos para porcentagem de solubilização, rendimento total de glicose e rendimento total de xilose (valores entre parênteses se referem aos níveis codificados dos fatores estudados).

Continua.

Fatores				Respostas					
Experimento	pH	[ácido bórico] mol/l	Tempo em Minutos	Sol. (%)		Rend. Glicose mg/g		Rend. Xilose mg/g	
				média	DP	média	DP	média	DP
1	12,23 (1,000)	0,40 (1,00)	240 (1,000)	20,5	0,5	167,7	1	57,7	0,3
2	9,97 (-1,000)	0,40 (1,000)	240 (1,000)	12,9	0,3	164,5	0,5	59,1	0,2
3	12,23 (1,000)	0,40 (1,000)	120 (-1,000)	14,1	0,7	166,3	1,3	63,6	0,5

continuação

Experimento	Fatores			Respostas					
	pH	[ácido bórico] mol/l	Tempo em Minutos	Sol.		Rend. Glicose		Rend. Xilose	
				(%)		mg/g		mg/g	
				média	DP	média	DP	média	DP
4	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	92 (-1,682)	9,2	0,3	182,7	0,7	63,2	0,2
5	9,27 (1,682)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	9,1	0,6	159	1,1	50,7	0,3
6	13,00 (1,682)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	20,4	1,9	215,9	5,2	68	1,6
7	12,23 (1,000)	0,15 (-1,000)	240 (1,000)	12,6	0,4	166,8	0,8	60,6	0,3
8	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	12,7	1,1	174,8	2,2	59,1	0,8
9*	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	16,4	0,4	-	-	-	-
10	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	10	0,8	184	1,6	63,2	0,6
11	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	10,2	0,2	181,8	0,4	61,7	0,1
12	9,97 (-1,000)	0,15 (-1,000)	120 (-1,000)	11,3	0,4	156	0,8	56,4	0,3
13	9,97 (-1,000)	0,4 (1,000)	120 (-1,000)	12,5	0,9	145,6	1,5	49,4	0,5
14	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	12,6	0,8	156	1,5	57,7	0,5
15	11,10 (0,000)	0,49 (1,682)	180 (0,000)	18,1	0,9	173,8	2	60,9	0,7
16	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	308 (1,682)	9,1	0,7	183,2	1,4	61,7	0,5
17	11,10 (0,000)	0,06 (-1,682)	180 (0,000)	8,5	0,1	105,7	0,1	16,2	0

continuação

Continuação									
Fatores				Respostas					
Experimento	pH	[ácido bórico] mol/l	Tempo em minutos	Sol.	Rend. Glicose		Rend. Xilose		
				(%)	mg/g		mg/g		
				média	DP	média	DP	média	DP
18	11,10 (0,000)	0,28 (0,000)	180 (0,000)	11,3	0,4	147,2	0,6	48,8	0,2
19	9,97 (-1,000)	0,15 (-1,000)	240 (1,000)	11,6	0,2	150,2	0,4	46,9	0,1
20	12,23 (1,000)	0,15 (-1,000)	120 (-1,000)	10,3	0,4	172,2	0,7	63,9	0,3

* Experimento do tipo ponto central desconsiderado após análise de outlier.

Fonte: Própria autoria.

6.2.1 Análise da porcentagem de solubilização da biomassa durante pré-tratamento

Os dados de porcentagem de massa solubilizada (tabela 10) foram analisados de acordo com metodologia de superfície de resposta utilizando-se o método “backward” para seleção de termos significativos. A equação resultante em termos dos fatores codificados pode ser visualizada na equação 4.

$$\%Sol. = 11,52 + 2,05A + 2,22B + 1,34A^2 \quad \text{Eq.(4)}$$

Onde:

%Sol.: porcentagem em massa solubilizada

A: valor de pH da solução de pré-tratamento

B: concentração de ácido bórico inicial na solução de pré-tratamento

A análise estatística (tabela 11) mostra que o modelo ajustado é significativo e não possui falta de ajuste. De acordo com a superfície de resposta ajustada (figura 13) é possível visualizar que a resposta tem a máxima inclinação (taxa de variação positiva) quando se aumentam os valores de pH e concentração de ácido bórico simultaneamente, sendo o fator pH responsável pelo comportamento quadrático.

Tabela 11 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo ajustado para a resposta porcentagem de massa solubilizada.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Prob>F
Modelo	150,2	3	50,1	9,3	0,0010*
pH	57,5	1	57,5	10,7	0,0051
[ácido bórico]	67,2	1	67,2	12,5	0,0030
[pH] ²	25,5	1	25,5	4,7	0,0455
Resíduos	80,5	15	5,4		
Falta de ajuste	74,0	11	6,7	4,1	0,0918**
Erro puro	6,5	4	1,6		
Total	230,7	18			
R ²	0,6510				
R ² _{ajustado}	0,5812				

* Significativo; ** Não significativo

Fonte: Própria autoria.

Como é conhecido na literatura maiores valores de pH implicam numa maior solubilização de lignina (desejável para um pré-tratamento eficiente), porém também podem implicar numa maior solubilização de hemicelulose, e conseqüentemente em perda de açúcares potencialmente fermentescíveis pós-hidrólise enzimática (BALAT, 2011; RABELO et al., 2011; KIM, 2018).

O fato de a concentração de ácido bórico ter se mostrado fator significativo para a solubilização mostra que uma das suposições deste trabalho, que espécies derivadas de ácido bórico podem aumentar a solubilização de lignina (espécies fenólicas), pode estar correta.

Uma vez que altos valores de porcentagem de solubilização da biomassa no pré-tratamento não implicam necessariamente numa alta taxa de deslignificação, optou-se por submeter todas as amostras pré-tratadas do planejamento experimental à hidrólise enzimática, e desta forma analisar o rendimento em glicose (derivada da celulose) e xilose (derivada da hemicelulose) após 72 horas de reação enzimática.

Figura 13 - Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) para a porcentagem de solubilização.

Fonte: Própria autoria.

6.2.2 Análise do rendimento total de glicose

Neste estudo optou-se por analisar o planejamento utilizando-se como resposta o que foi chamado de “rendimento total de glicose”. Esta resposta foi

definida como a relação em massa da quantidade de glicose liberada após 72 horas de hidrólise enzimática, pela massa de biomassa submetida à hidrólise corrigida pela porcentagem de solubilização, ou seja, a informação que se tem é a quantidade de glicose que pode ser obtida de uma biomassa bruta ao passar por um determinado pré-tratamento e subsequentemente à hidrólise enzimática.

Tal procedimento de análise foi adotado porque após cada um dos pré-tratamentos obtém-se biomassas com composições diferentes, e adotando-se este procedimento acredita-se que se levará em consideração todos os fatores ligados a melhoria na hidrólise causado por um determinado pré-tratamento, tais como deslignificação, aumento de área superficial, variação de cristalinidade, entre outros.

Após a análise estatística dos dados utilizando-se o método “backward” para seleção de termos significativos pode-se obter a equação (5), que descreve o rendimento total de glicose em termos dos fatores codificados; a análise estatística da regressão pode ser visualizada na tabela 12.

$$Rend_{glic.} = 175,45 + 11,17A + 8,31B - 13,18B^2 \quad \text{Eq.(5)}$$

onde:

$Rend_{glic.}$: relação entre massa de glicose obtida e massa de biomassa corrigida pela porcentagem de solubilização (mg/g).

A: valor codificado de pH da solução de pré-tratamento

B: valor da concentração codificada de ácido bórico inicial na solução de pré-tratamento.

De acordo com a análise estatística, apesar de apresentar baixos valores de R^2 e pouco poder preditivo do ponto de vista quantitativo, o modelo mostra-se significativo e sem falta de ajuste, de onde pode-se tirar informações a respeito de tendências da resposta analisada.

Tabela 12 – Análise de Variância (ANOVA) para o modelo ajustado para a resposta rendimento total de glicose.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Prob>F
Modelo	5108,9	3	1703,0	7,05	0,0035*
pH	1702,9	1	1702,9	7,05	0,0180
[ácido bórico]	943,5	1	943,5	3,90	0,0668
[ácido bórico] ²	2462,6	1	2462,6	10,19	0,0061
Resíduos	3624,2	15	241,6		
Falta de ajuste	2556,1	11	232,4	0,87	0,6159**
Erro puro	1068,1	4	267,0		
Total	8733,2	18			
R ²	0,5850				
R ² _{ajustado}	0,5020				

* Significativo; ** Não significativo

Fonte: Própria autoria.

A primeira informação relevante é que, da mesma forma que a resposta anteriormente estudada (porcentagem de solubilização), a recuperação de glicose não depende do fator tempo, o que leva a crer que dentro das faixas dos fatores estudados pode-se optar pelo menor tempo possível quando se vislumbra uma aplicação real. Na figura 14 pode-se visualizar a superfície de resposta obtida, assim como o gráfico de contorno da resposta.

Figura 14 – Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) para a o rendimento total de glicose.

Fonte: Própria autoria.

Por meio da análise da superfície de resposta e de seu contorno pode-se perceber que diferentemente da resposta “porcentagem de solubilização”, a tendência para a máxima resposta não aponta para crescimentos simultâneos de pH e concentração de ácido bórico, podendo-se restringir uma faixa de concentração de ácido bórico (aproximadamente entre 0,30 e 0,33 mol/L) em que o aumento do valor de pH implica em maiores valores da resposta. Tal comportamento mostra que

apesar de apresentar efeitos positivos no que se refere ao rendimento em glicose, a presença de ácido bórico apresenta um “ótimo de concentração” que está dentro do intervalo estudado.

6.2.3 Análise do rendimento total de xilose

Na análise do rendimento total de xilose utilizou-se o mesmo raciocínio adotado para o rendimento total de glicose, obtendo-se a equação 6 como um modelo estatisticamente significativo através da seleção de coeficientes através do método “backward”; a estatística de regressão pode ser vista na tabela 13.

$$Rend_{xil.} = 60,95 + 4,62A + 5,66B - 6,53B^2 \quad \text{Eq.(6)}$$

onde:

$Rend_{xil.}$: relação entre massa de xilose obtida e massa de biomassa corrigida pela porcentagem de solubilização (mg/g).

A: valor codificado de pH da solução de pré-tratamento

B: valor da concentração codificada de ácido bórico inicial na solução de pré-tratamento.

significativos, mostrando que esta resposta acompanha a mesma tendência das anteriores (porcentagem de solubilização e rendimento total de glicose) com relação a esse fator.

O fator “ácido bórico” é o responsável pelo comportamento quadrático, sendo que o fato deste coeficiente (quadrático) se apresentar como negativo mostra que existe um máximo na superfície de resposta; comportamento análogo foi observado para o rendimento total em glicose. Na figura 15 pode-se visualizar a superfície de resposta e o gráfico de contorno originado pela mesma, onde as tendências do rendimento total de xilose podem ser melhor visualizadas.

Tabela 13 – Análise de Variância (ANOVA) para o modelo ajustado para a resposta rendimento total de xilose.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Prob>F
Modelo	1331,9	3	443,9	6,9	0,0038*
pH	291,2	1	291,2	4,5	0,0499
[ácido bórico]	436,8	1	436,8	6,8	0,0196
[ácido bórico] ²	603,9	1	603,9	9,4	0,0078
Resíduos	960,5	15	64,0		
Falta de ajuste	833,8	11	75,8	2,4	0,2074**
Erro puro	126,7	4	31,7		
Total	2292,4	18			
R ²	0,5810				
R ² _{ajustado}	0,4972				

* Significativo; ** Não significativo

Fonte: Própria autoria.

A superfície de resposta e o gráfico de contorno mostram que a tendência para obtenção do máximo de recuperação encontra-se em maiores valores de pH, e que o fator concentração de ácido bórico tem um valor ótimo que se encontra na faixa de 0,33 mol/L. Tal tendência também foi observada na análise dos resultados para a recuperação total de glicose, porém, não foi observada para a porcentagem de solubilização.

Os resultados indicam que as maiores recuperações de carboidratos ocorrem na concentração inicial de ácido bórico na faixa de 0,33 mol/L e em valores superiores de pH, e que aumentos de concentração de ácido bórico além desta faixa, apesar de aumentarem a porcentagem de solubilização da biomassa, implicam em perda de recuperação de carboidratos.

Figura 15 – Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) para a o rendimento total de xilose.

Fonte: Própria autoria.

6.3 ESTUDOS COMPARATIVOS DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPÉCIES DERIVADAS DE ÁCIDO BÓRICO

As comparações entre os resultados obtidos para solubilização da biomassa, recuperação de glicose, recuperação de xilose, bem como possíveis mudanças

estruturais (FTIR, DRX, TGA/DTG) causadas pelos pré-tratamentos foram efetuadas para a biomassa pré-tratada na presença (0,28 mol/L de ácido bórico inicial) e ausência de espécies derivadas do ácido bórico em 3 valores de pH diferentes (9,27, 11,10 e 13,00) . Nas seções subsequentes são apresentados os resultados obtidos.

6.3.1 Solubilização de biomassa, recuperação de glicose e recuperação de xilose

Nos resultados dos pré-tratamentos alcalinos na presença de borato pode-se observar um significativo aumento dos valores da recuperação de glicose e xilose contida na biomassa, chegando a ser 181,2% (m/m) e 507,8% (m/m), respectivamente maiores que a amostra não tratada (tabela 14).

Tabela 14 - Resultados obtidos para porcentagem de solubilização, recuperação de glicose, e recuperação de xilose para experimentos na presença e ausência de espécies derivadas do ácido bórico (* experimentos relativos ao planejamento de superfície de resposta).

Fatores				Respostas					
Experimento	pH	[ácido bórico] mol/l	Tempo em Minutos	Sol. (%)		% Glicose Recuperada		% Xilose Recuperada	
				média	DP	média	DP	média	DP
5*	9,27	0,28	180	9,1 ^c	0,60	41,5 ^d	1,10	30,5 ^d	0,30
6*	13,00	0,28	180	20,4 ^a	1,90	64,4 ^a	5,20	46,8 ^a	1,60
8*	11,10	0,28	180	12,7 ^b	1,10	47,5 ^c	2,20	37,0 ^c	0,80
21	9,27	0	180	8,8 ^c	0,10	20,3 ^f	0,10	5,0 ^f	0,02
22	11,10	0	180	8,0 ^c	0,10	20,9 ^f	0,10	4,9 ^f	0,02
23	13,00	0	180	22,2 ^a	0,8	54,5 ^b	0,10	45,0 ^b	0,01
NT (24)	-	-	-	-	-	22,9 ^e	0,02	7,7 ^e	0,03

Obs.: letras iguais indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias.

Fonte: Própria autoria.

Esses resultados mostram que uma amostra pré-tratada apresenta significativa melhora na hidrólise enzimática devido ao maior acesso das enzimas

aos polissacarídeos. Além disso, a resposta de porcentagem de palha de soja solubilizada mostrou que os pré-tratamentos no pH 9,27 (com e sem borato) e pH 11,10 (sem borato) não diferiram estatisticamente. Em seguida, nota-se que a amostra no pH 11,10 na presença de íons borato apresenta solubilização maior que o seu similar sem borato, e que no pH 13,00 (com e sem borato) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Quando se observa a porcentagem de glicose e xilose recuperadas (com relação ao 100% teórico contido na palha de soja caracterizada - gráfico 5) é possível verificar que em todas as condições onde se tem ácido bórico inicial (para um mesmo valor de pH) atinge-se um valor superior. Esses resultados (% solubilização de palha de soja estatisticamente iguais com recuperação de monossacarídeos estatisticamente diferentes) podem estar relacionados à complexação de espécies derivadas do ácido bórico aos compostos fenólicos da lignina, agindo diretamente no aumento seletivo de sua solubilização ou mesmo impedindo sua repolimerização e deposição sobre a biomassa (ROESKY; ATWOOD, 2003). Chen et al. (2018) reportaram a capacidade do ácido bórico em evitar a repolimerização da lignina em experimentos de craqueamento (lignina pura); tais autores obtiveram frações de lignina com mais baixa massa molar quando o craqueamento foi executado na presença de ácido bórico, indicando que o ácido bórico tem a propriedade de interagir com fragmentos de lignina originados no processo, impedindo que estes voltem a se repolimerizar.

Dentre os três valores de pH estudados, observa-se o maior efeito da presença de espécies derivados de ácido bórico no pH 11,10, com uma superioridade de recuperação de 127,3% (m/m) para glicose e 655,1% (m/m) para xilose, quando comparados aos resultados do pré-tratamento no mesmo valor de pH e na ausência de íons borato (vide gráfico 5).

Gráfico 5 - Comparação do teor de glicose e xilose recuperada após a hidrólise enzimática da palha de soja pré-tratada com NaOH contra ácido bórico em meio alcalino (A = Glicose e B = Xilose).

Fonte: Própria autoria.

No gráfico 5 pode-se notar que para os pré-tratamentos executados em valores de pH iguais a 9,27 e 11,10 na ausência de íons borato, as recuperações de glicose e xilose são estatisticamente menores que as obtidas para a amostra sem pré-tratamento, mesmo tendo havido uma pequena porcentagem de solubilização. Tais resultados podem ser justificados caso a solubilização ocorrida nesses valores de pH seja oriunda de outras substâncias não relacionadas à lignina (Ex.: extratíveis), e que uma pequena parcela de lignina eventualmente solubilizada possa ter passado por um processo de repolimerização e rearranjo/deposição sobre a biomassa, aumentando sua recalcitrância. Uma outra hipótese (que não exclui a primeira) é que pode ter havido uma pequena solubilização da fração de hemicelulose, diminuindo desta forma a concentração de carboidratos na biomassa pré-tratada (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012; ESPÍRITO SANTO et al., 2018).

As amostras em que foram obtidas as maiores recuperações de glicose e xilose são aquelas em que o pré-tratamento foi executado em valores de pH iguais a 13,00 (E6 = 64,4 e 46,8% m/m e E23 = 54,5 e 45 % m/m), no entanto a amostra que possuía ácido bórico na solução alcalina obteve um resultado 18,2% (m/m) maior para glicose e 4% (m/m) maior para xilose. Portanto a presença de íons borato apresenta melhora para a recuperação dos monossacarídeos fermentáveis. Na

tabela 15 são apresentados resultados de recuperação de glicose obtidos por outros autores sob diferentes condições de pré-tratamento e carga enzimática utilizada na hidrólise.

Apesar de alguns trabalhos com a palha de soja apresentarem uma recuperação maior que neste trabalho, pode-se ressaltar que na maioria deles há uma solubilização muito alta da hemicelulose, o que acarreta numa perda de rendimento total de polissacarídeos, ou seja, uma redução no rendimento de açúcares potencialmente fermentáveis. CABRERA et al. (2015) apresentou a maior recuperação de glicose ao utilizar um coquetel enzimático com uma mistura de celulase, xilanase, β -glicosidase e pectinase com cargas de 19,8 FPU, 20 UI, 14 UI e 550 UI por grama de biomassa seca, obtendo 93,9% da glicose contida na biomassa. No entanto, esses autores relataram que o pré-tratamento com 4% de ácido sulfúrico havia removido próxima do 100% da hemicelulose. Além disso, para a palha de soja sem qualquer tipo de pré-tratamento obteve-se uma recuperação de 60% após hidrólise enzimática. Essa alta recuperação de glicose da palha de soja sem pré-tratamento obtida por Cabrera et al. (2015) pode estar relacionada à carga enzimática relativamente alta e o método de análise dos açúcares utilizado (açúcares redutores totais a partir do método DNS e açúcares solubilizados pelo método fenol-sulfúrico).

Tabela 15 – Valores de recuperação de glicose da palha de soja após pré-tratamento e hidrólise relatados na literatura **continua**.

% Glicose recuperada	Tempo	Carga Enzimática	Perda de hemicelulose	Tipo de pré-tratamento	Comentário	Referência
51,22%	36H	50 FPU/g de biomassa	41,45%	Alcalino Amônia (temp. ambiente)	40 horas de Pré-tratamento	(XU et al., 2007)
70,76%	48 h	20 FPU/g de biomassa	80,00%	Hidrotermal	geraram inibidores	
64,55%	48h	20 FPU/g de biomassa	50%	alcalino NaOH	24 horas de Pré-tratamento e 40% de NaOH	(WAN; ZHOU; LI, 2011)

continuação

% Glicose recuperada	Tempo	Carga Enzimática	Perda de hemicelulose	Tipo de pré-tratamento	Comentário	Referência
70,80%	72H	Coquetel Enzimático	>29,4%	alcalino NaOH		
93,90%	72H	Coquetel Enzimático	>90%	4% ácido Sulfurino	geraram inibidores	(CABRERA et al., 2015)
86,50%	72H	Coquetel Enzimático	3,3%	alcalino NaOH	48 horas de Pré-tratamento	
60,10%	72h	60 FPU/g de biomassa	40,00%	alcalino NaOH		(QING et 2017)
50,70%	72h	60 FPU/g de biomassa	64,20%	1% ácido H ₂ SO ₄	geraram inibidores	
74%	72h	50 FPU/g de biomassa	82,10%	alcalino hidrotermal	Continha baixo conteúdo de Hemicelulose	(KIM, 2018)
64,4%	72h	20 FPU/g de biomassa	53,2%	borato em meio alcalino		Este trabalho

Fonte: Própria autoria.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível recuperar 46,8% da hemicelulose que havia na biomassa utilizando-se um tempo de pré-tratamento de 180 minutos, ou seja, com um processo muito mais rápido do que os realizados por Xu et al. (2007), Wan, Zhou e Li (2011) e Cabrera et al. (2015), que oscilaram entre 24 e 48 horas.

Portanto, o pré-tratamento com ácido bórico em meio alcalino se apresenta promissor para geração de açúcares fermentáveis para produção de 2G, pois foi realizado em condições brandas de pré-tratamento e baixa concentração de reagentes. Além disso, as superfícies de resposta mostram que é possível obter-se resultados ainda mais satisfatórios.

Nas seções subsequentes são discutidas de forma comparativa os resultados obtidos em análises de (FTIR), (DRX), (TG/DTG), (MEV), na tentativa de explicar o que ocorre na presença de ácido bórico.

6.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises realizadas por FTIR possibilitam realizar comparações nas alterações estruturais entre os vários pré-tratamentos e a amostra não tratada. A figura 16 apresenta um espectro de infravermelho da amostra de palha de soja não tratada.

Uma banda larga de absorção a 3338 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento OH em grupos OH aromático e alifático, enquanto que a banda de absorção em 2900 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento assimétrico e simétrico dos grupos CH_2 , picos típicos de lignina (XU et al., 2013; LIU et al., 2016).

Figura 16 – Espectro de Infravermelho da amostra de palha de soja não tratada.

Fonte: Própria autoria.

A banda em 1741 cm^{-1} é característica de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) não conjugadas, típica de grupos acetil e ésteres das hemiceluloses; a banda em 1635 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de grupos aldeído presentes na lignina (ZHANG; WU, 2015; LI et al., 2018).

As próximas três bandas, a 1513 , 1455 e 1422 cm^{-1} , confirmam uma estrutura de esqueleto aromático típica de lignina, sendo 1513 cm^{-1} a vibração de anel aromático, 1455 cm^{-1} a deformação metoxil C-H e 1422 cm^{-1} uma deformação CH dentro do plano (XU et al., 2013; LIU et al., 2015b).

Tabela 16 - Atribuição dos picos e/ou bandas no espectro de infravermelho.

Número de onda (cm^{-1})	atribuições de picos	
3338	Vibração de alongamento OH em grupos OH aromático.	
2900	Vibração de alongamento assimétricas e simétricas dos grupos CH_2 , típicos de lignina	
1741	Grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) não conjugada, típica de grupos acetil e éster das hemiceluloses	
1635	Alongamento de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de grupos aldeído presentes na lignina	
1513	Esqueleto de lignina	vibração de anel aromático
1455		deformação metoxil C-H
1422		deformação CH dentro do plano
1314	estiramento de CO do anel aromático relacionado as unidades de siringil (S)	
1235	estiramento de CO do anel aromático relacionado ao guaiacil (G), ou (1741 e 1235) relacionados a ligação hemicelulose-lignina	
1157	Alongamento antissimétrico de CO de grupos éteres típicos de celulose e hemicelulose	
1100	estiramento de CO do anel aromático	
1050 1031	Estiramento $\text{C}=\text{O}$ devido a ligação carboidratos (celulose, hemicelulose) e lignina.	
895	Ligações β -glicosídicas (celulose amorfa ou a presença dos monossacarídeos da hemicelulose).	

Fonte: Própria autoria.

Os picos em 1314, 1235 e 1100 cm^{-1} revelam características de estiramento de CO do anel aromático, sendo o pico a 1314 cm^{-1} associado às unidades de siringil (S) e 1235 cm^{-1} com unidades de guaiacil (G); os picos de absorção em 1741 e 1235 cm^{-1} também podem estar relacionados à ligação hemicelulose-lignina (LIU et al., 2015b; HUANG et al., 2016; QING et al., 2017). O pico em 1157 cm^{-1} indica um alongamento antissimétrico do CO de grupos éteres típicos de celulose e hemicelulose (XU et al., 2013).

As absorções em 1050 e 1031 cm^{-1} são característica do estiramento C=O devido à ligação de carboidratos (celulose, hemicelulose) e lignina. O pico de absorção em 895 cm^{-1} pode ser associado com o alongamento assimétrico do anel fora do plano da celulose amorfa, ou ainda à presença de ligações β -glicosídicas entre os monossacarídeos da hemicelulose (XU et al., 2013). Na tabela 16 estão descritos todos os picos e/ou bandas do infravermelho da amostra de palha de soja não tratada.

Quando se comparam as amostras que passaram por um processo de pré-tratamento e a amostra não tratada (figura 17), nota-se que o perfil FTIR foi diferente na maioria dos tratamentos, indicando que houve modificações estruturais.

O pré-tratamento sob pH 9,27 na ausência de borato não mostrou alterações significativas em comparação ao perfil FTIR da amostra não tratada. Apenas foi possível notar uma redução na intensidade do pico de absorção em 895 cm^{-1} (figura 17) que foi atribuída à presença de ligações β -glicosídicas entre os monossacarídeos da hemicelulose (XU et al., 2013). Essa pequena redução na intensidade do pico pode ser devido à solubilização da hemicelulose. A sua concentração de monossacarídeos é estatisticamente menor a amostra sem o pré-tratamento, corroborando com esta suposição.

Figura 17 - Espectros de infravermelho das amostras não tratada e tratada em pH 9,27.

Fonte: Própria autoria.

O tratamento sob o pH 11,10 na ausência de íons borato mostra um perfil FTIR também muito semelhante ao não tratado (figura 18), no entanto pode-se observar uma redução nas intensidades de absorbância em determinados picos, como, por exemplo: em 1050 e 1031 cm⁻¹ que foram atribuídos ao estiramento C=O entre as ligações de carboidratos e lignina, e em 1741 e 1235 cm⁻¹, que estão relacionados à ligação hemicelulose-lignina. As reduções na absorbância desses picos podem ser relacionadas à remoção de lignina, ou ainda, poderiam ser atribuídas à solubilização da hemicelulose. Da mesma forma como no pré-tratamento em pH 9,27, a concentração de monossacarídeos recuperados após hidrólise nesse caso é inferior à recuperação da amostra não tratada.

Figura 18 - Espectro de infravermelho das amostras não tratada e tratada em pH 11,10.

Fonte: Própria autoria.

O pré-tratamento em pH 13,00 (figura 19) mostrou a maior modificação no perfil FTIR entre os tratamentos ausentes de íons borato. Pode-se observar a ausência do pico em 1741 cm^{-1} e uma grande redução nas intensidades em 1235 e 1635 cm^{-1} , que foram atribuídas ao alongamento de carbonila (C=O) de grupos aldeído presentes na lignina. Também foi possível observar que há uma grande redução do pico em 1513 cm^{-1} , e pequenas reduções nos picos em 1455 e 1422 cm^{-1} , que são característicos de estrutura de esqueleto aromático típico de lignina (XU et al., 2013; LIU et al., 2015b).

Figura 19 - Espectro de infravermelho das amostras não tratada e tratada em pH 13,00.

Fonte: Própria autoria.

Essas informações sugerem a maior desdesignificação entre os tratamentos ausentes de íons borato. Algo esperado para ambientes alcalinos e alcalinos-oxidativos é a degradação da lignina através da clivagem das ligações α - e β -aril-éster, produzindo unidades de lignina fragmentada (SINGH et al., 2014). Tal fato corrobora com os resultados de porcentagem de solubilização da palha de soja, e com as altas concentrações de glicose e xilose após hidrólise enzimática, quando comparadas às obtidas para os outros tratamentos na ausência de íons derivados do ácido bórico (gráfico 5 e Tabela 14).

As amostras que foram tratadas sob o mesmo pH e tempo de pré-tratamento (180 minutos) na presença de íons borato mostraram um perfil FTIR com maiores modificações. A figura 20 mostra a comparação sob pH 9,27 com e sem borato, podendo perceber a ausência do pico em 1741 cm^{-1} e uma grande redução do tamanho de pico em 1235 cm^{-1} . Este fato pode ser explicado devido às espécies derivadas do ácido bórico que evitaram as reações de repolimerização da lignina (CHEN et al., 2018).

Figura 20 - Espectro de infravermelho comparando as amostras tratadas em pH 9,27 na presença e ausência de espécies químicas derivado de ácido bórico.

Fonte: Própria autoria.

Comparando as recuperações de glicose e xilose no pH 9,27 foi possível observar um aumento de 104,4 % para glicose e de 510% para xilose na amostra pré-tratada com borato com relação ao obtido para a amostra tratada sem borato. Estes fatos podem confirmar o efeito dos íons borato para solubilização da lignina nessa faixa de pH no pré-tratamento.

Ao analisarmos os pré-tratamentos no pH 11,10 (com e sem borato) percebe-se um perfil FTIR sem grandes modificações (figura 21), com apenas redução do pico em 1635 cm^{-1} , o que pode caracterizar uma maior remoção da lignina ou ainda uma modificação da estrutura da lignina. Confirmado pelo aumento notório na recuperação de glicose e xilose no pH 11,10 na presença de borato (discutido no item 6.3).

Figura 21 - Espectro de infravermelho comparando as amostras no pH 11,10 presentes e ausentes de espécies químicas derivado de ácido bórico.

Fonte: Própria autoria.

A análise comparativa entre os espectros de infravermelho obtidos para os tratamentos efetuados em pH 13,00 (com e sem borato) nos mostra modificações muito pequenas nos perfis (figura 22), com uma faixa entre 1300 a 1500 cm^{-1} apresentando menores absorvâncias para o pré-tratamento com íons borato. Essas pequenas mudanças no FTIR corroboram com as informações de monossacarídeos recuperados, pois a pesar da superioridade dos pré-tratamentos com íons borato para recuperação de glicose e xilose, se percebe que no pH 13,00 existe a menor diferença relativa, com um aumento de recuperação de glicose de 18,2 % e de xilose de 4% quando se tem borato presente.

Os resultados mostram que o efeito dos íons borato em meio alcalino se tornam menos proeminentes conforme se aumenta o valor do pH do meio de pré-tratamento, porém a presença de borato, mesmo em valores de pH maiores (pH 13,00) se mostra vantajosa, principalmente com relação a recuperação de glicose.

Figura 22 - Espectro de infravermelho comparando as amostras no pH 12,23 presentes e ausentes de espécies químicas derivado de ácido bórico.

Fonte: Própria autoria.

6.3.3 Análise da cristalinidade por difração de raio-X

Os picos presentes nos difratogramas de biomassa referem-se aos componentes cristalinos do material (celulose), enquanto bandas de maior largura referem-se aos halos de amorficidade. A amostra sem pré-tratamento (figura 23) apresenta um difratograma característico de celulose tipo I (típica de materiais lignocelulósicos), com o pico de maior intensidade ($2\theta = 22,92^\circ$) representado o plano (002), bem como picos em $2\theta = 18,6^\circ$ e $35,06^\circ$ representando os planos (101) e (004), respectivamente (REDDY; YANG, 2009; BANSAL et al., 2010; ZHANG; WU, 2015; MARTELLI-TOSI et al., 2017). Segundo Martelli-Tosi et al. (2017) a celulose do tipo I é uma estrutura com duas fases cristalinas: I α celulose (célula unitária triclinica) e I β celulose (célula unitária monoclinica), dispostas em cadeias paralelas.

Figura 23 - Difratoograma de raio- x da palha de soja não tratada.

Fonte: Própria autoria.

Na figura 24 pode-se observar que em todas as amostras pré-tratadas tem-se um difratograma com maior nitidez no pico máximo referente ao plano (002), o que significa maior organização da rede cristalina (CAO; TAN, 2005; MARTELLI-TOSI et al., 2017). Tais resultados evidenciam que a estrutura lignocelulósica do material foi alterada pelo pré-tratamento, com remoção de lignina e/ou hemicelulose (frações amorfas) e aumento do teor de celulose (fração cristalina) (ZHANG; WU, 2015).

Todos os resultados de índice de cristalinidade obtidos para a biomassa após pré-tratamento foram superiores ao resultado obtido para a biomassa sem pré-tratamento (gráfico 6). É possível observar que nos pré-tratamentos efetuados em pH 13,00 foram obtidos os maiores índices de cristalinidade, confirmando o fato de que em valores de pH mais altos há uma maior solubilização das frações amorfas da palha de soja (lignina e hemicelulose) (CABRERA et al., 2015).

Figura 24 - Comparação dos difratogramas normalizados das amostras que passaram por pré-tratamento com íons borato contra a amostra não tratadas (A = amostras sem borato e B = amostras com borato).

Fonte: Própria autoria.

Gráfico 6 - Comparação dos índices de cristalinidades das amostras com borato, sem borato e não tratada.

Fonte: Própria autoria.

Em todos os pré-tratamentos em que havia ácido bórico presente tem-se um índice de cristalinidade maior que seus similares sem borato (exceção pH 13,00), mas ao observar os dados de hidrólise enzimática é notório que há diferença na recuperação de glicose e xilose contida na palha de soja pré-tratada (tabela 14). Tais resultados confirmam o fato de que o ácido bórico em meio alcalino agiu de forma seletiva na lignina, e que o índice de cristalinidade da biomassa deve estar relacionado muito mais à disponibilidade de polissacarídeos para a hidrólise (deslignificação) do que a própria dificuldade em se hidrolisar um polissacarídeo mais cristalino, como descrito por alguns autores (PARK et al., 2010; BERNARDINELLI et al., 2015).

6.3.4 Análise Termogravimétrica

Na figura 25 é apresentado o gráfico TG obtido para a biomassa sem pré-tratamento, onde é possível visualizar 3 faixas principais de perda de massa.

Figura 25 - Análise térmica não-isotérmica (TGA) da amostra não tratada, destacando a faixa principal de perda de massa (celulose, hemicelulose e lignina).

Fonte: Própria autoria.

De acordo com ZHANG; WU (2015), a primeira faixa que vai de 30 a 200 °C (com um ápice a 100 °C) pode ser atribuída à perda de umidade contida na palha de soja, que neste caso foi de 3%. Na segunda faixa de (210 a 389 °C) tem-se a decomposição da lignina, celulose e hemicelulose, que corresponde a 60% - resultado semelhante foi obtido por Martelli-Tosi et al. (2017). A terceira faixa (acima de 389 °C) pode ser atribuída à degradação de lignina residual e a formação de resíduos sólidos, tais como cinzas e materiais inorgânicos.

A análise do gráfico de DTG (figura 26) mostra que na segunda faixa é possível observar dois eventos principais. Ao primeiro é atribuído a decomposição majoritária da hemicelulose, com início em 210 °C e término em 309 °C, apresentando um ápice de degradação em 283 °C (ZHANG; WU, 2015). A hemicelulose é um polímero amorfo formado por vários monossacarídeos e com grandes quantidades de cadeias laterais (ver item 3.4.2), o que justifica possuir a menor estabilidade térmica entre os três principais constituintes da biomassa, cessando sua decomposição a mais baixas temperaturas (PANG et al., 2014; HUANG et al., 2016).

Figura 26 - Termogravimétrica derivada (DTG) da amostra não tratada com os principais eventos pelas temperaturas de degradação.

Fonte: Própria autoria.

O segundo evento tem início em 309 °C e um término em 389 °C, com degradação máxima em 352 °C. Essa faixa de degradação refere-se à despolimerização da lignina e a celulose (ZHANG; WU, 2015). Segundo Pang et al. (2014), não há degradação térmica individual de nenhum dos três polímeros (hemicelulose, lignina, celulose), sendo na verdade uma sobreposição das faixas de degradação entre eles. Este fato pode ser explicado pelas características físico-químicas dos polímeros envolvidos.

A lignina é um polímero com estrutura tridimensional, formado por meros de fenil-propano e com um alto grau de polimerização (ver item 3.4.3), o que garante uma longa faixa de degradação que varia de 200 °C a 550 °C (PANG et al., 2014; ZHAO et al., 2017). Por sua vez, a celulose é um polímero formado por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas e altamente organizado, essas características dão a celulose pouca reatividade térmica, o que garante grande resistência à temperatura, podendo ser atribuído à celulose o evento mais intenso com ápice de sua degradação em 352 °C (PANG et al., 2014; ZHANG; WU, 2015; HUANG et al., 2016).

Ao comparar os resultados de DTG das amostras pré-tratadas com a amostra bruta (figura 27) é possível perceber que há uma diminuição da intensidade na faixa de temperatura entre 210 e 309 °C (atribuída à decomposição da lignina-hemicelulose), bem como um aumento na intensidade do pico situado a 352 °C (atribuído à máxima degradação de celulose). Estes fenômenos podem ser relacionados a uma remoção parcial da lignina e hemicelulose, o que aumentaria a proporção de celulose dentro da biomassa. A celulose possui a característica de se aglomerar em conjuntos, deixando-a mais empacotada, tornando a biomassa menos reativa à medida que sua proporção aumenta (PANG et al., 2014; ZHANG; WU, 2015).

Figura 27 - Comparação dos perfis DTG entre a amostra não tratada e as amostras que passaram por um pré-tratamento com e sem borato (sem borato A = 9,27; B = 11,10 e C = 13,00; com borato D = 9,27; E = 11,10 e F = 13,00).

Fonte: Própria autoria.

Os perfis DTG das amostras pré-tratadas sem borato nos valores de pH iguais a 9,27 e 11,10 (figura 27A e B) mostram pequenas modificações com relação a amostra sem pré-tratamento, enquanto para a amostra pré-tratada em pH igual a 13,00 (figura 27C) a modificação é acentuada. A análise dos perfis DTG das amostras pré-tratadas com borato (figura 27D, E e F) mostram que conforme se aumenta o pH do meio, tem-se um crescente estreitamento na faixa de temperatura de degradação (entre 210 e 309 °C) e um aumento na intensidade do pico situado a 352 °C.

Os resultados de DTG mostram-se condizentes com as recuperações de monossacarídeos obtidos após hidrólise e porcentagem de solubilização da biomassa durante o pré-tratamento, bem como corroboram com os dados obtidos pelas técnicas de FTIR e DRX.

6.3.5 Análise morfológica das fibras por microscopia eletrônica de varredura.

As imagens de MEV apresentadas na figura 28 mostram a palha de soja não tratada sob diferentes ampliações. Podem ser observados fragmentos de diferentes formatos e com dimensões condizentes com a faixa de granulometria selecionada (20 a 80 mesh). Na figura 28D pode-se observar uma superfície característica de material lignocelulósico recoberto por lignina (XU et al., 2007).

Figura 28 - Palha de soja não tratada, mostrada sobre diferentes ampliações (A = 100X, B = 500X, C = 1.500X e D = 3.000X)

Fonte: Própria autoria.

Na figura 29 são exibidas as micrografias obtidas para a biomassa pré-tratada sob as várias condições testadas, podendo-se visualizar com nitidez o efeito dos pré-tratamentos na morfologia da fibra com relação à amostra sem pré-tratamento.

A figura 29A mostra a palha de soja após um pré-tratamento executado sob pH 9,27 e na ausência de borato, podendo-se observar pequenas modificações na estrutura lignocelulósica com as microfibrilas de celulose um pouco mais aparentes. Na medida em que o pH de pré-tratamento sobe para 11,10 (figura 29 B), nota-se o início do surgimento de pequenas poros, que podem ser atribuídos à maior remoção de lignina e hemicelulose (XU et al., 2007; ZHANG; WU, 2015). No pré-tratamento executado em pH 13,00 (figura 29C) tem-se a maior deslignificação, podendo-se observar que o efeito (produção de poros e exposição da celulose) se faz presente no interior da fibra e não somente na sua superfície.

A análise das micrografias obtidas após pré-tratamentos executados na presença de borato mostra que desde o pH 9,27 já se tem o aparecimento de poros, os quais não foram notados no seu tratamento similar ausente de borato. Na medida em que se eleva o valor do pH para 11,10 percebe-se que há um aumento no número e tamanho de poros (figura 29E), tanto comparado com o pré-tratamento executado em pH 9,27 (na presença de borato), quanto ao seu similar sem borato. O pré-tratamento executado em pH 13,00 na presença de borato (figura 29F) foi o que mostrou os maiores efeitos de modificações morfológicas de todas as condições

testadas, uma vez que observa-se a maior densidade de poros, bem como uma maior penetração no interior das fibras.

Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras após pré-tratamento (Sem borato A = (9,27, B = 11,10, C = 13,00) e (Com borato D = 9,27, E = 11,10, F = 13,00).

Fonte: Própria autoria.

A porosidade é um fator importante na avaliação da eficácia de qualquer pré-tratamento, pois torna o material mais acessível às enzimas hidrolíticas (GAO et al., 2013; LIU et al., 2016), de onde pode-se afirmar que o pré-tratamento mais eficaz foi o executado em pH igual a 13,00 na presença de borato. Os dados obtidos de porcentagem de solubilização da biomassa e recuperação de monossacarídeos após hidrólise (tabela 14) confirmam tal afirmação.

7 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos pelo estudo conduzido através de metodologia de superfície de resposta pode-se concluir que a presença de espécies derivadas de ácido bórico em meio alcalino tem efeito na solubilização da biomassa durante pré-tratamento, sendo tal efeito mais marcante conforme se eleva a concentração de ácido bórico inicial e o valor do pH do meio. As superfícies de resposta obtidas para o rendimento de monossacarídeos (tanto glicose quanto xilose) após hidrólise enzimática apresentam comportamento distinto, pois observa-se um máximo quando se considera a concentração de ácido bórico inicial (em torno de 0,33 mol/l), indicando que a partir de determinada concentração há solubilização ou degradação dos polissacarídeos, além de deslignificação. Tal concentração ótima de ácido bórico inicial (independentemente do valor do pH) provavelmente esteja ligada à concentração de lignina presente na biomassa bruta.

O fato da recuperação de monossacarídeos seguir uma tendência crescente conforme se aumenta o pH indica que existem efeitos complementares de pH e espécies derivadas do ácido bórico, principalmente a partir do pH igual a 10,3, onde se espera que todo o ácido bórico (pK_a aproximadamente 9,27) esteja majoritariamente na forma de íons borato, principal espécie química reconhecidamente complexante de fenólicos e provável adjuvante no processo de deslignificação.

Dentre os níveis dos fatores estudados no planejamento não se observou significância estatística do tempo de reação, sendo a máxima recuperação obtida (pré-tratamento em pH 13,00, concentração de ácido bórico inicial de 0,28 mol/l, 180 min de pré-tratamento) de glicose e xilose superiores em 181,2% (m/m) e 507,8% (m/m) com relação a biomassa não tratada, respectivamente. De acordo com as superfícies de resposta, resultados superiores podem ser obtidos em valores de pH superiores a 13,00, concentração de ácido bórico igual a 0,33 mol/l e tempo de pré-tratamento a partir de 80 min (menor tempo estudado no planejamento de superfície de resposta).

Os resultados obtidos nos experimentos comparativos executados na presença e ausência de íons derivados do ácido bórico (em pH 9,27, 11,10 e 13,00) mostram que em todos os casos tem-se maior recuperação de monossacarídeos

quando o pré-tratamento ocorre na presença de borato (principal espécie derivada do ácido bórico em meio básico), indicando forte efeito no processo de deslignificação. Resultados de análises de FTIR, TG/DTG e MEV corroboram com tal afirmação. Os valores de índice de cristalinidade determinados através da técnica de DRX indicam que este parâmetro provavelmente esteja muito mais ligado ao teor de celulose remanescente (remoção de componentes amorfos – lignina e hemicelulose) do que à cristalinidade da celulose presente, uma vez que se observam valores de recuperação superiores para amostras com índice de cristalinidade maiores.

Conclui-se que as espécies derivadas do ácido bórico em meio alcalino (principalmente borato) são importantes adjuvantes no processo de deslignificação através da complexação com os meros de lignina, promovendo uma solubilização mais seletiva desta, o que proporciona um processo de deslignificação mais eficiente e maiores valores de recuperação de açúcares potencialmente fermentáveis após hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHANI, A et al. Potential of soya as a raw material for a whole crop biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 75, p. 1269–1280, Aug. 2017.
- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Renewable Energy**, Oxford, n. January, p. 8, 2008.
- ARANTES, V.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 94, n. 2, p. 323–338, 2012.
- ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, p. 541–555, 2011.
- ASSUMPÇÃO, S. M. N. et al. Pre-treatment combined H₂SO₄ /H₂O₂ /NaOH to obtain the lignocellulosic fractions of sugarcane bagasse. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, n. 3, p. 803–822, 2016.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL - BNDES. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BANSAL, P. et al. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose: a new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. **Bioresource Technology**, Barking, v. 101, n. 12, p. 4461–4471, 2010.
- BERNARDINELLI, O. D. et al. Quantitative ¹³C MultiCP solid-state NMR as tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p 1 – 11, 2015.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282–1289, 2010.
- BESSA, L. C. B. A. et al. Fluid phase equilibria: a new UNIFAC parameterization for the prediction of liquid-liquid equilibrium of biodiesel systems. **Fluid Phase Equilibria**, Tokyo, v. 425, p. 98–107, 2016.
- BINOD, P. et al. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 109–116, 2012.
- BOLAND, S.; UNNASCH, S. **Carbon intensity of marginal petroleum and corn ethanol fuels**. S. I.: LCA, 2014. (Life Cycle Associates Report, n. LCA.6075.83.2014).

CABRERA, E. et al. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource Technology**, Barking, v. 194, p. 1–6, 2015.

CABRERA, E. et al. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 1–6, 2015.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2012, p. 1–15, 2012.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 44, p. 48-54, jan. 2010.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 2011.

CAO, Y.; TAN, H. Study on crystal structures of enzyme-hydrolyzed cellulosic materials by X-ray diffraction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2–3, p. 314–317, 2005.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, A. M. et al. **Teores de hemiceluloses, celulose e lignina em plantas de cobertura com potencial para sistema plantio direto do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Cerrados, 290).

CENTRO DE GESTÃO A ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química verde no Brasil**. Brasília: CGEE, 2010.

CHANDEL, A. K. et al. Biodelignification of lignocellulose substrates: an intrinsic and sustainable pretreatment strategy for clean energy production. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 35, n. 3, p. 281–293, 2015.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 3, n. 5, p. 415–431, 2013.

CHEN, C. et al. Effect of structural characteristics on the depolymerization of lignin into phenolic monomers. **Fuel**, Guildford, v. 223, p. 366–372, Mar. 2018.

CHEN, H. et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 160, p. 196–206, June 2017.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5: safra 2017/18 – n. 8, oitavo levantamento. Brasília: CONAB, 2018a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 5: safra 2018/19 – n. 1, primeiro levantamento.** Brasília: CONAB, 2018b.

EISENTRAUT, A. **Sustainable production of second- generation biofuels: potential and perspectives in major economies and developing countries.** Paris: OECD/IEA, 2010. (Information paper, feb. 2010).

EL-ZAWAWY, W. K. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 84, n. 3, p. 865–871, 2011.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE. **Balanco energético nacional 2016.** Brasília: EPE, 2016.

ESPIRITO SANTO, M. et al. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. October 2017, p. 64 – 74, 2018.

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

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

FUKUSHIMA, R. S. et al. Extração da lignina e emprego da mesma em curvas de calibração para a mensuração da lignina em produtos vegetais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 1302–1311, 2000.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 59, n. 6, p. 618–628, 2002.

GAO, J. et al. Ionic liquid pretreatment to enhance the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 150, p. 352–358, 2013.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Barking, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, Guilford, v. 36, n. 6, p. 2086–2097, 2008.

GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation:

application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 1–22, 2008.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAMES, B. et al. **Preparation of samples for compositional analysis**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42620).

HUANG, X. et al. Pyrolysis kinetics of soybean straw using thermogravimetric analysis. **Fuel**, Guilford, v. 169, p. 93–98, 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - IEA. **Sustainable production of second-generation biofuels: potential and perspectives in major economies and developing countries**. Paris: IEA/OCDE, 2010. Disponível em: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_bio_fuels.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2017.

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

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119–134, 2007.

JOVANOVIĆ, I. et al. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, London, v. 16, n. 4, p. 687–697, 2009.

JUNG, Y. H. et al. Mimicking the Fenton reaction-induced wood decay by fungi for pretreatment of lignocellulose. **Bioresource Technology**, Barking, v. 179, p. 467–472, 2015.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 4, p. 679–689, 2013.

KATO, D. M. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. **Bioresource Technology**, Barking, v. 162, p. 273–278, 2014.

KIM, S. Evaluation of alkali-pretreated soybean straw for lignocellulosic bioethanol production. **International Journal of Polymer Science**, London, v. 2018, n. 5241748, p. 1–7, 2018.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. A. N. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R. A.; AKHTAR, M. (Eds.). **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273–307.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 126–131, 2009.

KRAUS, J. E.; LOURO, R. P.; ESTELITA, M. E. M. A célula vegetal. In: GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2009. p. 32-36.

KUMAR, R. et al. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - a review. **Biofuel Research Journal**, Saint John, v. 3, n. 1, p. 347–356, 2016.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 367–380, 2002.

LI, W. et al. A two-stage pretreatment process using dilute hydrochloric acid followed by Fenton oxidation to improve sugar recovery from corn stover. **Bioresource Technology**, Barking, v. 219, p. 753–756, 2016.

LI, X. et al. Quantitative visualization of lignocellulose components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro- and micro-spectroscopy coupled with chemometrics. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, n. 1, p. 263, 2018.

LIU, Q. et al. A two-stage pretreatment process using dilute hydrochloric acid followed by Fenton oxidation to improve sugar recovery from corn stover. **Bioresource Technology**, Barking, v. 211, p. 435–442, 2016.

LIU, Z. et al. The utilization of soybean straw III: Isolation and characterization of lignin from soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 94, p. 12–20, 2016.

LIU, Z. et al. The utilization of soybean straw. I: fiber morphology and chemical characteristics. **BioResources**, Raleigh, v. 10, n. 2, p. 2266–2280, 2015a.

LIU, Z. et al. The utilization of soybean straw. II. Dissolution & regeneration of soybean straw in LiCl/DMSO. **BioResources**, v. 10, n. 2, p. 2305–2317, 2015b.

LUO, J.; FANG, Z.; SMITH, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 56–93, 2014.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. In: WYMAN, C. E.; DAVISON, B. H. (Eds.). **Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**: presented as volumes 57 and 58 of applied biochemistry and biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press, 1996. p. 741–761.

MAFIOLETTI, R.; MARTINS, G.; TURRA, F. Produção de etanol nos Estados Unidos. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 96–107, 2011.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 157, p. 512–520, 2017.

MARTINS, L. H. S.; RABELO, S. C.; DA COSTA, A. C. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312–321, 2015.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 5, n. 5, p. 597–609, 2015.

MESA, L. et al. Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 86, p. 270–279, 2016.

MENDES, K. C. S. et al. Estudo dos parâmetros operacionais do pré- tratamento ácido diluído da palha de cana-de- açúcar para obtenção de xilose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2010, Florianópolis. [Anais...] Florianópolis: ABEQ, 2010. p. 1–8.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430–1442, 2012.

MORENO, A. D. et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 35, n. 3, p. 342–354, 2015.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NAKANISHI, S. C. et al. Comparative material balances and preliminary technical analysis of the pilot scale sugarcane bagasse alkaline pretreatment to 2G ethanol production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 120, p. 187–197, May 2018.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 33-50, 2003.

NOVOZYMES. **O etanol de milho nos Estados Unidos**. 08 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.bioblog.com.br/o-etanol-de-milho-nos-estados-unidos/>>. Acesso em: 02 set. 2017.

ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

PAN, G. X. et al. Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 12, p. 5283–5288, 1998.

PANG, C. H. et al. Relationship between thermal behaviour of lignocellulosic components and properties of biomass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 172, p. 312–320, 2014.

PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, p. 1–10, 2010.

PEREIRA, N.; COUTO, M.; ANNA, L. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series in Biotechnology, 2).

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 67, n. 5, p.

577–591, 2005.

QING, Q. et al. Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 109, p. 391–397, Sept. 2017.

RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 2600–2607, 2011.

RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

RAQUEL, L. H. et al. Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 88, p. 61–67, 2014.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 80, p. 330–340, May 2017.

REDDY, N.; YANG, Y. Natural cellulose fibers from soybean straw. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 14, p. 3593–3598, 2009.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA. **World fuel ethanol production - industry statistics**. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

ROESKY, H. W.; ATWOOD, D. A. **Group 13 chemistry III: industrial applications**. Berlin: Springer, 2003. (Structure and Bonding, 105).

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 246–291, 2005.

SILVA, G. T. et al. Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 269, p. 21–28, 2016.

SINGH, S. et al. Mechanistic investigation in ultrasound-assisted (alkaline) delignification of parthenium hysterophorus biomass. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 53, n. 37, p. 14241–14252, Sept. 2014.

SLUITER, A. et al. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples.** Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42621).

SLUITER, A. et al. **Determination of ash in biomass.** Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005a. (Technical Report NREL/TP-510-42622).

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass.** Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005b. (Technical Report NREL/TP-510-42619).

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2012. (Technical Report NREL/TP-510-42618).

SOUSA, L. C. et al. Innovation systems of ethanol in Brazil and the United States: making a new fuel competitive. In: SALLES-FILHO, S. L. M. et al. **Global bioethanol: evolution, risks, and uncertainties.** London: Academic Press, 2016. p. 93–121.

SUN, F. F. et al. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 79–80, p. 42–48, 2015.

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

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 56, p. 195–204, 2004.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.

TÁVORA, F. L. **História e economia dos biocombustíveis no Brasil.** Brasília, DF: Centro de Estudos da Consultoria do Senado, 2011.

TERAMURA, H. et al. Organosolv pretreatment of sorghum bagasse using a low concentration of hydrophobic solvents such as 1-butanol or 1-pentanol. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 9, n. 1, p. 27, 2016.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. **Etanol já evitou a emissão de 408,4 milhões de toneladas de CO₂ desde 2003.** 23 junho 2017. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/39864125920332180623/etanol-ja-evitou-a-emissao-de-408-por-cento2C4-milhoes-de-toneladas-de-co2-desde-2003/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT - UNCTAD. **Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing country perspectives.** Geneva: UNCTAD, 2016. (UNCTAD/DITC/TED/2015/8).

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **U.S. Bioenergy statistic.** Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/>>. Acesso em: 14 apr. 2017.

- WAAK, R. S.; NEVES, M. F. Competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. In: FARINA, E. M. M. Q.; ZYLBERSZTAJN, D. **Competitividade no agribusiness brasileiro**, v. 5. São Paulo: PENSA/FIA/FEA/USP, 1998. p. 1–185,
- WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, 2011.
- XU, F. et al. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801–809, 2013.
- XU, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 31, n. 2–3, p. 162–167, 2007.
- YANG, L. et al. Isolation and further structural characterization of lignins from the valonea of *Quercus variabilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Tokyo, v. 97, p. 164–172, 2017.
- ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, London, v. 22, n. 4, p. 2409–2418, 2015.
- ZHANG, M. F. et al. Depolymerization of microcrystalline cellulose by the combination of ultrasound and Fenton reagent. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 404–408, 2016.
- ZHANG, T.; ZHU, M. J. Enhancing enzymolysis and fermentation efficiency of sugarcane bagasse by synergistic pretreatment of Fenton reaction and sodium hydroxide extraction. **Bioresource Technology**, Barking, v. 214, p. 769–777, 2016.
- ZHANG, Y.-H. P. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 97, n. 2, p. 214–223, 2007.
- ZHAO, J. et al. TG–DSC analysis of straw biomass pyrolysis and release characteristics of noncondensable gas in a fixed-bed reactor. **Drying Technology**, New York, v. 35, n. 3, p. 347–355, 2017.