UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDA DE CARVALHO OLIVEIRA

**Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos
agroindustriais para obtenção de compostos químicos
aromáticos de maior valor agregado**

**Lorena
2015**

FERNANDA DE CARVALHO OLIVEIRA

**Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos
agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos
de maior valor agregado**

Tese apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências do Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia Industrial na área de
conversão de biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto
Gonçalves

Edição reimpressa e corrigida

**Lorena
Junho, 2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Fernanda de Carvalho

Oxidação de lignina proveniente de resíduos
lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de
compostos químicos aromáticos de maior valor agregado
/ Fernanda de Carvalho Oliveira; orientador Adilson
Roberto Gonçalves -ed. reimpr., corr.- 2015.
199 p: il.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de
Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na
Área de Conversão de Biomassa) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São
Paulo. 2015 Orientador: Adilson Roberto
Gonçalves

1.Oxidação de lignina. 2. Resíduos
agroindustriais. 3. Compostos de baixa massa
molar. 4. Biorrefinarias. I. Título. II.
Gonçalves, Adilson Roberto, orient.

Aos meus pais, pelas palavras de estímulo, pelo olhar confiante, dedicação constante, pelos braços confortantes e amor cativante.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela inspiração e crença que me direciona.

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves, pela amizade, pelas oportunidades e ensinamentos transmitidos durante todos esses anos de orientação e pela colaboração para realização de parte deste trabalho nos Estados Unidos.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL), em especial ao Departamento de Biotecnologia, seus funcionários e professores, pela oportunidade, respeito e auxílio na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Birgitte Ahring e aos pesquisadores do Laboratório de Bioprodutos, Ciências e Engenharia da Universidade do Estado de Washington, em especial ao Philip Teller e Dr. Keerthi Srinivas, pela oportunidade e pelo auxílio no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos professores Dr. Carlos Shigue do Departamento de Materiais da EEL e Dr. Antonio Del'Arco Junior do Instituto de Aeronáutica e Espaço – Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), e aos pesquisadores Hélio Calixto e Dra. Mariane Abreu, pela colaboração na elaboração e análise dos materiais poliméricos.

À Prof. Dra. Inês Roberto, e aos pesquisadores Dr. Bruno Guedes, Túlio Lima e Rafael Castro pelo auxílio nas análises dos compostos aromáticos, e a Prof. Dra. Adriane Milagres e a Maiara Paparele pelo auxílio nas análises de liberação do herbicida.

Ao Dr. Gregory Helms, Dr. John Cort e Dra. Nancy Isern pelo auxílio com as análises de RMN, e ao Prof. Dr. Messias Borges e Dr. Diego Pimenta pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Usina de Açúcar e Álcool Costa Pinto, ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e a Fazenda Top Coffee pelo fornecimento dos materiais lignocelulósicos utilizados neste trabalho.

Aos colegas de trabalho e aos amigos do Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal, Bruno Gambarato, Rafael Garcia, Patrícia Mileo, Naila Mori, José Carlos, Cibele Rosa, Priscila Maziero, e em especial a Mariana Galhardo e a Karina Rodrigues, pelo apoio e troca de experiências.

À Prof. Dra. Maria Bernadete de Medeiros, a Paula Julião, Isnaldi de Souza, Nadir Magalhães, Joel Ribeiro, André Silva, Fabrício Ferreira, Bárbara Pereira, e ao Carlos Max, pela amizade e disposição em sempre colaborar.

Aos meus pais e irmãos, àqueles que com amor, carinho e ensinamentos me apoiam e compartilham cada etapa da minha vida.

Ao István Weyda, pelos esforços sem medida para me auxiliar na elaboração deste trabalho, pelas palavras de apoio, por todo amor e cumplicidade.

A todos meus familiares e amigos, pela torcida de sempre.

Ao CNPq e a Capes pelo apoio financeiro.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer"

Albert Einstein

RESUMO

OLIVEIRA, F. C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado.** 2015. 199p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

A exploração de processos viáveis para a conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis limpos e produtos químicos de alto valor agregado, para complementar ou substituir produtos derivados de fontes não renováveis, é crucial para um desenvolvimento sustentável. A valorização e modificação dos componentes lignocelulósicos, torna-se imprescindível para viabilizar o sistema de biorrefinaria. A lignina, macromolécula aromática dominante na natureza, é um destes componentes que, devido a sua estrutura e composição, oferece rotas únicas para a produção de vários químicos de valor agregado. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de reações de oxidação em ligninas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar, e de casca de café, na obtenção de compostos aromáticos de baixa massa molar, em especial a vanilina, e adicionalmente, verificar a aplicabilidade da lignina oxidada residual na obtenção de matrizes para liberação controlada de herbicida, buscando alternativas para agregar valor à lignina proveniente de resíduos agroindustriais e contribuir com a viabilização de biorrefinarias. Para isso, os materiais lignocelulósicos foram pré-tratados com ácido diluído e submetidos a deslignificação alcalina para obtenção da lignina. As frações obtidas durante cada etapa foram avaliadas quanto a composição química e Espectrometria no Infravermelho (FTIR), e as ligninas obtidas, foram ainda avaliadas por Espectrometria no Ultravioleta (UV) e por Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN, ^{13}C RMN e 2D RMN). As ligninas obtidas foram oxidadas em diferentes condições: oxidação enzimática utilizando lacase, em meio ácido e em meio alcalino com H_2O_2 e oxidação úmida em meio aquoso e alcalino utilizando H_2O_2 . A fração líquida obtida foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificar e quantificar os aldeídos aromáticos e outros compostos de degradação, enquanto a fração sólida, constituída pela lignina residual oxidada, foi avaliada por FTIR e UV. As ligninas oxidadas provenientes das condições que resultaram em um maior rendimento de vanilina, foram aplicadas na formulação de matrizes para liberação controlada de ametrina. Os resultados mostraram que a lignina de bagaço e de palha de cana não oxidadas são compostas principalmente por unidades siringil e guaiacil, respectivamente, e predominância de ligações β -O-4, enquanto a lignina de casca de café foi composta principalmente por unidades hidroxil e predominância de ligações C-C, indicando uma estrutura mais condensada. Das oxidações avaliadas, a oxidação em meio alcalino (NaOH 10%) utilizando H_2O_2 9,1% gerou um maior rendimento de vanilina quando utilizada lignina de bagaço (8,13 mg/g lignina) e de casca de café (1,15 mg/g lignina), e H_2O_2 6,1% quando utilizada lignina de palha (6,48 mg/g lignina). A aplicação das ligninas oxidadas permitiu a obtenção de matrizes capazes de liberar o herbicida ametrina com diferentes cinéticas, dependendo das propriedades e das proporções das ligninas empregadas.

Palavras-chave: Oxidação de lignina. Resíduos agroindustriais. Compostos de baixa massa molar. Biorrefinarias.

ABSTRACT

OLIVEIRA, F. C. **Oxidation of lignin from agroindustrial lignocellulosic residues to obtain aromatic chemical compounds of added value.** 2015. 199p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

The exploration of feasible paths for the conversion of the lignocellulosic biomass into clean fuels and high value chemicals, to complement or replace products derived from non-renewable sources, is crucial for a sustainable development. The efficient utilization of the lignocellulosic components is of fundamental importance for the economic viability of biorefineries. Lignin, nature's dominant aromatic polymer, is a major component of the biomass that, due to its structure and chemical composition, is a unique feedstock for producing high-value chemicals. The aim of this study is to seek for alternatives for adding value to lignin from agro-industrial waste in order to contribute to the viability of biorefineries. To achieve this, we evaluated the effect of oxidation reactions in sugarcane bagasse and straw lignin, and coffee husk, for obtaining aromatic compounds of low molecular weight, especially vanillin. In addition, the applicability of the residual oxidized lignin for obtaining matrices for the controlled release of herbicides was also examined in this work. For this purpose, the lignocellulosic materials were pretreated with dilute acid and subjected to alkaline delignification to achieve separation of the lignin. The fractions obtained at each stage were analyzed for chemical composition and with Infrared Spectroscopy (FTIR). The lignins were also analyzed using UV-vis Spectroscopy (UV) and Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR and HSQC). The lignins obtained were subjected to oxidation using different physiochemical conditions – enzymatic oxidation with laccase, oxidation in acidic and alkaline medium with H_2O_2 and wet oxidation in aqueous and alkaline medium using H_2O_2 . The obtained liquid fraction was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to identify and quantify the aromatic aldehydes and other compounds of lignin degradation, while the solid fraction, comprising the oxidized residual lignin, was analyzed by FTIR and UV. The oxidized lignins derived from the conditions that have resulted in a maximum yield of vanillin, were applied in the formulation of controlled release matrices of ametryne. Results for non oxidized lignin showed bagasse and straw lignin being composed mainly of syringyl and guaiacyl units, respectively, linked predominantly by $\beta\text{-O-4}$ bonds, while coffee husk lignin was mainly composed of hydroxyl units linked by C-C bonds predominantly, indicating a more condensed structure. Of all the oxidation reactions, the oxidation in alkaline medium (NaOH 10%) using H_2O_2 9.1% showed the highest yield of vanillin with bagasse lignin (8.13 mg/g lignin) and coffee husk lignin (1.15 mg/g lignin), and H_2O_2 6.1% with straw lignin (6.48 mg/g lignin). The application of oxidized lignins as matrices resulted in the release of the herbicide ametryne with different kinetics, depending on the proportions and properties of the lignins applied.

Keywords: Lignin oxidation. Agroindustrial waste. Low molecular weight compounds. Biorefineries.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Estrutura morfológica da parede celular vegetal; (B) Representação esquemática da disposição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular.....	35
Figura 2 – Mecanismo de degradação de lignina em meio alcalino com eliminação no carbono alfa.	38
Figura 3 – Mecanismo de degradação de lignina em meio alcalino com eliminação no carbono gama.....	39
Figura 4 – Estrutura cristalina da celulose.	39
Figura 5 – Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.....	41
Figura 6 – Unidades fenilpropano precursoras da lignina.	41
Figura 7 – Representação da estrutura de lignina de palha de trigo.....	42
Figura 8 – Aldeídos aromáticos obtidos do processo de oxidação de lignina.	46
Figura 9 – Reação de oxidação de um composto modelo de lignina contendo ligação do tipo β -O-4 à vanilina.	53
Figura 10 – Exemplo de um composto modelo contendo ligação 5-5 e possíveis compostos obtidos por oxidação.	53
Figura 11 – Reação de oxidação de um composto modelo de lignina contendo ligação do tipo β -5 à vanilina.	54
Figura 12 – Reações de compostos modelo contendo ligações α -O-4 ou 4-O-5 à fenol e outros compostos.....	54
Figura 13 – Estrutura química do herbicida ametrina.	57
Figura 14 – Representação esquemática do procedimento experimental.....	59
Figura 15 – Esquema utilizado para realizar a oxidação enzimática.....	63
Figura 16 – Esquema utilizado para realizar a oxidação química.	65
Figura 17– Tubos de aço-inoxidável e banho de areia utilizados na oxidação úmida.	66
Figura 18 – Distribuição dos componentes do bagaço de cana in natura (1), do pré-tratado (2) e do deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.....	76
Figura 19 – Bagaço de cana moído: in natura (A), pré-tratado com ácido diluído (B) e deslignificado (C).	77
Figura 20 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de bagaço de cana (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).....	78
Figura 21 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de bagaço de cana-de-açúcar. Os espectros não foram normalizados. Os números de bandas assinalados na região ampliada (1400 a 1800 cm^{-1}) se referem à Tabela 7.	82

Figura 22 – Distribuição dos componentes da palha de cana in natura (1), do pré-tratado (2) e do deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.	85
Figura 23 – Palha de cana moída: in natura (A), pré-tratada com ácido diluído (B), e deslignificada (C).	86
Figura 24 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de palha de cana (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).	87
Figura 25 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de palha de cana-de-açúcar. Os espectros não foram normalizados. Os números de bandas assinalados na região ampliada (1400 a 1800 cm^{-1}) se referem à Tabela 11.	89
Figura 26 – Distribuição dos componentes da casca de café in natura (1), da pré-tratado (2) e da deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.	92
Figura 27 – Casca de café moída: in natura (A), pré-tratada com ácido diluído (B), e deslignificada (C).	93
Figura 28 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de casca de café (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).	94
Figura 29 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de casca de café. Os números de bandas assinalados na região ampliada (1400 a 1800 cm^{-1}) se referem à Tabela 15.	96
Figura 30 – Espectros no infravermelho das biomassas in natura (bagaço e palha de cana, e casca de café). Para uma análise semi-quantitativa, os espectros foram normalizados pela região de 3401-3418 cm^{-1} , conforme sugerido por Sgriccia et al. (2008).	97
Figura 31 – (A) Espectro de UV das soluções 0,025M de lignina de bagaço e palha de cana-de-açúcar e casca de café; (B) Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das soluções de lignina avaliadas.	101
Figura 32 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 19.	102
Figura 33 – Espectros de ^1H RMN das ligninas acetiladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (solvente: DMSO- d_6). A região de 5 a 9 ppm, que inclui a região dos aromáticos, foi ampliada para possibilitar uma melhor visualização do espectro.	107
Figura 34 – Espectros de RMN de ^{13}C das ligninas acetiladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (solvente: DMSO- d_6).	109
Figura 35 – Espectros de 2D HSQC RMN das ligninas acetiladas de bagaço (A) e palha de cana-de-açúcar (B) e de casca de café (C) (solvente: DMSO- d_6).	113

Figura 36 – Absorbância no UV a 280 nm durante a reação de oxidação enzimática do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).	116
Figura 37 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.	118
Figura 38 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar antes e após a oxidação enzimática (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 27.	119
Figura 39 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana-de-açúcar antes e após a oxidação enzimática (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 28.	120
Figura 40 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação enzimática (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 29.	121
Figura 41 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação enzimática utilizando lacase a 10 UI (1), 100 UI (2) e 200 UI (3) a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	125
Figura 42 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação enzimática do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).	126
Figura 43 – Absorbância no UV-vis a 280 nm durante a reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).	127
Figura 44 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.	129
Figura 45 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar antes e após a oxidação química em meio ácido (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 34.	130
Figura 46 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana-de-açúcar antes e após a oxidação química em meio ácido (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 35.	132
Figura 47 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação química em meio ácido (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 36.	133
Figura 48 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação ácida utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e 2 M HCl (1), 6,1% H_2O_2 e 2 M HCl (2) e 9,1% H_2O_2 e 0,2 M HCl (3) , a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	135
Figura 49 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).	139

Figura 50 – Absorbância no UV a 280 nm durante a reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio alcalino do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).....	140
Figura 51 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.	142
Figura 52 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 41.....	143
Figura 53 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 42.....	145
Figura 54 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 43.....	146
Figura 55 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação alcalina utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e NaOH 10% (1), 6,1% H_2O_2 e NaOH 10% (2) e 9,1% H_2O_2 e 1% NaOH (3), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	149
Figura 56 – Cinética de obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação alcalina utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e 10% NaOH (1), 6,1% H_2O_2 e 10% NaOH (2) e 9,1% H_2O_2 e 1% NaOH (3) , a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	152
Figura 57 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).....	154
Figura 58 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio aquoso nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir das ligninas de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	157
Figura 59 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 11,6% nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	160
Figura 60 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 17,4%, nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).	163
Figura 61 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas nas condições avaliadas.	166
Figura 62 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço e de palha de cana e de casca de café antes e após a oxidação úmida (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 52.....	167

Figura 63 – Ilustração das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), antes (1) e após (2) a oxidação sob as condições que melhor favoreceram a obtenção de vanilina.	169
Figura 64 – Ilustração do processo de extração dos compostos de baixa massa molar usando éter dietílico (1) e diclorometano (2) como solvente para lignina de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C) oxidadas sob as condições que melhor favoreceram a obtenção de vanilina.	169
Figura 65 – Aspecto físico das matrizes herbicida:lignina obtidas.....	171
Figura 66 – Espectro de absorção da lignina de bagaço em meio alcalino (0,005 g/L), da lignina de bagaço em água (0,005 g/L), da ametrina em água (0,005 g/L), e da liberação do herbicida na matriz em água após 1, 10, 20 e 50 dias de liberação.	172
Figura 67 – Liberação do herbicida ametrina em água em função do tempo, a partir das matrizes MLB, MLBO, MLP, MLPO, MLC, MLC 2:1 e MLCO 2:1.	173
Figura 68 – Liberação da ametrina nas diferentes matrizes avaliadas (meio aquoso a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$).	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa molar e grupos funcionais da lignina. Fonte: Doherty et al., 2011.....	43
Tabela 2– Possíveis aplicações de lignina de diversas origens na obtenção de produtos de valor agregado.....	45
Tabela 3– Composição química do bagaço de cana in natura, do pré-tratado e do deslignificado.	75
Tabela 4 – Composição química do bagaço de cana in natura e do tratado com ácido diluído e com NaOH de acordo com o determinado por outros autores.	75
Tabela 5 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para o bagaço de cana-de-açúcar.....	79
Tabela 6 – Importantes regiões de absorção de material lignocelulósico no espectro de infravermelho e suas atribuições. Adaptado de Ding et al. (2012), Shi e Li (2012), Sills et al. (2012) e Kubo e Kadla (2005).....	81
Tabela 7 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço de cana-se-açúcar durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	83
Tabela 8 – Composição química da palha de cana in natura, da pré-tratada e da deslignificada. ...	84
Tabela 9 – Composição química da palha de cana in natura e da tratada com ácido diluído e com NaOH de acordo com o determinado por outros autores.	84
Tabela 10 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para a palha de cana-de-açúcar.....	88
Tabela 11 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de palha de cana-se-açúcar durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	90
Tabela 12 – Composição química da casca de café in natura, da pré-tratada e da deslignificada. .	91
Tabela 13 – Composição química da casca de café in natura de acordo com o determinado por outros autores.	91
Tabela 14 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para a casca de café.....	95
Tabela 15 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de casca de café durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	97
Tabela 16 – Composição química das ligninas obtidas a partir do bagaço e da palha de cana-de-açúcar e da casca de café após a etapa de deslignificação.	99
Tabela 17 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel.	99
Tabela 18 – Parâmetros obtidos a partir das curvas de calibração das amostras de lignina usando a lei de Lambert-Beer. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	101
Tabela 19 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço, palha de cana-de-açúcar e casca de café (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	103

Tabela 20 – Principais regiões de absorção no espectro de infravermelho de ligninas do tipo G, GS e HGS de acordo com Faix (1994).	105
Tabela 21 – Atribuições e percentagens de diferentes tipos de prótons das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, baseado na integração dos sinais de ^1H RMN. Regiões de atribuições de acordo com Chen e Robert (1988).	107
Tabela 22 – Atribuições e percentagens dos sinais de RMN de ^{13}C das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café em DMSO- d_6 . Regiões de atribuições de acordo com as publicações de Ramires et al. (2010), Capanema et al. (2005) e Lin e Dence (1992).	110
Tabela 23 – Atribuições dos sinais de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC RMN das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café em DMSO- d_6 . Regiões de atribuições de acordo com as publicações de Pu et al. (2013), Yuan et al. (2011) e Sun et al. (2013).	114
Tabela 24 – Relação H/G/S e porcentagem relativas dessas unidades obtidas por meio de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC RMN e de ^{13}C RMN das ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café.	114
Tabela 25 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.	117
Tabela 26 – Média do coeficiente de extinção (ϵ) das ligninas após a oxidação enzimática e seus respectivos desvios padrão. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	118
Tabela 27 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço de cana-de-açúcar (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	120
Tabela 28 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de palha de cana-de-açúcar (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	121
Tabela 29 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de casca de café (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	122
Tabela 30 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação enzimática e seus respectivos desvios padrão. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	124
Tabela 31 – ANOVA dos efeitos da variáveis aplicados ao processo enzimático na produção de vanilina. Valores de $p \leq 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.	125
Tabela 32 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.	128
Tabela 33 – Absortividade das ligninas após a oxidação química em meio ácido utilizando H_2O_2 como agente oxidante. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	129
Tabela 34 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço de cana (cm^{-1}) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	131

Tabela 35 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de palha de cana (cm ⁻¹) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	132
Tabela 36 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de casca de café (cm ⁻¹) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	134
Tabela 37 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação ácida utilizando H ₂ O ₂ como agente oxidante e seus respectivos desvios padrão. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).	136
Tabela 38 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo oxidativo químico em meio ácido em termos de produção de vanilina. Valores de p≤0,05 indicam parâmetros estatisticamente significativos.	138
Tabela 39 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.....	140
Tabela 40 – Coeficiente de extinção das ligninas após a oxidação química em meio alcalino utilizando H ₂ O ₂ como agente oxidante.As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).	141
Tabela 41 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço de cana (cm ⁻¹) após oxidação química em meio alcalino, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	144
Tabela 42 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de palha de cana (cm ⁻¹) após oxidação química em meio alcalino, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	145
Tabela 43 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de casca de café (cm ⁻¹) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).....	147
Tabela 44 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação alcalina utilizando H ₂ O ₂ como agente oxidante e seus respectivos desvios padrão.As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).	148
Tabela 45 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo oxidativo químico em meio alcalino em termos de produção de vanilina. Valores de p<0,05 indicam parâmetros estatisticamente significativos.	153
Tabela 46 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação úmida das ligninas de bagaço e palha da cana-de-açúcar, e da casca de café, nos diferentes meios reacionais.	155
Tabela 47 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio aquoso nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café.As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).	156

Tabela 48 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 11,6% nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....	159
Tabela 49 – Obtenção de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 17,4%, nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	162
Tabela 50 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo de oxidação úmida em termos de produção de vanilina. Valores de $p < 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.	165
Tabela 51 – Coeficiente de extinção das ligninas após a oxidação úmida. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....	166
Tabela 52 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço e de palha de cana, e de casca de café (cm^{-1}) após oxidação úmida, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).	168
Tabela 53 – Avaliação da utilização de diferentes solventes orgânicos na extração dos compostos aromáticos após a oxidação alcalina da lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café, nas condições pré-definidas. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).	169
Tabela 54 – Média e desvios do percentual de liberação do herbicida das matrizes. As médias do período final de análise com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$). .	172
Tabela 55 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicadas ao processo de liberação do herbicida em água. Valores de $P < 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.....	174

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1	Biorrefinarias	28
2.2	Resíduos agroindustriais	31
2.2.1	Cana-de-açúcar e seus subprodutos.....	31
2.2.2	Café e seus subprodutos	32
2.3	Composição química e morfológica da biomassa vegetal.....	34
2.3.1	Celulose.....	39
2.3.2	Hemicelulose.....	40
2.3.3	Lignina	41
2.4	Compostos Aromáticos	45
2.5	Oxidação de lignina.....	50
2.5.1	Reações de oxidações a partir de compostos modelo de lignina	52
2.6	Matrizes para liberação controlada de herbicidas	55
3	OBJETIVOS.....	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	Processo para obtenção das ligninas a partir do bagaço de cana, da palha de cana e da casca de café.....	60
4.1.1	Hidrólise com ácido diluído.....	60
4.1.2	Extração alcalina	60
4.1.3	Obtenção das ligninas	61
4.1.4	Determinação do rendimento total.....	61
4.1.5	Determinação da perda de componentes	61
4.1.6	Determinação do rendimento total de lignina	62
4.2	Reações de oxidação.....	62
4.2.1	Oxidação Enzimática	62
4.2.1.1	Determinação da atividade enzimática.....	63
4.2.2	Oxidação com peróxido de hidrogênio em meio ácido	64
4.2.3	Oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino	64
4.2.4	Oxidação úmida com peróxido de hidrogênio.....	65
4.3	Extração e quantificação dos compostos aromáticos.....	66
4.4	Aplicações da lignina oxidada residual em matriz para liberação controlada de herbicida	67
4.5	Avaliações físico-químicas do material lignocelulósico e da lignina	68

4.5.1	Determinação da composição química dos materiais lignocelulósicos	68
4.5.1.1	Carboidratos e ácidos orgânicos	68
4.5.1.2	Furfural e hidroximetilfurfural	69
4.5.1.3	Lignina solúvel	69
4.5.1.4	Lignina insolúvel	70
4.5.1.5	Cinzas	70
4.5.2	Determinação da composição química das ligninas	70
4.5.2.1	Carboidratos	70
4.5.2.2	Lignina solúvel	71
4.5.2.3	Lignina insolúvel	71
4.5.2.4	Cinzas	71
4.5.3	Espectrometria de Infravermelho	72
4.5.4	Espectrometria de Ultravioleta	72
4.5.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	72
5	RESULTADOS	74
5.1	Caracterização das biomassas utilizadas na obtenção das ligninas	74
5.1.1	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	74
5.1.2	Análises de Infravermelho do bagaço de cana-de-açúcar	80
5.1.3	Caracterização química da palha de cana-de-açúcar	83
5.1.4	Análises de Infravermelho da palha de cana-de-açúcar	88
5.1.5	Caracterização química da casca de café	90
5.1.6	Análise de Infravermelho da casca de café	95
5.1.7	Análise de Infravermelho das biomassas in natura	97
5.2	Avaliações das ligninas obtidas	98
5.2.1	Caracterização química das ligninas	98
5.2.2	Análises de Ultravioleta (UV) das ligninas	100
5.2.3	Análises de Infravermelho (FTIR) das ligninas	102
5.2.4	Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das ligninas	106
5.3	Avaliação das oxidações das ligninas	115
5.3.1	Oxidação enzimática	115
5.3.1.1	Análise de Ultravioleta	117
5.3.1.2	Análise de Infravermelho	118
5.3.1.3	Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE	122
5.3.2	Oxidação em meio ácido	126
5.3.2.1	Análise de Ultravioleta	128

5.3.2.2	Análise de Infravermelho	129
5.3.2.3	Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE.....	134
5.3.3	Oxidação em meio alcalino	139
5.3.3.1	Análise de Ultravioleta	141
5.3.3.2	Análise de Infravermelho	142
5.3.3.3	Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE.....	147
5.3.4	Oxidação úmida	154
5.3.4.1	Análise dos compostos de baixa massa molar	155
5.3.4.2	Análise de Ultravioleta	165
5.3.4.3	Análise de Infravermelho	166
5.3.5	Escolha da condição que favoreceu a obtenção de vanilina	168
5.4	Matriz para liberação controlada de herbicida	170
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	176
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

1 INTRODUÇÃO

A nossa sociedade atual é extremamente dependente de combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural) para atender às necessidades básicas de energia, combustíveis, produtos químicos orgânicos e polímeros (MAITY, 2015). Mais de 80% da energia e cerca de 90% das substâncias orgânicas no mundo são derivadas de combustíveis fósseis (FERNANDO et al., 2006; INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2011). Além disso, o consumo de energia e de produtos químicos orgânicos estão crescendo incessantemente (cerca de 7% ao ano) devido ao rápido aumento da população mundial atrelado a melhores padrões de vida (MAITY, 2015). A crescente demanda de energia, o esgotamento gradual dos combustíveis fósseis e, conseqüentemente, o aumento no preço do óleo bruto, e a deterioração do meio ambiente devido às emissões de gases causadores do efeito estufa pelo uso em larga escala de combustíveis fósseis, são as principais motivações para a exploração de recursos renováveis para a produção sustentável de eletricidade, calor, combustíveis, produtos químicos orgânicos e polímeros (ROSTRUP-NIELSEN, 2008).

Com exceção à biomassa, fontes renováveis, como a nuclear, hídrica e outras, são incapazes de atender essa produção necessária de combustíveis, compostos químicos e polímeros (MAITY, 2015), sendo a biomassa lignocelulósica considerada como um dos recursos renováveis mais promissores para substituir energia e materiais de origem fóssil (BERNDES et al., 2003; SANDERSON, 2011; WEN et al., 2011). O complexo uso de tecnologias de processamento para conversão de biomassa é análogo às refinarias integradas de petróleo que existem hoje, e é comumente denominado como biorrefinarias (FERNANDO et al., 2006; KAMM; KAMM, 2004).

O bioetanol é reconhecido como um dos biocombustíveis mais promissores no mundo. A produção de etanol corresponde a aproximadamente 94% da produção mundial de biocombustíveis, e dessa fração, cerca de 78% é produzido pelo Brasil e pelos Estados Unidos (DERMIBAS, 2011). A produção comercial de etanol, predominantemente, se dá a partir de açúcares e materiais amiláceos (MARIANO et al., 2013), mas biomassas lignocelulósicas são as fontes alternativas para a produção de etanol de segunda geração (LYND et al., 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Porém, a utilização de materiais lignocelulósicos para fins químicos ou biotecnológicos requer a ruptura do complexo lignina-celulose-polioses (componentes base da biomassa), e a separação seletiva de cada fração por técnicas de pré-tratamento e/ou deslignificação (CUNHA, 2005; MARTIN et al., 1995).

Neste cenário, a necessidade de desenvolver biorrefinarias integradas, que sejam capazes de produzir combustíveis e produtos químicos a partir da biomassa é urgente. De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – NATIONAL RENEWABLE ENERGY

LABORATORY, 2011) o termo biorrefinaria se refere a um mecanismo integrado entre equipamentos e processos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos. Por meio da obtenção de vários produtos, uma biorrefinaria pode tirar vantagem das diferenças dos componentes e intermediários da biomassa e maximizar o valor derivado da matéria-prima. Os produtos de alto valor aumentam a rentabilidade, o alto volume de combustível ajuda a satisfazer as necessidades energéticas nacionais, e a produção de energia reduz custos e evita emissões de gases causadores do efeito estufa (NREL, 2011).

A lignina, um dos componentes que constituem a biomassa lignocelulósica, é uma macromolécula composta por unidades fenilpropano, e sua valorização constitui um fator importante na viabilização das biorrefinarias (ZAKZESKI et al., 2010). Grande parte da lignina disponível é obtida como subproduto da produção de polpa celulósica (PYE, 2008), sendo sua principal utilização a queima para geração de energia na própria indústria, havendo ainda assim um excedente de lignina. No entanto, uma grande variedade de produtos químicos mais valiosos poderiam ser produzidos de forma sustentável a partir da estrutura aromática da lignina (VANDERGHEM et al., 2011). A sua oxidação produz compostos de baixa massa molar, tais como vanilina, ácido vanílico e outros ácidos e aldeídos aromáticos, utilizados em sínteses orgânicas (GONÇALVES; LUZ, 2001). Esses aldeídos apresentam uma gama de aplicações, como por exemplo, em aromas e fragrâncias, intermediários químicos em produtos farmacêuticos e defensivos agrícolas (SALES et al., 2006). As ligninas de alta massa molar podem ser usadas para produzir fibras de carbono, modificadores de polímeros, adesivos, matrizes para liberação controlada de herbicidas e resinas (FROLLINI; CASTELLAN, 2012; COTTERILL et al., 1996; FERRAZ et al., 1997).

Desta forma, a utilização de materiais lignocelulósicos como recursos renováveis para a produção de combustíveis e produtos químicos desperta a atenção de pesquisadores e governantes, preocupados com a disponibilidade limitada e o impacto ambiental causado pelo uso de combustíveis fósseis. Entre os materiais lignocelulósicos, o uso de resíduos agrícolas além do baixo custo, possui o benefício de eliminar a problemática de resíduos sólidos (CARA et al., 2006) e seu bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social. Graças à vasta biodiversidade encontrada no Brasil, a cada ano, cerca de 330 milhões de toneladas de resíduos de biomassa são gerados (VIRMOND et al., 2012). A cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas do País, representando cerca de 25% da produção mundial, o que gera uma enorme quantidade de resíduos (UNICA, 2011). O Brasil é também o maior produtor mundial de café, gerando anualmente cerca de 2,7 milhões de toneladas de casca de café provenientes de unidades de processamento (CONAB, 2014).

Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de reações de oxidação em ligninas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar, e de casca de café, na obtenção de compostos aromáticos de baixa massa molar, em especial a vanilina, e adicionalmente, verificar a aplicabilidade da lignina oxidada residual na obtenção de matrizes para liberação controlada de herbicida, buscando alternativas para agregar valor à lignina proveniente de resíduos agroindustriais e contribuir com a viabilização de biorrefinarias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinarias

A produção sustentável de energia, combustíveis, produtos químicos orgânicos e polímeros a partir de biomassa em uma biorrefinaria integrada é extremamente importante para reduzir a dependência dos combustíveis fósseis limitados (MAITY, 2015).

O conceito de biorrefinaria foi originado no final dos anos 1990, como um resultado da escassez de combustíveis fósseis e aumento das tendências do uso de biomassa como matéria-prima renovável para a produção de produtos não-alimentícios (FERNANDO et al., 2006; KAMM; KAMM, 2004).

Possíveis analogias entre a refinaria de petróleo do século XX e a biorrefinaria do século XXI são aqui descritas. No início, a refinaria de petróleo fez poucos produtos e incorporou uma pequena integração química e energética. O desenvolvimento da refinaria de petróleo levou considerável esforço, abrangendo décadas, para tornar esse sistema altamente eficiente e integrado que existe hoje, e muitos dos avanços que permitiram esta notável transformação envolvem o desenvolvimento catalítico. Em um trajeto semelhante, as biorrefinarias atuais, que ainda estão em sua infância, produzem relativamente poucas substâncias químicas (principalmente etanol ou bio-óleos) com pequena integração química e energética. Em analogia com a história da refinaria de petróleo, com o desenvolvimento de tecnologia de catálise, a biorrefinaria pode tornar-se um sistema eficiente e altamente integrado para satisfazer os requisitos químicos e de combustíveis do século XXI (ZAKZESKI et al., 2010). Para justificar a construção de uma biorrefinaria, a produção de ambos, combustíveis e produtos, é necessária, a fim de alcançar um alto impacto energético e retorno adequado sobre o investimento (BOZELL et al., 2007).

A energia de fonte fóssil é utilizada em sua grande parte como combustível, e segundo dados da Agência Internacional de Energia (IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2009), em 14 anos houve um aumento de aproximadamente 54% nas emissões de gases estufa relacionados com o uso de combustíveis fósseis, o que torna o uso destes combustíveis cada vez mais insustentável. Dentro deste contexto, a utilização da biomassa torna-se interessante por diversas razões, como, redução nas emissões de CO₂, estabilidade energética, viabilidade econômica e benefícios sociais e ambientais, como o desenvolvimento de áreas rurais e a gestão de resíduos sólidos provenientes da agroindústria (HALL, 1997).

O etanol é um dos mais promissores biocombustíveis, visto que, em princípio, pode ser derivado a partir de qualquer material que contenha açúcares simples ou complexos. O Brasil é

referência na produção de agroenergia. Programas como os do etanol e do biodiesel atraem a atenção do mundo por ofertar alternativas econômica e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis (BRASIL, 2015a). De acordo com Schuchardt et al. (2001), o etanol pode ser utilizado na preparação de diversos compostos petroquímicos (etileno, propileno, buteno e butadieno) através de reações de síntese orgânica. No entanto, a matéria-prima mais promissora para produção de etanol seria materiais lignocelulósicos, devido a celulose ser o biopolímero mais comum na Terra e ser um polissacarídeo, isto é, ele pode ser convertido em açúcares e fermentado para produzir etanol (HAMELINCK; FAALJ, 2005). Assim, o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos tem o potencial para ser um substituto, ou complementar, à gasolina (PICCOLO; BEZZO, 2008).

Contrariamente aos recursos do petróleo que são limitados na sua natureza e composição, a biomassa vegetal é composta por compostos heterogêneos tais como celulose, hemicelulose, lignina, óleos, amido e proteínas (OCTAVE; THOMAS, 2009). Para a obtenção de diversos produtos químicos e combustíveis a partir de biomassa, como o etanol por exemplo, é necessário primeiramente separar as frações lignocelulósicas (BALAT et al., 2008). Assim, tecnologias específicas devem ser desenvolvidas a fim de converter eficientemente cada fração em produtos de valor agregado (FITZPATRICK et al., 2010).

Numa biorrefinaria, a lignina permanece como a fração mais inutilizada. A lignina corresponde de 10 a 30% em peso no material lignocelulósico, e é equivalente a 40% do seu conteúdo de energia. Assim, a economia da biorrefinaria tem grande dependência na disponibilidade de processos de baixo custo para conversão de lignina de baixo valor em combustíveis e produtos químicos de valor agregado (MAITY, 2015). O Instituto Internacional de Lignina (ILI – International Lignin Institute) é uma associação que une as partes interessadas de universidades e de indústrias com interesse na valorização da lignina. O ILI é guiado pela visão de uma tecnologia do futuro para a conversão de diversos produtos alternativos de plantas lignocelulósicas em processos cíclicos ambientalmente adequados, onde a lignina é o produto principal, usado na maior valorização possível (ZAKZESKI et al., 2010). Por exemplo, com o conceito de biorrefinaria e valorização de todos os componentes em mente, a PureVision Technology Inc., tem desenvolvido uma tecnologia de fracionamento da biomassa que produz lignina de baixa massa molar com valor agregado (KADAM et al., 2009). No entanto, os métodos para a conversão e aplicação da lignina que não sejam simplesmente queimá-la para a produção de calor no processo são geralmente ausentes. Um grande esforço é, portanto, necessário para desenvolver novas tecnologias para a valorização da lignina, convertendo-a, pelo menos parcialmente, à produtos químicos de valor agregado (ZAKZESKI et al., 2010).

A viabilidade da produção de biocombustíveis seria claramente reforçada pelo desenvolvimento de mercados para produtos derivados da lignina. Há uma série de fatores físico-químicos que sugerem um futuro brilhante para produtos derivados da lignina: (a) compatibilidade com uma série de produtos químicos industriais, (b) presença de anéis aromáticos fornecendo estabilidade, boas propriedades mecânicas, bem como a possibilidade de uma ampla gama de transformações químicas, (c) presença de outros grupos funcionais reativos permitindo fácil preparação de enxerto de copolímeros, (d) boas propriedades reológicas e viscoelásticas para elementos estruturais, (e) boa capacidade de formação de filme, (f) partículas de tamanho pequeno, e (g) caráter hidrofílico ou hidrofóbico, dependendo da origem, permitindo uma grande variedade de misturas a serem produzidas (MOUSAVIOUN; DOHERTY, 2009).

Uma grande variedade de produtos químicos podem ser produzidos de uma forma sustentável a partir da estrutura aromática de ligninas (VANDERGHEM et al., 2011). Ligninas de alta massa molar podem ser usadas para produzir fibras de carbono, modificadores de polímeros, adesivos e resinas (FROLLINI; CASTELLAN, 2012). Ela também fornece uma fonte barata de vanilina e siringol para a indústria de aromas e fragrâncias (ADSUL et al., 2011). Fungos e suas enzimas ligninolíticas foram propostos para liberar um número de fragmentos aromáticos de baixa massa molar através de alterações oxidativas e despolimerização progressiva da lignina (KIRK; FARELL, 1987). No entanto, poucos produtos químicos de baixa massa molar derivados de lignina estão disponíveis comercialmente, apesar dos numerosos estudos que têm sido realizados sobre métodos de despolimerização (TORR et al., 2011). Isto se deve à complexidade das estruturas de ligninas que dependem de sua origem e do processo de separação utilizado. Ligninas extraídas de plantas anuais, em geral, apresentam um maior número de sítios ativos que estão disponíveis para reagir porque elas contêm uma maior proporção de anel aromático tipo *p*-hidroxifenil (H) em comparação com a lignina extraída da madeira (FENGEL; WEGENER, 1989).

Dessa forma, a conversão destes subprodutos em produtos de alto valor agregado iria diluir o custo do biocombustível, melhorar a economia da biorrefinaria de lignocelulósico, minimizar a descarga de resíduos, e reduzir a dependência de produtos a base do petróleo. A biorrefinaria iria oferecer novas oportunidades econômicas para agricultura e para indústria química por meio da produção de uma enorme variedade de produtos químicos, combustíveis de transporte e de energia (FITZPATRICK et al., 2010).

Nesse contexto, torna-se interessante a utilização de resíduos agroindustriais para obtenção e posterior transformação de lignina. Além de sua utilização na produção de energia devido ao seu alto poder calorífico, é importante o desenvolvimento de aplicações mais racionais, promovidas por modificações químicas, gerando produtos com maior valor agregado, como os compostos de aromas.

2.2 Resíduos agroindustriais

2.2.1 Cana-de-açúcar e seus subprodutos

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*. Foi introduzida no Brasil no período colonial, e se transformou em uma das principais culturas na economia brasileira, utilizada principalmente na produção de açúcar e álcool. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol de cana e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (BRASIL, 2015a).

Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o País deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e produzir 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas (BRASIL, 2015a).

A planta é composta por duas partes: uma subterrânea (rizomas e raízes) e outra aérea (colmo, folhas e flores). O colmo é constituído de nós e entrenós e possui um sistema com duas fases, a fase sólida, também chamada de fibra, constituída por celulose, lignina e hemicelulose e, a fase líquida cujo caldo contém substâncias orgânicas e 90% de sacarose. A composição química do colmo é influenciada pelo clima, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo empregado, variedade, estágio de maturação e idade da planta (NOGUEIRA et al., 2005).

A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o País, sendo 60% no estado de São Paulo (BRASIL, 2015a). Estima-se que, na safra 2014/2015, o Brasil produziu 634,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gerando aproximadamente 178 milhões de toneladas de resíduos (bagaço e palha) (UNICA, 2015). O potencial de produção de resíduos da cana-de-açúcar (matéria-seca) representa em média 28% da massa da cana (SEABRA, 2008), para cada tonelada de cana (colmos) produzida têm-se 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (APTA, 2010).

O bagaço é oriundo da moagem do material vegetal e é composto por fibras e resíduos de caldo (FASANELLA, 2008). Grande parte do bagaço gerado é aproveitado como fonte energética dentro da própria usina como combustível para a geração de vapor e energia elétrica. Mesmo com a existência do autoconsumo, ainda há excedentes. Assim, um grande volume de bagaço é acumulado nos pátios das usinas, gerando vários problemas, como a disposição do material e o risco de incêndio (IPT, 2006). Devido à grande quantidade produzida e a suas características físicas

e químicas, esse material encontra um vasto campo de utilização, dentre eles na produção de etanol de segunda geração, ração animal, na indústria química, na fabricação de papel, papelão e aglomerados, como material alternativo na construção civil e na produção de biomassa microbiana (SANTOS, 2005).

Outro resíduo que vem anualmente aumentando no setor sucro-alcooleiro é a palha de cana. A palha é encontrada na superfície da área plantada após a colheita e neste resíduo encontram-se folhas, ponteiros, colmos e raízes. Durante sua queima no campo, a palha libera gases tóxicos e uma fuligem que apresenta substâncias carcinogênicas (MORIYA, 2007). Por este motivo, em 19 de setembro de 2002, o Estado de São Paulo criou a lei n. 11,241, que dispõe a eliminação gradativa da queima da cana. Até o ano de 2031, a colheita manual deverá ser totalmente substituída pela colheita mecânica (ALESP, 2011).

De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA), cerca de metade da energia do Brasil vem de fontes renováveis, em comparação com uma média de menos do que 20% para o resto do mundo. Este quadro nacional apresentado mostra a preocupação do País em obter energia a partir de fontes renováveis, sendo o bagaço e a palha subprodutos da plantação de cana potencialmente aplicáveis na produção de etanol de segunda geração, favorecendo a obtenção de combustíveis renováveis na matriz energética Brasileira (SUGARCANE, 2012), e gerando como sub-produto a lignina.

2.2.2 Café e seus subprodutos

O café é uma planta gimnosperma pertencente à família botânica *Rubiaceae*, que tem cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. Economicamente, as duas espécies mais importantes são o *Coffea arabica* (café Arábica) e o *Coffea canephora* (café Robusta) (CLIFFORD; WILSON, 1985).

O fruto do café é formado por casca (epicarpo), polpa e mucilagem (mesocarpo), pergaminho (endocarpo), e sementes ou grãos (endosperma) (CAFÉ BRASIL, 2007). A casca de café é rica em nutrientes e compostos orgânicos, além de conter compostos fenólicos como cafeína, taninos, polifenóis (PANDEY et al., 2000), lignina e flavonóides (SALGADO, 2004). A polpa de café é essencialmente rica em carboidratos, proteínas e minerais (principalmente potássio) e também contém apreciáveis quantidades de taninos, polifenóis e cafeína (BRESSANI et al., 1972). A mucilagem é uma camada viscosa, rica em açúcares e pectina (CAFÉ BRASIL, 2007). A composição química do café depende da espécie e da variedade em questão, e também de outros fatores como práticas agrícolas e grau de maturação do fruto (TOLEDO; BARBOSA, 1997).

O Brasil, maior produtor e exportador mundial de café, e segundo maior consumidor do produto, apresenta, atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,256 milhões de hectares. A safra em 2014 (arábica e conilon) alcançou 45,34 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, estimando-se uma geração de 2708 mil toneladas de cascas (BRASIL, 2015b).

Os subprodutos e resíduos provenientes do processamento do café constituem uma grave fonte de contaminação, causando sérios problemas ambientais. Para se ter uma idéia do impacto ambiental dos resíduos gerados no processamento do café, apenas 6% do café processado constitui a porção destinada a produção de pó de café, os outros 94% são subprodutos como água de lavagem, polpa e casca (YOSHIDA, 2005).

O café verde comercializado no mercado internacional constitui apenas 50-55% da matéria seca da cereja madura (VICENT, 1987). O material restante é desviado para vários subprodutos, dependendo da técnica de processamento utilizado (método seco ou úmido). A casca de café (composta pela polpa, casca e pergaminho) é o maior resíduo sólido proveniente do beneficiamento do café (SAENGER et al., 2001; FRANCA; OLIVEIRA, 2009). Para cada tonelada de grãos de café produzidos, aproximadamente 1 tonelada de casca são geradas durante o processamento a seco (SAENGER et al., 2001; FRANCA; OLIVEIRA, 2009), ao passo que para o processamento úmido e semi-úmido este resíduo equivale a mais de 2 toneladas (SAENGER et al., 2001), sendo 2,28 ton de casca, polpa e pergaminho, e 22,73 ton de água residual (COMPANY INFORMATION BOOKLET, 1996; YOSHIDA, 2005). No Brasil predomina o sistema de beneficiamento do café por via seca (CARVALHO, 1992, SILVA et al., 2007), uma vez que esta é a forma de processamento de 90% da produção total (SILVA; LEITE, 2000).

Tradicionalmente, aplicações para casca e polpa de café estão limitadas a aplicações como fertilizantes, alimentação animal, compostagem, uso direto como combustível, e outros (FAN et al., 2003). Apesar da combustão de resíduos agrícolas ser geralmente considerada como uma fonte alternativa de energia, já foi demonstrado que problemas maiores são propensos a acontecer, como aglomeração, incrustações e emissões excessivas, devido ao baixo ponto de fusão das cinzas e da quantidade significativa de matéria orgânica volátil presente na casca de café (SAENGER et al., 2001).

Alternativas ao uso eficiente desses subprodutos têm avaliado sua aplicação como substrato em bioprocessos. No entanto, sua utilização em larga escala continua a ser um desafio em todo o mundo, devido ao seu teor de cafeína, fenóis livres e taninos (polifenóis), os quais são conhecidos como sendo muito tóxico para muitos processos vitais (FAN et al., 2003). Tentativas têm sido feitas para desintoxicar esse resíduo para utilizá-los como um substrato eficaz na produção de diversos produtos com valor agregado, tais como enzimas, ácidos orgânicos, aromas, dentre outros. Uma vez que estes resíduos contêm quantidades substanciais de açúcares

fermentáveis, estes podem constituir um substrato adequado para o cultivo de fungos e leveduras (MURTHY; NAIDU, 2012) e, portanto, pode ser visto como uma potencial matéria-prima para a produção de bioetanol (OLIVEIRA et al., 2008). Gouvea et al. (2009) indicaram que a casca de café apresenta excelente potencial para produção de etanol. Eles avaliaram a viabilidade da produção de etanol por fermentação das cascas de café por *S. cerevisiae*, obtendo uma produção de etanol de $13,6 \pm 0,5$ g de etanol/L, um valor comparável com os dados da literatura para outros subprodutos, tais como caule de milho (5 g de etanol/L) (BELKACEMI et al., 2002), palha de cevada (10 g de etanol/L) (BELKACEMI et al., 2002), vinhaça de trigo (11 g de etanol/L) (DAVIS et al., 2005) e palha de milho (16,8 g de etanol/L) (OHGREM et al., 2007).

Portanto, a grande disponibilidade de resíduos agroindustriais, associada à busca por um desenvolvimento sustentável, tem impulsionado vários grupos de pesquisa a estudar as características químicas e estruturais desses subprodutos e desenvolver tecnologias que visem o aproveitamento integral da biomassa de forma mais racional, agregando valor a matéria-prima dentro de um conceito de biorrefinaria.

2.3 Composição química e morfológica da biomassa vegetal

Embora as espécies de plantas no mundo possuam morfologias diferentes, os materiais lignocelulósicos, como o bagaço, a palha de cana-de-açúcar e a casca de café são principalmente constituídos de três componentes: celulose, hemicelulose (poliose) e lignina. Outros compostos em menor quantidade correspondem aos extrativos, amido, proteínas, cinzas e ácidos graxos (OLIVEIRA, 2006). A categoria de extrativos é formada por óleos voláteis, terpenos, ácidos graxos, alcalóides e diferentes compostos fenólicos que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (GOLDSTEIN, 1991). A proporção de cada um destes componentes varia de acordo com a espécie, disposição e sazonalidade da planta.

É importante ressaltar que os três principais componentes dos materiais lignocelulósicos encontram-se intimamente associados para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular, celulose, hemicelulose e lignina, organizam-se formando diferentes camadas: parede primária (P), secundária (S1, S2 e S3) e as diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido das plantas (Figura 1).

Figura 1 – (A) Estrutura morfológica da parede celular vegetal; (B) Representação esquemática da disposição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular.

Fonte: Adaptado de Sticklen, 2008.

A parede primária (P) é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. Ressalta-se que a quantidade de celulose na parede primária é muito limitada, contendo também polioses, pectina e proteínas, imersos numa matriz de lignina. A parede secundária é a camada mais espessa da célula, sendo constituída por três camadas, S1, S2 e S3. Nestas regiões as microfibrilas de celulose possuem distintas orientações em relação ao eixo longitudinal da célula. A parede mais espessa é a S2, na qual as microfibrilas de celulose se encontram orientadas de forma quase paralela ao eixo axial da célula. As fibrilas de celulose próximas ao lúmen da célula compreendem a S3 e estão orientadas quase perpendicularmente ao eixo da célula. Na parede celular, as fibrilas elementares estão separadas umas das outras por uma camada de polioses, que formando as microfibrilas, que são envolvidas em uma matriz de lignina, formando a parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989).

A deposição da lignina ocorre durante o espessamento da parede celular secundária e é iniciada pela região da lamela média e parede primária. Quando a formação dos polissacarídeos da matriz da camada S2 é concluída, inicia-se a lignificação da parede secundária. A maior parte da lignina é depositada quando a celulose e a hemicelulose são depositadas na camada S3, e é encontrada, em maior quantidade na camada S2, porém na lamela média ela se encontra em maior concentração (SAKA et.al., 1985; BAUCHER et.al., 1998; DONALDSON et.al., 2001).

O grau de ordenamento das moléculas de celulose é diferente. Quando se encontram altamente ordenadas são conhecidas como cristalinas. Da mesma maneira, as regiões com menor grau de ordenamento são denominadas de amorfas (GÓMEZ et al., 2008). As regiões cristalinas de celulose são mais resistente à degradação do que as partes amorfas, portanto, apresentam maior grau de polimerização (HALLAC; RAGAUŠKAS, 2012). No interior da parede secundária, a lignina

está concentrada nos espaços entre as microfibras e nas regiões amorfas, entre cristais de celulose. Nas regiões amorfas, entre cristais de celulose, se encontram também a hemicelulose, minerais e outros materiais como óleos, ceras, óleos essenciais, taninos, resinas, carboidratos solúveis e proteínas (GÓMEZ et al., 2008). A matriz amorfa de hemicelulose e lignina que envolve a celulose age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A maioria dos substratos celulósicos potenciais para bioconversão são fortemente lignificados. Assim, a maior parte da celulose na natureza não é adequada para bioconversão, ao menos que procedimentos eficazes e economicamente viáveis sejam desenvolvidos para remover ou modificar a lignina (MENON; RAGAUSKAS, 2012). Portanto, para que se possa converter os constituintes do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, e da casca de café em combustíveis e produtos químicos de maior valor agregado são necessárias etapas de separação destes constituintes lignocelulósicos.

Isto implica na ruptura do complexo lignina-celulose-poliose e na remoção de cada fração por processos de pré-tratamento. A quantidade variável de hemicelulose e de lignina em um material lignocelulósico depende de fatores como o tipo da planta a partir da qual a biomassa é obtida, idade da colheita, entre outros. Isto mostra que não há nenhum método de pré-tratamento específico para diversos tipos de materiais lignocelulósicos (CLAASSEN et al., 1999). Os tipos de pré-tratamento dependem do material utilizado, do custo envolvido, e da finalidade proposta para utilização das frações lignocelulósicas, podendo ser físicos (moagem da biomassa, aplicação de radiação), biológicos (microrganismos decompositores da madeira) e químicos (pré-tratamento hidrotérmico, oxidação úmida, pré-tratamento em meio ácido ou básico), ou ainda uma combinação de alguns desses processos (explosão a vapor e explosão de fibra por amônia) (MOSIER et al., 2005).

A geração de lignina de alto valor agregado também pode ser um parâmetro de comparação entre os diversos tipos de pré-tratamentos. Além disso, o impacto do pré-tratamento no custo das etapas posteriores de recuperação de produto também deve ser avaliado (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; WYMAN, 1999).

Dentre os tipos de pré-tratamento existentes, o ácido diluído foi um dos mais estudados e amplamente utilizado (KARIMI et al., 2006; TUCKER et al., 2003; CHUNG et al., 2005; KIM, 2005). A hidrólise utilizando ácido diluído tem sido aplicada à diversos resíduos agrícolas, empregando-se uma extensa faixa de catalisadores tais como os ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico e nítrico (RAMOS, 2003; SEABRA, 2008). Ele pode ser realizado em duas condições: à temperaturas mais elevadas (acima de 160 °C) por curto período, ou por um longo período de residência à temperaturas mais baixas (VASCONCELOS et al., 2013). O pré-tratamento com ácido diluído dos

materiais lignocelulósicos provoca a hidrólise da hemicelulose, especialmente das xilanas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), em açúcares fermentescíveis (xilose, arabinose, entre outros), os quais são solúveis em água, juntamente com a formação de um resíduo sólido rico em celulose e lignina. Numa biorrefinaria isto representa uma importante vantagem, pois comumente a hemicelulose representa um terço dos carboidratos totais na biomassa lignocelulósica (OLIVEIRA et al., 2014), e podem ser utilizados na obtenção de xilitol (CANILHA et al., 2008; CARVALHO et al., 2005), ácido láctico (YE et al., 2013) e outros produtos.

A hidrólise dos açúcares ocorre devido à quebra das ligações glicosídicas, cujo mecanismo de reação compreende três etapas: primeiro, o ácido interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que liga duas unidades de açúcar, formando o ácido conjugado. Essa etapa é seguida por uma clivagem da ligação C-O, formando um carbocátion cíclico, estabilizado por ressonância. Por último, uma molécula de água é adicionada ao carbocátion, o que resulta em um produto final estável (FENGEL; WEGENER, 1989; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Durante o pré-tratamento com ácido, a degradação da lignina é produzida por reações de substituição e quebra de ligações, geralmente acompanhadas por reações de condensação. As reações de condensação acabam fazendo com que não ocorra a dissolução da lignina e, conseqüentemente, que ela seja eliminada somente em pequenas proporções (FENGEL; WEGENER, 1989; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Como as frações fenólicas de lignina degradada são os principais compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação, uma etapa adicional de extração de lignina do material pré-tratado pode ser requerida (LIN; TANAKA, 2006; MOSIER et al., 2005; HONGZHANG; LIYING, 2007).

Existem vários métodos utilizados para a remoção de lignina das biomassas vegetais, e dentre eles estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação Kraft e polpação organosolv (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Essas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos in natura, os quais apresentam uma estrutura morfológica bem rígida e recalcitrante, necessitando assim de condições de reação mais severas (concentração de álcali no licor > 10% (m/v) e temperatura acima de 150 °C. Por outro lado, quando o material lignocelulósico já foi submetido a um pré-tratamento que torna a lignina mais exposta e fragilizada, a técnica utilizada para remoção da lignina é a extração alcalina, realizada em condições de reação mais amenas (SILVA, 2009).

Cada método de pré-tratamento utiliza diferentes condições e técnicas de degradação (temperatura, pressão, solventes, pH) que irão alterar a estrutura e as ligações da lignina nativa de forma única, influenciando nos tipos de produtos de alto valor que poderão ser obtidos a partir da biomassa (ZAKZESKI et al., 2010).

A extração de lignina dos materiais lignocelulósicos é conduzida sob condições em que a lignina é progressivamente degradada à fragmentos de menor massa molar, resultando em modificações nas suas propriedades físico-químicas. As propriedades e a composição da lignina obtida dependem do método de extração e do material lignocelulósico, de onde ela foi extraída (DOHERTY et al., 2011). Os processos químicos mais importantes para a indústria de papel e celulose são os processos Kraft e sulfito. O processo com soda está se tornando o método predominante para polpação química de resíduos da agroindústria como o bagaço, palha de trigo, e outros. A lignina obtida desse processo não contém enxofre e apresenta um baixo teor de hemicelulose, sendo um bom potencial para obtenção de produtos de maior valor agregado. Significativamente, todas as abordagens sob desenvolvimento para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica são propensas a produzir lignina com pouco ou nenhum enxofre, aumentando o alcance para a fabricação de produtos de valor agregado (DOHERTY et al., 2011).

Na reação com NaOH ocorrem reações com a lignina que se baseiam em dois principais mecanismos: a condensação e a hidrólise (VILLAQUIRÁN, 1987; FENGEL; WENEGER, 1989). A primeira é indesejável porque diminui o poder de remoção da lignina, pois forma uma estrutura rígida difícil de ser solubilizada no licor de polpação. Já através da hidrólise, o NaOH ataca a lignina rompendo essa macromolécula em unidades de baixa massa molar que são solúveis no licor. As reações de lignina no meio alcalino, geralmente têm início na desprotonação de um OH fenólico, dando origem a uma estrutura metileno quinona, por meio da clivagem no carbono alfa (Figura 2) ou a estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama (Figura 3).

Figura 2 – Mecanismo de degradação de lignina em meio alcalino com eliminação no carbono alfa.

Fonte: Adaptado de Fengel e Weneger, 1989.

Figura 3 – Mecanismo de degradação de lignina em meio alcalino com eliminação no carbono gama.

Fonte: Adaptado de Fengel e Weneger, 1989.

2.3.1 Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas (40-45%), é um homopolímero linear constituído de subunidades de glicose associadas por ligações éter do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Duas unidades de anidroglicose adjacentes são ligadas por eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxílicos nos carbonos 1 e 4 formando a celobiose, que é a unidade repetitiva da cadeia polimérica (Figura 4) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 4 – Estrutura cristalina da celulose.

Fonte: Adaptado de U.S. Department of Energy Office of Science, 2012.

O tamanho da cadeia molecular é normalmente especificado como grau de polimerização (DP), ou seja, o número de resíduos de glicose que formam a cadeia, e a sua variação está entre 7.000 e 15.000 para celulose de origem vegetal. Em uma molécula de celulose, as cadeias encontram-se agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989). As ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD;

SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994). O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento. A celulose de algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de cristalinidade ao redor de 40% (ARAUJO et al., 2008).

A produção anual de celulose via biossíntese é de 1,5 trilhões de toneladas, fazendo dela uma fonte ilimitada para a biorrefinaria (KIM et al., 2006).

2.3.2 Hemicelulose

As polioses, também chamadas de hemiceluloses, são carboidratos intimamente associados com a celulose na parede celular. Diferentemente da celulose, apresentam estrutura amorfa, ramificada e composta pela combinação de vários açúcares, as hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose e as pentoses D-xilose e L-arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de grupos acetila, ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. As polioses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas (xiloses ligadas por ligação β -1,4), mananas (manoses ligadas por ligação β -1,4), glucomananas (formado por glicose e manose) e galactanas. A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas, e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar estrutura amorfa, as hemiceluloses são mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradadas que a celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). A hemicelulose é bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa e índice de polimerização variando entre menos de 100 a no máximo 200 (YANG; WYMAN, 2008).

A composição de xilanas de gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles por McDougall et al. (1993). Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas é apresentada na Figura 5. Em termos de composição, as polioses representam de 25 a 35% da massa seca presente no material lignocelulósico. As coníferas apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as folhosas são mais ricas em xilanas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 5 – Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.

Xyl = 1,4-D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico.

Fonte: McDougall et al., 1993.

2.3.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula orgânica importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Em base seca, a composição de lignina em madeira mole e madeira dura variam geralmente de 20% a 40% em massa, e de 10% a 40% em massa em diversas espécies herbáceas, tais como bagaço, casca de arroz e palhas (YAMAN, 2004).

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional, hidrofóbica, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil. Essas unidades de fenilpropano são derivadas dos álcoois hidroxicinâmicos: *p*-cumárico, coniferílico e sinapílico (Figura 6) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 6 – Unidades fenilpropano precursoras da lignina.

Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

Na lignina estas unidades encontram-se ligadas entre si por dois tipos de ligações: ligações éter através do oxigênio do grupo hidroxila do anel fenólico e ligações diretas carbono-carbono (C-C), ditas de condensação. A maior parte das ligações encontradas na lignina é do tipo éter, nomeadamente β -O-4 e α -O-4 (BOERJAN et al., 2003). Em função do mecanismo de biossíntese da lignina, o acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de maneira irregular e não repetitiva. Vários tipos de ligação entre as unidades de fenilpropano são observadas, como: β -O-4 e α -O-4 (50 a 65%), β -5 (6 a 15%), β -1 (9 a 15%), 5-5 (2 a 9%) e β - β (2 a 5%) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; TUOMELA, 2002). Uma representação de uma estrutura sugerida de lignina de palha de trigo pode ser observada na Figura 7. As ligações do tipo éter permitem uma estrutura mais “aberta” à lignina, enquanto as ligações C-C aproximam mais os monômeros entre si, tornando a lignina mais condensada. A maior ou menor condensação da lignina afeta muito a sua reatividade.

Figura 7 – Representação da estrutura de lignina de palha de trigo.

Fonte: Adaptada de Sun et al., 1997.

A formação das macromoléculas de lignina compreende um complicado sistema biológico, bioquímico e químico que tem sido muito estudado e revisado. A lignina é formada pela desidrogenação enzimática das unidades fenilpropano (formação de radicais estabilizados por ressonância) seguida de acoplamento radicalar. A polimerização dos monômeros

fenilpropanóides é iniciada por oxidases ou peroxidases. Embora o mecanismo preciso seja obscuro, postula-se que a combinação radical-radical dos radicais livres produzidos por desidrogenação enzimática seja a principal reação, seja sob controle enzimático (DAVIN et al., 2008) ou sob combinação ao acaso (RALPH et al., 2004). Do ponto de vista morfológico, as moléculas de lignina são forçadas a ocupar o espaço entre os elementos fibrilares dos polissacarídeos pré-formados da parede celular. De um modo geral, a formação da macromolécula de lignina não segue um mecanismo regular, geneticamente ordenado, mas sim um acoplamento randômico, que depende da estabilidade dos radicais formados, formando uma macromolécula não linear (FENGEL; WEGENER, 1989).

Estudos consideráveis têm sido feitos sobre a caracterização estrutural detalhada dessa complexa macromolécula natural (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004). O isolamento de lignina das fibras vegetais é dificultado, principalmente, devido às reações de condensação e oxidação que podem ocorrer durante o processo. Todos os processos de extração de lignina levam a algum grau de modificação estrutural que, por consequência, afeta suas propriedades físicas (PASQUINI et al., 2002). A fonte a partir da qual a lignina é obtida e o método de extração tem uma forte influência sobre as suas propriedades (LORA; GLASSER, 2002). Existe uma grande dificuldade na elucidação química da estrutura da lignina devido ao fato de não haver um método bem estabelecido para isolar a lignina em sua forma nativa (JOHN; THOMAS, 2008), sendo sua estrutura exata desconhecida (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004).

Uma das principais funções da lignina é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânico aos tecidos vegetais (FENGEL; WEGENER, 1989). A massa molar típica de lignina isolada está no intervalo de 800 – 20.000 g/mol, mas o grau de polimerização na natureza é difícil de medir, já que a lignina é invariavelmente fragmentada durante a extração e consiste de vários tipos de sub-estruturas que se repetem aparentemente de maneira casual (DOHERTY et al., 2011). A Tabela 1 apresenta a massa molar e os grupos funcionais determinados em alguns tipos de lignina.

Tabela 1 – Massa molar e grupos funcionais da lignina. Fonte: Doherty et al., 2011.

Tipo de Processo de Obtenção da Lignina	Massa molar (g.mol ⁻¹)	COOH (%)	OH fenólico (%)	Metoxila (%)
Soda (bagaço)	2160	13,6	5,1	10,0
Organosolv (bagaço)	2000	7,7	3,4	15,1
Soda (palha de trigo)	1700	7,2	2,6	16
Organosolv (madeira dura)	800	3,6	3,7	19
Kraft (madeira mole)	3000	4,1	2,6	14

O grau de reticulação possível em lignina, e consequentemente a rigidez da estrutura, é dependente do grau de substituição. Em madeira mole (lignina de coníferas), a estrutura G (guaiacil – derivado do álcool coniferílico) é dominante, enquanto em madeira dura (lignina de folhosas) normalmente contêm uma mistura de S (siringil – derivada do álcool sinapílico) e G, com estruturas S em maioria, enquanto em gramíneas (que incluem a cana-de-açúcar e o café) predominam estruturas H (*p*-hidroxifenil – derivadas do álcool *p*-cumarílico) (WANG et al., 2009) (por volta de 20%), em adição às unidades G e S (HON, 1991).

As ligninas comercialmente disponíveis compreendem duas categorias: (1) as ligninas livres de enxofre, obtidas principalmente a partir de tecnologias de conversão de biomassa com foco na produção de biocombustíveis, processos de polpação organosolv (LEBO et al., 2001; SIXTA, 2006) e processos de polpação soda baseados em recursos alternativos como os resíduos agrícolas (LORA; GLASSER, 2002), e (2) as ligninas contendo enxofre, que essencialmente resultam de processos de polpação Kraft (grande parte da produção de lignina) (DOMTAR LIMITED, 1978) e sulfito. Esta última categoria compreende quase todo o mercado de ligninas disponíveis comercialmente.

A produção de lignina deverá aumentar significativamente com a atual questão das biorrefinarias lignocelulósicas. A conversão da lignina tem um potencial significativo como fonte para a produção sustentada de combustíveis e produtos químicos (BOZELL et al., 2007; WIESENTHAL et al., 2006; PERLACK et al., 2005). Com sua estrutura e propriedades químicas única, uma grande variedade de produtos químicos a granel e finos, particularmente compostos aromáticos, como a vanilina, assim como combustíveis são potencialmente obtidos a partir da lignina (ZAKZESKI et al., 2010). As aplicações de ligninas sem que se realizem modificações específicas do substrato incluem sua adição como aditivo na fabricação de blocos e porcelana, queima para geração de energia, na construção de asfalto para aumentar a resistência à água e a rachaduras, dentre outras (KRUTOV et al., 2014). Aplicações de maior valor agregado exigem ligninas com propriedades adequadas, e incluem sua utilização em compósitos, liberação controlada de formulações, vanilina e outras. A Tabela 2 apresenta algumas das aplicações para agregar maior valor à lignina.

Tabela 2– Possíveis aplicações de lignina de diversas origens na obtenção de produtos de valor agregado.

Produto	Fonte de lignina	Referência
Resina Fenólica	Resíduos industriais (licor negro, lignina kraft, lignosulfonados) e agroindustriais (bagaço e palha de cana)	GLASSER, 1987; VÁSQUEZ et al., 1997; WANGA et al., 2009; TEJADO et al., 2007; MATSUSHITA et al., 2006; PARK et al., 2008; LABAT, 2008; GONÇALVES; BENAR, 2001
Quelante	Licor negro de madeira, lignina kraft e lignosulfonatos	VALLS; HATTON, 2003; GÉRMAN, 2003; KHABAROV et al., 2001
Compósitos	Resíduos industriais (lignina kraft, lignosulfonatos)	THIELEMANS; WOOL, 2004; ALEXY et al., 2004
Emulsificantes	lignosulfonatos	GUNDERSEN et al., 2001; SJOBLÖM et al., 2000
Matriz para fertilizantes	lignosulfonatos	DOCQUIER et al., 2007; MEIER et al., 1993; NIEMI et al., 2005
Matriz para liberação controlada de herbicidas	Resíduos agroindustriais (bagaço de cana), madeira e lignina kraft	COTTERILL et al., 1996; PÉREZ et al., 2010; HERRERA et al., 2009; GARCIA et al., 1996; PEREIRA et al., 2003; FERRAZ et al., 1997; MULDER et al., 2011; LEBO, 1996
Vanilina e aldeídos aromáticos	Resíduos industriais (licor negro, lignina kraft, lignosulfonatos) e resíduos agroindustriais (bagaço e palha de cana)	ARAÚJO et al., 2010; FARGUES et al., 1996b; MATHIAS, 1993; VILLAR et al., 2001, VILLAR et al., 1997; BJORSVIK; MINISCI, 1999; GOGOTOV, 2000; MATHIAS; RODRIGUES, 1995

A utilização da lignina como fonte de energia não requer nenhum tratamento químico especial da matéria prima, sendo ainda hoje o principal campo de seu aproveitamento. Já a utilização para a geração de produtos finos requer modificações químicas na sua estrutura e a principal delas é a oxidação. Vários métodos, como por exemplo, químico (GELLERSTEDT et al., 2004), biológico, fotoquímico (KANEKO et al., 2006), e métodos eletroquímicos (ANTUNES et al., 2004), têm sido explorados para a oxidação de lignina para se obter produtos de valor agregado.

2.4 Compostos Aromáticos

Diversas transformações químicas (por exemplo, hidrogenólise, oxidação e hidrólise) são discutidas em detalhe na literatura para a conversão de lignina em produtos de baixa massa molar (GOHEEN, 1981; AMEN-CHEN et al., 2001). Uma revisão abrangente foi publicada por Zakzeski et al. (2010) com o escopo da conversão química catalítica de lignina e as reações químicas envolvidas nos processos. Entre as reações para a produção de produtos de lignina de baixa massa molar, a conversão de lignina em vanilina, em particular, foi avaliada como sendo altamente viável (HERMANS et al., 2009).

Vanilina, siringaldeído, e *p*-hidroxibenzaldeído, apresentados na Figura 8, podem ser produzidos através da oxidação branda da lignina em meio alcalino. Estes aldeídos têm ampla aplicações, tais como aromatizantes, intermediários químicos para medicamentos e defensivos agrícolas (SRIDHAR et al., 2005; SALES et al., 2006). O siringaldeído, por exemplo, é um valioso material de partida na indústria farmacêutica. Ele é o precursor, assim como a vanilina, do 3,4,5 trimetoxibenzaldeído, que é um componente essencial na síntese do antibacteriano ormetoprim e trimetoprim, com a vantagem de já conter 2 grupos metoxil (MANCHAND et al., 1992).

Figura 8 – Aldeídos aromáticos obtidos do processo de oxidação de lignina.

Fonte: Deng et al., 2010.

Qualquer substância contendo lignina pode ser usada como matéria-prima para obtenção de aldeídos aromáticos (HIGUCHI, 1980; ADACHI, 1992). No entanto, diferentes ligninas, dependendo de suas características biológicas, origem e método de obtenção, possuem um perfil de aroma característico (cheiro). O aroma percebido pelo sistema olfativo é devido à presença de moléculas voláteis ou semi-volátil no espaço superior da amostra (headspace), se estiverem em concentrações acima do limite de percepção sensorial (ROCHA et al., 2011).

Dos compostos que podem ser produzidos por meio de oxidação de lignina, a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) constitui-se como o mais conhecido e mais valorizado (SILVA et al., 2009), no entanto, sua conversão é ainda complexa (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2013). Ela tem uma ampla gama de aplicações, sendo aproximadamente, 60% da vanilina industrial usada na indústria de alimentos, 33% como fragrância na indústria de perfumes e cosméticos, e 7% na indústria química e farmacêutica (PRIEFERT et al., 2001). Na indústria de alimentos, é usada principalmente como aroma de baunilha, na indústria química, como intermediário na síntese de vários produtos como o veratraldeído, o aldeído protocatecuico, e seus respectivos ácidos, na indústria farmacêutica como precursor na fabricação de diversas drogas, sendo o anti-hipertensivo Metildopa o mais comum (BJORSVIK; LIGUORI, 2002; WALTON et al., 2003; ESPOSITO et al., 1997).

Existem dois tipos comerciais de vanilina, a obtida da vagem da orquídea tropical *Vanilla planifolia* por meio de extração alcoólica e envelhecimento da vagem (aroma natural) e vanilina

pura obtida por síntese química a partir de guaiacol ou de lignina (aroma idêntico ao natural) (WANTON et al., 2003; DAUGSCH; PASTORE, 2005; THIBAUT et al., 1998).

Historicamente, a produção de vanilina foi a partir da sua extração direta da vagem da orquídea, no entanto, o processo de extração é lento e de custo elevado (PACHECO et al., 2007), sendo necessários cerca de 500 kg de vagem de baunilha para produzir 1 kg de vanilina. Dessa forma, para satisfazer a cada vez maiores mercados, novas rotas químicas foram desenvolvidas (TRIUMPH CAPITAL DE RISCO, 2004). Descobriu-se que a vanilina poderia ser produzida por meio de produtos a base de lignina, por meio da oxidação alcalina de lignossulfonatos com um rendimento de cerca de 15%. Esse processo tornou-se comercialmente dominante até os anos 1980, sendo responsável por 80% da produção de vanilina, sendo 20% provinda do guaiacol (BJORSVIK; MINISCI, 1999). No entanto, razões ambientais (o processo gerava cerca de 160 kg de líquido caústico por kg de vanilina produzida) e econômicas levaram ao fechamento da maioria das instalações de produção (HOCKING, 1997). Passou-se a produzir vanilina utilizando-se o catecol e o guaiacol, oriundos da indústria petroquímica (PACHECO et al., 2007). Atualmente, a Borregaard é a única empresa que comercializa vanilina produzida a partir de lignina. O processo existe há 49 anos e utiliza lignina de madeira de abeto, produzindo vanilina com um rendimento em torno de 0,75% (BACKA, 2013).

A produção anual mundial de vanilina está estimada em aproximadamente 16.500 toneladas (LOE; HØGMOEN, 2011). Deste montante, cerca de 15.000 toneladas são oriundas de compostos derivados do petróleo (91% da oferta global), cerca de 1.500 toneladas obtida a partir de lignina e 30 toneladas a partir da vagem na baunilha. Vanilina de guaiacol é comercializada a 12 a 25 dólares por kg, dependendo da quantidade. A vanilina de lignina é comercializada como um produto diferenciado, com preços variando de 100 a 200 dólares por kg (BORGES DA SILVA et al., 2009). Vanilina natural é comercializada por 1.200 a 4.000 dólares por kg (WALTON et al., 2003).

O mercado de vanilina é um mercado maduro que continua a crescer. Vanilina produzida por rotas diferentes apresenta perfis de aroma diferentes. Em certas aplicações, particularmente da indústria de perfumes, de fabricantes de chocolate europeus, e no mercado japonês, a vanilina de lignina é preferível em relação à de guaiacol (NEDLAC, 2012). A vanilina de lignina produzida pela Borregaard é descrita como tendo um sabor mais intenso e mais próximo da baunilha (BORGES DA SILVA et al., 2009; HALLIDAY, 2008; LOE; HØGMOEN, 2011).

No caso de gimnospermas (madeira mole), formadas essencialmente por unidades guaiacil, o principal aldeído formado é a vanilina (HIGUCHI, 1980; ADACHI, 1992). As ligninas de angiospermas (madeira dura) devido a sua composição química (siringil e guaiacil) formam vanilina e siringaldeído (SALES et al., 2004; VILLAR et al., 1997). Por outro lado, ligninas de

gramíneas devido a sua composição química mais ampla podem gerar aldeídos aromáticos e ácidos variados, contudo, com um rendimento de vanilina provavelmente menor.

O processo de polpação está baseado principalmente em madeiras duras. A oxidação química da lignina com o oxigênio é uma reação na qual as condições típicas envolvem valores de pH elevados (cerca de 14), temperaturas elevadas (maiores que 150 °C) e pressão total elevada (por exemplo, 10 bar) (FARGUES et al., 1996a; FARGUES et al., 1996b; MATHIAS, 1993; MATHIAS et al., 1995; MATHIAS; RODRIGUES, 1995; VILLAR et al., 1997; TARABANKO et al., 2000; VILLAR et al., 2001; SALES et al., 2004). Sob estas condições é possível clivar esta complexa macromolécula, criando assim um meio favorável para a oxidação de seus fragmentos à vanilina. Em particular, as ligações éter dos carbonos alfa e beta das unidades de fenilpropano são clivadas, havendo também a ruptura de ligações carbono-carbono nas cadeias laterais das unidades fenilpropano (LEBO et al., 2001). Em geral, após a clivagem oxidativa alcalina da lignina, que gera fragmentos que podem levar à obtenção de vanilina, fases bem conhecidas com relação a reatividade da lignina podem ser assumidas (TARABANKO; PETRUKHOV, 2003): (1) a formação de radicais fenoxil (pelo desprendimento de um elétron do ânion fenoxil), (2) a formação de metileno quinona (por desprotonação do radical fenoxil), (3) a formação de álcool coniferílico (por adição nucleofílica de íon hidróxido), (4) provável formação de gamacarbonil (por oxidação do álcool coniferílico), e, finalmente, (5) a formação de vanilina (por clivagem do retro-aldol de aldeídos alfa e beta insaturados). Há poucos trabalhos publicados com os mecanismos de oxidação de lignina, e na maioria dos casos, as abordagens envolvem lignosulfonatos e baseiam-se em diferentes hipóteses (BJORSVIK, 1999; SCHULTZ; TEMPLETON, 1986; TARABANKO et al., 1995; TARABANKO; PETRUKHOV, 2003), e com relação ao mecanismo de oxidação de lignina de gramíneas à vanilina esse número é ainda menor. Por outro lado, mesmo as regularidades mais conhecidas não podem ser explicadas com base em um grande número de hipóteses publicadas sobre o mecanismo de clivagem oxidativa das unidades de fenilpropano de lignina à aldeídos aromáticos (TARABANKO et al., 2004).

A extração e purificação de vanilina a partir do meio reacional têm sido assunto de grande preocupação, levando ao desenvolvimento de várias tecnologias de separação, como extração com solvente, destilação, acidificação e precipitação, uso de membranas, cristalização, extração supercrítica, adsorção e troca iônica (RODRIGUES et al., 2012).

Dos agentes oxidantes têm se estudado o uso de ar, oxigênio, nitrobenzeno, ou óxidos metálicos, com ou sem o auxílio de catalisadores (TARABANKO et al., 1995a; MATHIAS, 1993). O nitrobenzeno ($C_6H_5NO_2$), alguns óxidos de metais e oxigênio, todos em meio alcalino, são oxidantes brandos que preservam o anel aromático na lignina. Eles produzem aldeídos (siringaldeído e vanilina) e ácidos (ácido vanílico e ácido siringílico), e o rendimento depende do

oxidante. Entre eles, o nitrobenzeno gera um maior rendimento em vanilina (ou siringaldeído e vanilina), mas é um químico nocivo, e seus produtos de redução são difíceis de separar do meio reacional (VILLAR et al., 2001).

Villar et al. (2001) em estudo da oxidação de lignina kraft de madeira dura em meio alcalino utilizando como agente oxidante o oxigênio, Cobre (II) e Cobalto (II) como catalisadores para obtenção de compostos fenólicos (siringaldeído, vanilina e seus ácidos) observaram baixo rendimento na conversão da lignina à aldeído (4%), e verificaram também que a variável mais importante na reação estudada foi a concentração de alcali, que deveria ser fixada em torno de 2 mol.L⁻¹. Salomon (1979) estudou o efeito da temperatura (120 a 200 °C), concentração de NaOH (2 a 4 mol.L⁻¹) e pressão de oxigênio (8 a 13 atm) sobre a oxidação de lignina Kraft de madeira dura precipitada com ácido sulfúrico e obteve baixo rendimento de aldeídos (2% de siringaldeído e 1% de vanilina) mesmo nas condições mais favoráveis (160 a 200 °C, 8 atm e NaOH 2 a 3 mol.L⁻¹).

Cobos et al. (1990) estudaram a obtenção de vanilina a partir de lignina de bagaço de cana-de-açúcar obtida por meio de hidrólise alcalina com NaOH 6% a 170 °C por 1 h a 100 psi (6,9 bar) e sob agitação. As condições de oxidação alcalina com hidróxido de cálcio 20%, 170 °C, 107 psi (7,4 bar) por 1 h, sob agitação, levaram a um rendimento de vanilina de 1,5%. Neste estudo não foram determinadas as concentrações dos demais produtos de degradação obtidos. Sales et al. (2007) avaliaram a obtenção de vanilina a partir de oxidação úmida catalítica de lignina de bagaço de cana, e obtiveram um rendimento de vanilina de 1,87% e 1,67% de siringaldeído.

Fargues et al. (1996), estudaram a produção de vanilina a partir da oxidação úmida de lignina kraft de gimnosperma *Pinus spp.* (madeira mole). O rendimento máximo de vanilina foi de 10%, em uma temperatura de 130 °C, pressão parcial de oxigênio de 3 bar, e concentração de lignina de 60 g/L em meio alcalino de NaOH 2 mol.L⁻¹. Mathias e Rodrigues (1995), a partir de lignina Kraft, reportaram um rendimento máximo de vanilina de 13% (m/m) utilizando nitrobenzeno como agente oxidante (0,84 mL por g de lignina), NaOH 2 mol.L⁻¹, a 147 °C por 7 h. Villar et al. (1997), utilizando-se uma lignina precipitada do licor negro de processo kraft, com a adição de um sal de cálcio dissolvido em um álcool solúvel em água, publicaram um rendimento máximo de aldeídos fenólicos totais (siringaldeído + vanilina) de 14%, também com base na oxidação com nitrobenzeno (40 min de reação, 190 °C, NaOH 2 mol.L⁻¹ e 6 mL de nitrobenzeno por g de lignina).

Gonçalves e Schuchardt (1999) avaliaram a oxidação de lignina organosolv em meio ácido utilizando Co/Mn/Br como catalisador, a 210 °C e obtiveram um rendimento de vanilina de 1,9% (m/m) e de 3,0% (m/m) de ácido vanílico.

2.5 Oxidação de lignina

A decomposição e fragmentação da lignina em químicos, pode ser dividida principalmente em reações de hidrólise, de redução e de oxidação. Contrariamente às reações de hidrólise e redução, que rompem a estrutura e removem as funcionalidades químicas de lignina produzindo fenóis simples (KLEINERT; BARTH, 2008), as reações de oxidação tendem a formar compostos aromáticos mais complexos, com funcionalidades (COLLINSON; THIELEMANS, 2010).

A lignina pode ser oxidada por meio de reações em meio ácido, meio alcalino (GONÇALVES et al., 1995) ou reações utilizando enzimas. A oxidação de lignina em compostos aromáticos de menor massa molar utilizando O₂ em meio alcalino têm sido o objeto de muitas publicações nas últimas décadas (PINTO et al., 2011; MATHIAS, 1993; BJØRSVIK; LIGUORI, 2002; SALES et al., 2006; VILLAR et al., 2001; MATHIAS; RODRIGUES, 1995; FARGUES et al., 1996; ARAÚJO et al., 2010). Alguns pesquisadores avaliaram a produção em meio ácido (VOILL; ROHR, 2010; LABAT; GONÇALVES, 2008; PARTENHEIMER, 2009), em líquidos iônicos (ZAKZESKI et al., 2010; STARK et al., 2010) e por rotas biotecnológicas (MATHIAS et al., 1995; PRIEFERT et al., 2001; SCHRADER et al., 2004).

Na natureza, a oxidação seletiva da lignina é realizada por basidiomicetos de podridão branca, fungos que produzem um conjunto de enzimas ligninolíticas extracelulares, como lacases e peroxidases (AUGUSTINE et al., 2008). Lacases (EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases que fazem parte de um grupo de enzimas denominadas multicobre e são pertencentes à classe das oxidoredutases (BRENDA, 2012). As fenol oxidases são proteínas contendo cobre, com uma característica comum de serem capazes de oxidar compostos aromáticos, tendo como acceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular (MAYER, 1987). O mecanismo geral de atuação das lacases é a oxidação do substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico gerando um radical fenoxila (HIGUCHI, 1990).

Consideráveis aplicações de lacase consistem em processos de branqueamento por meio da remoção da lignina em indústrias de polpa e celulose, assim como na indústria têxtil (JODAAN et al., 2004). Outras aplicações para lacases estão sendo estudadas, buscando por meio da modificação estrutural da lignina aumentar sua funcionalidade. Crestini et al. (2010) estudaram a oxidação de lignina utilizando lacase buscando uma funcionalização da lignina oxidada e observaram que na presença desta enzima houve uma intensa oxidação da cadeia lateral alquila.

Na indústria de polpa e papel por exemplo, a oxidação química é um método de despolimerização, realizado durante a deslignificação e branqueamento da celulose, bastante utilizado. Diferentes tipos de oxidantes tais como oxigênio e peróxido de hidrogênio podem ser utilizados (KADLA et al., 1999). Nos processos de oxidação, os grupos fenólicos, especialmente os

aromáticos, são transformados em aldeídos e carbonilas aromáticas, incluindo a conversão em quinonas e a destruição do anel aromático em grupos carboxílicos em condições mais severas (FENGEL; WEGENER, 1983). Alguns metais nobres têm sido utilizados como catalisadores no processo de oxidação de lignina (SALES et al., 2009; MATHIAS; RODRIGUES, 1995), mas são caros, o que é um impedimento para suas aplicações comerciais.

Conforme mencionado, a oxidação de lignina em meio alcalino é bastante explorada. Um dos agentes oxidantes que pode ser utilizado é o peróxido de hidrogênio. A decomposição de H_2O_2 forma oxigênio molecular e outros radicais que podem reagir com a lignina de diversas formas, tornando o mecanismo total de reação extremamente complexo (XIANG; LEE, 2000). Acredita-se que a decomposição do peróxido de hidrogênio em produtos tais como os radicais hidroxilas e radicais ânion superóxido (O_2^-) são responsáveis por causar a oxidação de estruturas de lignina que conduz à introdução de grupos hidrofílicos (carboxila), à clivagem de algumas ligações entre as unidades e, eventualmente, à dissolução da lignina (DENCE, 1996). A decomposição do H_2O_2 aumenta com o aumento da temperatura e do pH (REICHERT et al., 1944). Se as condições do processo de oxidação forem severas, o agente oxidante, aquecido sob condições alcalinas reage com a lignina e promove a abertura dos anéis fenólicos.

A oxidação úmida têm sido bastante estudada para se converter lignina em compostos aromáticos de baixa massa molar, geralmente em meio alcalino, na presença ou ausência de catalisadores (ZHANG et al., 2009; SALES et al., 2006; SALES et al., 2007; SALES et al., 2004; ARAÚJO et al., 2010). Neste processo, a biomassa em solução aquosa é oxidada por O_2 sob alta temperatura (cerca de 150 - 350 °C) e pressão (cerca de 6 -17 MPa) (MISHRA et al., 1995). Nestas condições, a água possui excelentes propriedades como meio de reação, o que faz este tratamento ser bastante eficaz (KINDSIGO et al., 2009).

Em relação a estudos envolvendo a oxidação de lignina em meio ácido, poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura, evidenciando que este assunto necessita de estudos mais aprofundados para uma melhor investigação e até uma possível comparação com a oxidação em meio alcalino. Oxidações em meio ácido já foram realizadas utilizando ligninas de bagaço de cana em ácido acético com sais de cobalto e manganês e também ácido bromídrico como catalisadores, na presença de anidrido acético utilizando O_2 como oxidante (GONÇALVES; BENAR, 2001); na produção de vanilina e ácido vanílico, utilizando ligninas obtidas a partir da polpação organosolv de madeira de eucalipto, de bagaço de cana-de-açúcar e uma mistura de madeiras mole utilizando HBr, Co(II) e Mn(II) como catalisador, sob pressão de oxigênio entre 0,5 e 1,5 MPa, mostrando que esta influencia nas condições termodinâmicas e cinéticas da reação de oxidação (GONÇALVES; SCHUCHARDT, 1999) e também sob pressão de 0,1 a 1,5 MPa e acetato de cobalto como catalisador, monitorando os produtos obtidos por cromatografia (GONÇALVES et

al., 1997). Partenheimer (2009), avaliou a oxidação de ligninas de madeira e de bagaço de cana, em meio ácido utilizando Co/Mn/Zr/Br como catalisador e verificou que, a 180 °C por 2 h, cerca de 10,9% (m/m) de lignina foi convertida em compostos aromáticos, tais como vanilina, siringaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído.

2.5.1 Reações de oxidações a partir de compostos modelo de lignina

Devido à complexidade da lignina, a maioria dos estudos sobre sua oxidação foram realizados a partir de compostos modelo. Cada vez mais, estudos estão sendo conduzidos em amostras reais de lignina, como lignina Kraft ou ligninas extraídas a partir da biomassa (CRESTINI et al., 2010; SANTOS et al., 2012). No entanto, esta abordagem para obtenção de produtos químicos a partir de lignina é um desafio, dada a grande complexidade da lignina frente aos compostos modelo previamente estudados, que são muito mais simples. Isso exige também uma nova mentalidade, considerando que durante muito tempo o objetivo das indústrias e pesquisadores foi destruir a lignina por oxidação (processo de deslignificação) (GASPAR et al., 2007; ARGYROPOULOS, 2001), agora a lignina deve ser preservada quando separada da biomassa, de modo que possa ser convertida em compostos químicos de utilidade (CHATEL; ROGERS, 2014).

A ligação mais abundante na lignina é a ligação do tipo β -O-4, sendo esta ligação éter mais facilmente clivada. A clivagem destas ligações durante a polpação alcalina constitui a principal via na qual a lignina é despolimerizada. A fragmentação destas ligações tende a conduzir à geração de compostos solúveis em água contendo grupos com hidroxilas fenólicas (CHAKAR; RAGASKAS, 2004).

As reações mais importantes de compostos modelo contendo uma ligação β -O-4 envolvem rompimento dessa ligação de modo a formar blocos de compostos mais simples que se assemelham ao álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Reações subsequentes envolvem a oxidação do álcool coniferílico para formar vanilina (Figura 9) ou oxidação do anel aromático formando quinonas (ZAKZESKI et al., 2010).

Figura 9 – Reação de oxidação de um composto modelo de lignina contendo ligação do tipo β -O-4 à vanilina.

Fonte: Adaptado de Zakzeski et al., 2010.

As ligações carbono-carbono na lignina constituem algumas das ligações mais difíceis de se romper, e muitas dessas ligações tendem a resistir ao processo de polpação. Embora as ligações C-C estejam presentes na lignina nativa, ligações adicionais podem ser formadas durante o pré-tratamento, como por exemplo reação de condensação promovida por álcali (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004). Compostos modelo com estas ligações geralmente envolvem arenos diméricos com diferentes substituintes metoxi e hidroxil no areno, assemelhando-se à dímeros de álcoois *p*-cumarílico ou coniferílico. Exemplos de reações típicas incluem quebra das ligações C-C para produzir compostos monoméricos. A oxidação de compostos contendo ligação 5-5 pode também dar origem a produtos com ligações éter adicionais à ligação 5-5, bem como a clivagem oxidativa do anel areno para formar ácidos policarboxílicos. Transformações envolvendo compostos com ligações α -1 ou β -1 envolvem principalmente reações do grupo R no areno ou oxidação do grupo hidroxila em um dos arenos para formar quinonas (Figura 10) (ZAKZESKI et al., 2010).

Figura 10 – Exemplo de um composto modelo contendo ligação 5-5 e possíveis compostos obtidos por oxidação.

Fonte: Adaptado de Zakzeski et al., 2010.

A ligação β -5 é frequentemente encontrada em um anel de cinco membros ligando duas estruturas aromáticas, tanto por uma ligação C-C como uma ligação C-O. A formação de

compostos monoméricos, tais como vanilina ou ácido vanílico, a partir de compostos modelo com estas ligações requer ruptura de ambas as cadeias (Figura 11) (ZAKZESKI et al., 2010).

Figura 11 – Reação de oxidação de um composto modelo de lignina contendo ligação do tipo β -5 à vanilina.

Fonte: Adaptado de Zakzeski et al., 2010.

A reação mais proeminente dos compostos α -O-4 e 4-O-5 envolve a ruptura da ligação éter para formar fenol (substituído). Produtos adicionais formados por ruptura desta ligação são o benzeno para compostos contendo ligação 4-O-5, ou tolueno para compostos contendo ligação α -O-4. No que diz respeito às reações de oxidação, foram observados vários benzaldeídos após a ruptura da ligação α -O-4, seguido da oxidação do álcool resultante (Figura 12) (ZAKZESKI et al., 2010).

Figura 12 – Reações de compostos modelo contendo ligações α -O-4 ou 4-O-5 à fenol e outros compostos.

Fonte: Adaptado de Zakzeski et al., 2010.

Observando os produtos apresentados decorrentes de reações envolvendo as várias ligações existentes no polímero de lignina observa-se que eles se assemelham aos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, a partir dos quais a macromolécula de lignina é formada. A conversão catalítica de fragmentos ou compostos modelos do álcool cumarílico, por reações de oxidação, a mais proeminente envolve a oxidação do grupo R, geralmente de um grupo alquil, em 4-hidroxibenzaldeído (FABBRI et al., 2008). Posterior oxidação deste aldeído leva a formação do ácido correspondente (BORREGAARD INGREDIENTS, 2009). Assim como acontece com o álcool *p*-cumarílico, a oxidação do para-substituinte R forma diversos compostos aromáticos, incluindo a vanilina que é altamente valorizada. Reações de oxidação do álcool coniferílico podem formar aldeídos, quinona, ácidos e produtos resultantes da quebra oxidativa do anel para formar ácidos carboxílicos não aromáticos. Reações típicas do álcool sinapílico envolvem a oxidação do grupo R para formar aldeídos e ácidos (ZAKZESKI et al., 2010).

Em conjunto, as reações indicam que a clivagem das ligações primárias da lignina formam compostos aromáticos monoméricos, que muitas vezes são funcionalizados com substituinte ácido, álcool, aldeído ou éter. Estes compostos monoméricos são então susceptíveis a uma ampla variedade de transformações redutivas, formando hidrocarbonetos simples, ou oxidativas, formando compostos aromáticos com maior especificidade ou funcionalidade. A via oxidativa requer o desenvolvimento de catalisadores que quebrem seletivamente as ligações da lignina para formar álcoois aromáticos específicos, aldeídos, ácidos e outros compostos aromáticos funcionalizados que são difíceis de se produzir (ZAKZESKI et al., 2010).

Produtos químicos de alto valor, tais como álcoois e aldeídos *p*-substituídos, são úteis para a produção de plásticos e outros polímeros, pigmentos, corantes, resinas e muitos outros produtos (BOZELL et al., 2007). Como mencionado, uma vasta disposição de produtos é potencialmente obtenível por valorização da lignina, e um esforço considerável tem sido realizado para desenvolver processos que ataquem ligações específicas na lignina para produzir produtos químicos valiosos de interesse (ZAKZESKI et al., 2010).

2.6 Matrizes para liberação controlada de herbicidas

Dentre os diversos potenciais de aplicações de lignina, a formulação de matrizes para liberação controlada de herbicidas é uma delas. O uso de agrotóxicos para proteção de culturas apresenta um aumento progressivo, proporcional à produção agrícola. Esse aumento tem levado a uma utilização intensiva de agrotóxicos, que consequentemente impacta em problemas associados a essa prática. A aplicação e liberação convencional desses herbicidas estão relacionadas a problemas de perda de princípio ativo, de até 30% logo após aplicação, devido a

processos de evaporação, escoamento superficial e percolação para águas subterrâneas (FLORESCÉSPEDES et al., 2007). Para compensar tais perdas é necessária uma aplicação em quantidades excessivas desses herbicidas, que impacta em perdas econômicas e prejudicam a saúde humana e o meio ambiente (HERRERA et al., 2009). A liberação controlada desses herbicidas apresenta-se como uma potencial solução para esses problemas.

Diversos tipos de materiais sintéticos e naturais podem ser utilizados como matriz em formulações de liberação controlada. O uso de materiais oriundos de fontes renováveis ou biodegradáveis apresenta-se como promissor para esta finalidade, principalmente pelas vantagens de manutenção do meio ambiente e apelo à sustentabilidade (WILKINS, 1990).

A lignina é um desses produtos que podem apresentar aplicabilidade como matriz em formulações de liberação controlada (COTTERILL et al., 1996). Além de ser obtida a partir de fontes renováveis apresenta a vantagem de baixo custo, já que é, atualmente, um subproduto do processamento de biomassa vegetal, e também é biodegradável, contribuindo para a fertilização do solo onde foi aplicada.

Diferentes formas de extração da lignina podem conferir características físico-químicas distintas (COTTERILL et al., 1996), proporcionando um aumento na variedade de herbicidas que podem ser submetidos à reação com esta matriz de liberação controlada. Além disso, modificações químicas posteriores à extração podem resultar em produtos com características específicas. As ligninas oxidadas têm propriedades que são semelhantes aos lignosulfonatos, e possui diferentes aplicações industriais (FREDHEIM et al., 2002; GROOTE et al., 1985). A utilização da lignina oxidada pode ser vantajosa, em comparação com lignosulfonatos já que não proporciona impactos ambientais, uma vez que não contém enxofre em sua composição (GONÇALVES; BENAR, 2001).

Coterril et al. (1996) avaliaram o efeito da liberação do herbicida diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) utilizando matrizes compostas por 6 tipos de ligninas, de bagaço de cana e de madeira. Os autores perceberam que o tipo de lignina utilizada, a proporção entre o herbicida e a lignina, e o tamanho do grânulo podem ser prontamente alterados para atingir uma liberação alvo. Mudanças na proporção do diuron entre 40 - 50% tiveram um menor efeito quando comparado com variação da taxa de liberação quando o tamanho do grânulo ou o tipo de lignina foi alterado.

Fernández-Pérez et al. (2010) avaliaram a utilização de lignina Kraft na formulação de matrizes de liberação controlada dos herbicidas cloridazon (5-amino-4-cloro-2-fenilpiridazin-3(2H)-ona) e metribuzin (4-amino-6-tert-butil-3-metiltio-1,2,4-triazina-5-(4H)ona), e observaram que o uso das matrizes reduziu a taxa de liberação dos dois herbicidas quando comparados à

liberação do produto sem a matriz. Os autores também verificaram que a taxa de liberação pode ser controlada em função do tamanho do grânulo.

Ferraz et al. (1997), também observaram que o tipo de lignina influenciou na taxa de liberação do herbicida 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético). Foram avaliados 6 tipos de ligninas provenientes de bagaço de cana e de madeira, e a taxa de liberação variou de 15 a 40 dias.

A ametrina (2-metiltio-4-etilamino-6-isopropilamino) (Figura 13) é um herbicida solúvel em água, pertencente a classe das s-triazinas, umas das classes mais utilizadas e estudadas no mundo, provavelmente devido ao excelente desempenho dos efeitos seletivos sobre as plantas daninhas (MANDELBAUM et al., 2008).

Este herbicida é utilizado em mais de 45 países, sendo o Brasil o maior consumidor, seguido por Tailândia, México, Chile e Cuba (HERI, 2008). Ele age inibindo a fotossíntese e bloqueando a cadeia transportadora de elétrons (PRADE et al., 1998). Em humanos, a exposição prolongada a ametrina pode causar intoxicação e dermatite de contato.

Figura 13 – Estrutura química do herbicida ametrina.

Fonte: Zun et al., 2006.

Neste contexto, o estudo da aplicabilidade das ligninas oxidadas, residuais do processo de obtenção de compostos aromáticos de baixa massa molar, para se obter matrizes para liberação controlada de herbicidas torna-se bastante interessante, uma vez que o valor agregado ao produto seria aumentado e a carga residual do processo seria reduzida.

3 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de reações de oxidação em ligninas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar, e de casca de café, na obtenção de compostos aromáticos de baixa massa molar, em especial a vanilina, buscando alternativas para agregar valor à lignina proveniente de resíduos agroindustriais e contribuir com a viabilização de biorrefinarias.

Para isso, alguns objetivos específicos foram traçados:

- Extrair a lignina das biomassas lignocelulósicas por meio de pré-tratamento com ácido diluído seguido de tratamento alcalino.
- Caracterizar as biomassas em cada etapa deste processo, bem como as ligninas obtidas.
- Oxidar as ligninas utilizando diferentes agentes oxidantes e condições físico-químicas de processo: oxidação enzimática com lacase, oxidação em meio ácido com H_2O_2 , oxidação em meio alcalino com H_2O_2 e oxidação úmida em meio aquoso e alcalino utilizando H_2O_2 .
- Identificar e comparar os compostos de baixa massa molar formados nas reações de oxidação das ligninas.
- Verificar o potencial em se utilizar a lignina oxidada residual na formulação de matrizes para liberação controlada de herbicida, aproveitando dessa forma integralmente as frações obtidas no processo oxidativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos seguiram o esquema apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Representação esquemática do procedimento experimental.

Análises realizadas:

- Materiais lignocelulósicos (itens 4.5.1 e 4.5.3)
- Lignina (itens 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4 e 4.5.5) e lignina oxidada (itens 4.5.3 e 4.5.4)
- Compostos de baixa massa molar (CLAE - item 4.3)
- Matriz de liberação controlada (UV - item 4.4)

Fonte: Arquivo pessoal.

4.1 Processo para obtenção das ligninas a partir do bagaço de cana, da palha de cana e da casca de café

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi proveniente da safra de 2011 e foi fornecido pela Usina de Açúcar e Alcool Costa Pinto (Grupo Cosan), localizada na região de Piracicaba – SP. A palha de cana-de-açúcar foi doada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado na região de Piracicaba – SP, sendo retirada do canavial logo após a colheita, em abril de 2012. Nesta mesma época a Fazenda Top Coffee, localizada na região de Pindamonhangaba – SP, gentilmente nos forneceu as cascas de café cereja, geradas por processamento via úmida. As 3 biomassas foram lavadas e secas a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) até uma umidade em torno de 10%. Após a secagem, o bagaço e a palha foram moídos (menor que 1 mm) em um moinho do tipo martelo.

Foi realizada a amostragem de cada biomassa para posterior caracterização (itens 4.5.1 e 4.5.2).

4.1.1 Hidrólise com ácido diluído

A casca de café, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram pré-tratados com H_2SO_4 1% (v/v), a uma relação sólido-líquido de 1:10 (m/v), a 120 °C por 10 min, em um reator de aço-inoxidável de 45 L de capacidade e munido de agitação orbital (100 rpm), pertencente ao Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP. O tempo de reação não considerou o período necessário para aquecimento e posterior resfriamento do reator. Ao final da reação, o material pré-tratado (celulignina) foi separado do hidrolisado hemicelulósico por filtração, lavado com água até pH neutro e seco a temperatura ambiente até umidade em torno de 10%, e uma amostra retirada para posterior caracterização (itens 4.5.1 e 4.5.2). Considerando-se a capacidade do reator e as condições estabelecidas, essa reação foi repetida por 8 vezes até que possibilitasse a obtenção de lignina suficiente para o desenvolvimento desse trabalho.

4.1.2 Extração alcalina

A extração alcalina das biomassas pré-tratadas foi realizada no mesmo reator utilizado na hidrólise ácida, utilizando NaOH 2,5% (m/v), a uma relação sólido-líquido de 1:10 (m/v), a 120 °C por 10 min. Ao final da reação, o material deslignificado (celulose) foi separado da fração solúvel (licor negro rico em lignina) por filtração. A fração celulósica foi lavada com água até pH próximo

a neutralidade, seca a temperatura ambiente até umidade em torno de 10%, e uma amostra retirada para posterior caracterização (itens 4.5.1 e 4.5.2). O licor negro obtido foi utilizado para a obtenção da lignina. Considerando-se a capacidade do reator e as condições estabelecidas, essa reação foi repetida 4 vezes até que possibilitasse a obtenção de lignina suficiente para o desenvolvimento desse trabalho.

4.1.3 Obtenção das ligninas

Após a extração alcalina, a lignina presente no licor negro foi precipitada utilizando H_2SO_4 até pH 2, lavada com água para remoção da maior parte das polioses e possíveis ácidos presentes até pH próximo da neutralidade, filtrada e seca a temperatura ambiente. A lignina proveniente do processo com soda e precipitada com ácido é geralmente insolúvel em água (NORGREN et al., 2002).

As ligninas obtidas foram maceradas à pó, e denominadas de acordo com a biomassa utilizada como: lignina de bagaço de cana, lignina de palha de cana e lignina de casca de café. Foi realizada a amostragem do material para realização das análises físico-químicas (itens 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4 e 4.5.5). Posteriormente, essas ligninas foram utilizadas nas reações de oxidação (item 4.2).

4.1.4 Determinação do rendimento total

O rendimento das polpas obtidas em cada etapa foi determinado pela razão entre a massa após o término da etapa em questão com a massa antes da etapa, conforme apresentado na equação 1:

$$R(\%) = \left(\frac{m}{M} \right) * 100 \quad (1)$$

onde: $R(\%)$ = rendimento da reação em porcentagem;

m = massa de polpa da etapa em questão (g);

M = massa de polpa da etapa anterior (g);

4.1.5 Determinação da perda de componentes

A perda de cada componente em cada uma das etapas de obtenção de lignina foi baseada na determinação da composição química das polpas (item 4.5.1), conforme apresentado na equação 2 (COSTA, 2005):

$$Pc(\%) = \left(\frac{mci - mcf}{mci} \right) * 100 \quad (2)$$

onde: P_c = perda do componente

m_{ci} = % do componente inicial * massa inicial de polpa

m_{cf} = % do componente final * massa final da polpa

4.1.6 Determinação do rendimento total de lignina

O rendimento da lignina obtida para cada biomassa foi determinado em função do percentual de lignina presente na biomassa in natura determinado pela caracterização química (item 4.5.1), conforme apresentado na equação 3:

$$R(\%) = \left(\frac{m}{M} \right) * 100 \quad (3)$$

onde: $R(\%)$ = rendimento de lignina em porcentagem;

m = massa de lignina macerada (g);

M = massa de biomassa in natura (g) * taxa percentual de lignina na biomassa in natura;

4.2 Reações de oxidação

As ligninas de bagaço, de palha de cana e da casca de café obtidas foram submetidas a oxidação enzimática utilizando lacase, oxidação química em meio ácido e em meio alcalino utilizando H_2O_2 , e oxidação úmida em meio aquoso e alcalino utilizando H_2O_2 .

Por se tratar de ligninas ainda pouco estudadas na obtenção de aldeídos aromáticos, optou-se por utilizar condições previamente estabelecidas por nosso grupo de pesquisa, ainda que com ligninas de outras biomassas ou ainda que para outras finalidades (CALABRIA; GONÇALVES, 2004; MAZIERO; GONÇALVES, 2009; GONÇALVES; LABAT, 2004).

4.2.1 Oxidação Enzimática

As oxidações foram realizadas em um balão de uma boca e fundo redondo de 500 mL, munido de um borbulhador de oxigênio e mantido sobre uma placa de agitação magnética, conforme Figura 15. Foram colocados no balão 2 g de lignina juntamente com 200 mL de solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 7,6) e 1,4-dioxano, numa relação de 3:1 (v/v), 2 gotas de glicerol e testadas enzima com atividades de 10, 100 ou 200 UI. Foi utilizada uma enzima comercial obtida a partir de fungos, denominada NOVOZYM 51003 – enzima pertencente à subclasse lacase, e sua atividade determinada conforme descrito no item 4.2.1.1. A reação foi realizada sob temperatura

ambiente (28 ± 2 °C), com agitação magnética moderada e um fluxo de oxigênio de 75 mL/min, durante 5 h (CALABRIA; GONÇALVES, 2004). A reação foi interrompida adicionando-se 5 mL de HCl 37%, e em seguida filtrada. A fração líquida foi utilizada para determinação dos compostos aromáticos obtidos por CLAE (item 4.3), enquanto a fase sólida foi lavada até pH neutro, seca a temperatura ambiente, e utilizada para a determinação do coeficiente de extinção e análise de FTIR.

Para se acompanhar a evolução da oxidação, alíquotas de 0,02 mL foram retiradas a cada 15 min durante a primeira hora de reação, e a cada 30 min nas horas restantes, diluídas em 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,6) e 1,4-dioxano, 3:1 (v/v) e, analisadas em espectrofotômetro na região do UV-visível a 280 nm.

Os experimentos foram realizados em duplicata, e realizados Teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o software Minitab 17 para análise dos resultados de concentração de vanilina obtidos no tempo final ($p < 0,05$).

Figura 15 – Esquema utilizado para realizar a oxidação enzimática.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.1.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade de lacase foi determinada utilizando como substrato 0,1 mL de uma solução de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] em concentração de 1 mM (BOURBONNAIS et al., 1998). A reação foi conduzida em 0,65 mL de tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 5,0), 0,1 mL de ABTS e 0,25 mL de extrato enzimático. A reação foi monitorada entre 10 s e 5 min pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar do ABTS ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de produto formado por minuto (UI).

4.2.2 Oxidação com peróxido de hidrogênio em meio ácido

As oxidações foram realizadas em um balão de 500 mL de três bocas e fundo redondo, munido de condensador de refluxo e agitador mecânico. Adicionou-se 10 g de lignina, 1,0 mL de HCl 2 ou 0,2 mol.L⁻¹ e 100 mL de água destilada, e quando foi atingido 98 °C, adicionou-se cuidadosamente 50 mL de H₂O₂ 9,1% (m/v) ou 6,1% (m/v), e a reação foi mantida a 98 °C por 2 h, conforme metodologia adaptada de Gonçalves e Labat, 2004. Ao término da reação, o meio foi filtrado, e a fração líquida utilizada para determinação dos compostos aromáticos obtidos por CLAE (item 4.3), enquanto a fase sólida foi lavada até pH neutro, seca a temperatura ambiente, e utilizada para a determinação do coeficiente de extinção e análise de FTIR.

Foi avaliado o efeito da concentração de HCl e do agente oxidante H₂O₂ na obtenção dos compostos aromáticos, realizando-se para cada biomassa os seguintes experimentos: H₂O₂ 9,1% (m/v) e HCl 2 mol.L⁻¹, H₂O₂ 6,1% (m/v) e HCl 2 mol.L⁻¹, e H₂O₂ 9,1% (m/v) e HCl 0,2 mol.L⁻¹. A utilização de H₂O₂ 9,1% (m/v) correspondeu a 20,1% O₂/g biomassa, e H₂O₂ 6,1% (m/v) correspondeu a 13,5% O₂/g biomassa.

Para se acompanhar a evolução da oxidação, alíquotas de 0,02 mL foram retiradas a cada 30 min, diluídas em 4 mL de água destilada e, analisadas em espectrofotômetro na região do UV a 280 nm.

Os experimentos foram realizados em duplicata, e realizados Teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o software Minitab 17 para análise dos resultados de concentração de vanilina obtidos no tempo final (p<0,05).

4.2.3 Oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino

As oxidações foram realizadas em um balão de 500 mL de três bocas e fundo redondo, munido de condensador de refluxo e agitador mecânico, conforme Figura 16. Foram adicionados 10 g de lignina juntamente com 100 mL de NaOH 10 ou 1% (m/v) e quando foi atingido 98 °C, adicionou-se cuidadosamente 50 mL de H₂O₂ 9,1% (m/v) ou 6,1% (m/v). Após a adição, a reação foi mantida a 98 °C por 1,5 h (MAZIERO; GONÇALVES, 2009). Ao término da reação, foi adicionado 25 mL de HCl 37% para precipitar a lignina e o meio foi filtrado, sendo a fração líquida utilizada para determinação dos compostos aromáticos obtidos por CLAE (item 4.4), enquanto a fase sólida foi lavada até pH neutro, seca, e utilizada para a determinação do coeficiente de extinção e análise de FTIR.

Foi avaliado o efeito da concentração de NaOH e do agente oxidante H₂O₂ na obtenção dos compostos aromáticos, realizando-se para cada biomassa os seguintes experimentos: H₂O₂

9,1% (m/v) e NaOH 10%, H_2O_2 6,1% (m/v) e NaOH 10%, e H_2O_2 9,1% (m/v) e NaOH 1%. A utilização de H_2O_2 9,1% (m/v) correspondeu a 20,1% O_2/g biomassa, e H_2O_2 6,1% (m/v) correspondeu a 13,5% O_2/g biomassa.

Para se acompanhar a evolução da oxidação, alíquotas de 0,02 mL foram retiradas a cada 30 min, diluídas em 4 mL de água destilada e, analisadas em espectrofotômetro na região do UV-visível a 280 nm. Para avaliar a obtenção de compostos aromáticos por CLAE (item 4.3), amostras de 5 mL foram retiradas a cada 30 min.

Figura 16 – Esquema utilizado para realizar a oxidação química.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os experimentos foram realizados em duplicata, e realizados Teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o software Minitab 17 para análise dos resultados de concentração de vanilina ($p < 0,05$).

4.2.4 Oxidação úmida com peróxido de hidrogênio

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela Dra. Birgitte Ahring, diretora do Laboratório de Bioprodutos, Ciências e Engenharia (BSEL – Bioproducts, Sciences and Engineering Laboratory) na Universidade do Estado de Washington (WSU – Washington State University), nos EUA, onde esses experimentos foram realizados.

As reações de oxidação úmida (Wet Oxidation – WO) foram realizadas em tubos de aço inox imersos em banho de areia (Fluidized Bath SBL-2D – TECHNE), conforme Figura 17. Foram testadas 3 condições de oxidação variando-se o meio reacional: aquoso, NaOH 11,6% (1 g NaOH/g de biomassa) e NaOH 17,4% (1,5 g NaOH/g de biomassa). Para isso, utilizou-se H_2O_2 1,9% (m/v) (7,5% O_2), e foi mantida uma porcentagem de sólidos de 10% e um espaço livre de 50% por questões de segurança, pois os tubos de reação utilizados não contam com sistema de controle de pressão. Avaliou-se a utilização de temperaturas de reação mais elevadas (150, 180, 210, 230 e

250 °C), porém, por curtos períodos de tempo (5 e 15 min), na conversão de compostos aromáticos de baixa massa molar.

Ao final da reação, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. O conteúdo reacional do tubo foi removido com o auxílio de 10,0 mL de água destilada, filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,45 µm (Milipore) e analisado em CLAE para determinação de aldeídos aromáticos (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído).

Figura 17– Tubos de aço-inoxidável e banho de areia utilizados na oxidação úmida.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para determinação dos compostos aromáticos de interesse por CLAE, foi utilizada uma coluna de troca iônica (Aminex 87H - BioRad) e um detector de UV regulado a 210 nm. Foi ajustado um fluxo de 0,6 mL/min a 60 °C, e como eluente foi utilizado solução de ácido sulfúrico 4 mM. A análise foi realizada com os padrões de interesse.

Os experimentos foram realizados em duplicata, e realizados Teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o software Minitab 17 para análise dos resultados de concentração de vanilina ($p < 0,05$).

4.3 Extração e quantificação dos compostos aromáticos

Para a avaliação dos compostos aromáticos de baixa massa molar provenientes dos métodos de oxidação avaliados (principalmente vanilina, ácido vanílico, siringaldeído, ácido siríngico) foi utilizado procedimento similar ao descrito por Mathias (1993).

Ao término da reação, quando necessário, as amostras foram acidificadas com HCl para precipitar a lignina que não foi completamente degradada e em seguida filtrada para sua remoção. A fração líquida resultante foi extraída com diclorometano, e a fração contendo o solvente orgânico foi evaporada e diluída em 3 mL de acetonitrila:água (1:8), filtrada em membrana de diâmetro de poro de 0,45 µm (Milipore) e analisada por CLAE. Para a oxidação que

levou a um maior rendimento de vanilina, foi avaliado também o efeito da extração utilizando éter dietílico e etanol.

Para a determinação dos compostos aromáticos de interesse por CLAE, foi utilizado uma coluna de fase reversa (Waters Spherisorb C18 Sum ODS2 4,6 x 100 mm) e um detector de UV a 276 nm. Foi ajustado um fluxo de 0,8 mL/min a temperatura ambiente, usando como eluente acetonitrila:água (1:8 com 1% de ácido acético). A calibração foi realizada com os padrões de interesse.

4.4 Aplicações da lignina oxidada residual em matriz para liberação controlada de herbicida

Dados da literatura (WU et al., 1994; VILLAR et al., 2001; PARTENHEIMER, 2009; KAGAWA; ROKUGAWA, 1971; SALOMON, 1979; COBOS et al., 1990; FARGUES et al., 1996) demonstram que os rendimentos dessas reações de oxidação não são elevados, gerando uma quantidade significativa de lignina residual com grande modificação por oxidação (lignina oxidada residual). Partindo de ligninas de gramíneas que apresentam um menor número de unidade guaiacil, que são as precursoras da vanilina a partir de lignina, esse rendimento pode ser ainda menor. Portanto, visando a utilização dessa lignina oxidada de alta massa molar foram realizados estudos de sua aplicabilidade na obtenção de formulações de liberação controlada de herbicidas, de acordo com método usado por Ferraz et al. (2009).

Os grânulos de liberação controlada foram obtidos por meio da mistura das ligninas (lignina de bagaço, lignina de bagaço oxidada, lignina de palha, lignina de palha oxidada, lignina de casca de café e lignina de casca de café oxidada) com o herbicida ametrina (grau técnico) na proporção [1:1] (m/m). As reações foram realizadas em um reator de aço inox inserido num banho termostático preenchido com óleo de silicone. As misturas foram aquecidas e agitadas durante 7 min a 180 °C. Ao resfriar, as matrizes vítreas foram moídas em grânulos de tamanho entre 1,0 e 2,0 mm.

Para se realizar o estudo da liberação do herbicida em água, foi utilizado um sistema estático. Os grânulos de cada amostra foram pesados para garantir a presença de pelo menos 25 mg do herbicida imerso em 30 mL de água destilada. O sistema foi fechado e deixado a temperatura ambiente por 50 dias. Nos primeiros 10 dias, foram retiradas amostras e trocados o volume total de água diariamente, e após os 10 primeiros dias as amostras foram retiradas a cada 5 dias, e finalmente, após o vigésimo dia de análise a amostra foi retirada após 30 dias. A concentração de ametrina liberada foi determinada por Espectroscopia no UV a 223 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e realizados Teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o software Minitab 17 para análise dos resultados de liberação de herbicida ao final do tempo de análise ($p < 0,05$).

4.5 Avaliações físico-químicas do material lignocelulósico e da lignina

4.5.1 Determinação da composição química dos materiais lignocelulósicos

A caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi realizada conforme metodologia desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009). Essa metodologia foi inicialmente desenvolvida para bagaço de cana e tem sido utilizada com sucesso para a palha de cana-de-açúcar (SAAD, 2008), e neste trabalho foi avaliada para casca de café.

Na biomassa in natura moída (30 mesh) foi realizada a remoção dos extrativos em Soxhlet utilizando etanol 95% (v/v) por 6 h.

Para a hidrólise completa dos oligômeros presentes nas amostras in natura livre de extrativos, pré-tratada e deslignificada (2 g massa seca), adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 72% (m/m), sob agitação, em um banho termostaticado a 45 °C por 7 min. Em seguida, com o auxílio de 275 mL de água destilada, o conteúdo foi transferido quantitativamente para um frasco Erlenmeyer, autoclavado por 30 min, a 121°C. Após resfriada, a mistura reacional foi filtrada e avolumada com água destilada a 500 mL em balão volumétrico, e utilizada para análise de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel, enquanto o retido foi utilizado para determinação da lignina insolúvel e do teor de cinzas. Após este processo de hidrólise, foi considerado como fração celulósica os compostos glicose, celobiose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural, como fração hemicelulósica a xilose, arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e furfural, e como fração de lignina o somatório das ligninas solúvel e insolúvel.

4.5.1.1 Carboidratos e ácidos orgânicos

Os carboidratos (glicose, celobiose, xilose e arabinose) e ácidos orgânicos (ácidos fórmico, glucurônico e acético) foram determinados por CLAE, empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a 45 °C, e detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C18 (Waters), previamente à injeção das amostras na coluna. A quantificação feita por curvas de calibração utilizando padrões de cada composto.

4.5.1.2 Furfural e hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por CLAE em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 18 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹, a 25 °C, e detector de UV-a 276 nm (Shimadzu SPD-10). Para total remoção de partículas sólidas as amostras foram filtradas em membrana de diâmetro de poro de 0,45 µm (Milipore). As concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração dos compostos puros.

4.5.1.3 Lignina solúvel

Para determinar a lignina solúvel, 5 mL de hidrolisado foi avolumado para 100 mL com água destilada e 40 gotas de NaOH 6,5 mol.L⁻¹, e a absorbância determinada em espectrofotômetro UV-vísivel (Perkin Elmer modelo Lambda 25) a 280 nm. A equação 4 foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{lig} = \frac{(A_{280} - \epsilon_{HMF} * C_{HMF} - \epsilon_{Furf} * C_{Furf})}{\epsilon_{lig}} \quad (4)$$

Onde: C_{lig} = Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g.L⁻¹);
 A_{280} = Absorbância do hidrolisado a 280 nm;
 ϵ_{HMF} = Coeficiente de extinção do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹ – Rocha et al., 1997);
 ϵ_{Furf} = Coeficiente de extinção do furfural (146,85 L.g⁻¹ – Rocha et al., 1997);
 C_{HMF} = Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g.L⁻¹);
 C_{Furf} = Concentração de furfural no hidrolisado (g.L⁻¹);
 ϵ_{lig} = Coeficiente de extinção da lignina (L.g⁻¹);

O coeficiente de extinção (ϵ) das ligninas foi determinado por meio da Lei de Lambert-Beer, a partir de curvas de calibração de concentrações conhecidas (0,025 a 0,0001 mol.L⁻¹) e da medida da absorbância a 280 nm, obtendo-se 22,86, 22,60 e 20,91 L.g⁻¹ para a lignina de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, respectivamente, obtidas após sua precipitação do licor negro (item 4.1.3).

4.5.1.4 Lignina insolúvel

O material insolúvel em meio ácido retido no papel de filtro foi lavado com 1,5 L de água destilada e seco em estufa a 105 °C, até massa constante. A lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa obtida nesta etapa e a massa obtida da determinação de cinzas.

4.5.1.5 Cinzas

O material seco proveniente da determinação de lignina insolúvel foi colocado em cadinho e pré-calcinados em mufla a 400 °C por 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, com a tampa removida, calcinado a 800 °C por 2 h. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

4.5.2 Determinação da composição química das ligninas

A caracterização química das ligninas foi realizada conforme metodologia desenvolvida pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL, 2008).

Previamente a hidrólise, foi realizada a remoção dos extrativos das ligninas em Soxhlet utilizando etanol 99,5% (v/v) por 24 h.

Para a hidrólise completa dos oligômeros presentes nas amostras livre de extrativos (0,3 g massa seca), adicionou-se 3 mL de H₂SO₄ 72% à amostra, que foi colocada em um banho termostatzado a 30 °C por 1 h, agitando-se a mesma a cada 5 min com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, foi adicionado 84 ml de água deionizada e o material autoclavado por 1 h, a 121°C. Após resfriada, a mistura reacional foi filtrada a vácuo, a fração líquida foi utilizada para análise de carboidratos e lignina solúvel, enquanto o retido foi lavado com 50 mL de água deionizada e utilizado para determinação da lignina insolúvel e do teor de cinzas. Após este processo de hidrólise, foi considerado como fração celulósica os compostos glicose, galactose e manose, como fração hemicelulósica a xilose e a arabinose, e como fração de lignina o somatório das ligninas solúvel e insolúvel.

4.5.2.1 Carboidratos

Os carboidratos (glicose, galactose, manose, xilose e arabinose) foram determinados por CLAE, empregando-se uma coluna de troca iônica (Aminex 87H - BioRad), utilizando como fase móvel H₂SO₄ 4 mM, a 60 °C, e um detector de índice de refração. Previamente à injeção das

amostras na coluna, o pH foi ajustado a 6 com o auxílio de carbonato de cálcio e as amostras filtradas em membrana de diâmetro de poro de 0,2 µm (Milipore). A quantificação foi feita por curvas de calibração utilizando padrões de cada composto.

4.5.2.2 Lignina solúvel

A lignina solúvel foi determinada em espectrofotômetro UV-vísivel a 240 nm. A equação 5 foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{lig} = \left(\frac{A_{240} * V_{filtrado} * D}{\epsilon_{lig} * m_{amostra} * c} \right) * 100 \quad (5)$$

Onde: C_{lig} = Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g.L^{-1});

A_{240} = Absorbância do hidrolisado a 240 nm;

$V_{filtrado}$ = Volume do filtrado, 86,73 mL ((4,9 g H_2SO_4 + 84,0 g H_2O) / d H_2SO_4));

D = Diluição amostra para se obter uma absorbância entre 0,7 - 1,0;

ϵ_{lig} = Coeficiente de extinção da lignina (L.g^{-1});

$m_{amostra}$ = Massa de amostra (mg);

c = Espessura da cubeta (cm);

4.5.2.3 Lignina insolúvel

O material insolúvel em meio ácido retido no filtro e lavado com 50 mL de água destilada foi seco em estufa a 105 °C por 5 h. A lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa obtida nesta etapa e a massa obtida da determinação de cinzas.

4.5.2.4 Cinzas

O material seco proveniente da determinação de lignina insolúvel foi colocado em cadinho e calcinado a 575 °C por 24 h. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

4.5.3 Espectrometria de Infravermelho

A espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é comumente utilizada para a caracterização dos grupos funcionais da biomassa lignocelulósica e mudanças causada por diferentes tratamentos (SIM et al., 2012).

Para análises na região do infravermelho, amostras de 1 mg do material lignocelulósico e da lignina, previamente secos em dessecador, foram misturados a 250 mg de KBr e transformadas em pastilhas por prensagem e submetidas a análise na região do infravermelho ($400 - 4000\text{ cm}^{-1}$) em um espectrômetro de infravermelho Spectrum GX Perkin Elmer. Para que os espectros fossem comparados qualitativamente e semi-quantitativamente, a quantidade de amostra avaliada foi constante. Os espectros de lignina foram normalizados pela banda de 1510 cm^{-1} , correspondente às vibrações dos anéis aromáticos, típica de lignina e pouco variável de uma amostra para a outra (FAIX, 1994).

4.5.4 Espectrometria de Ultravioleta

Espectroscopia de ultravioleta é um dos métodos mais convenientes para a análise quantitativa e qualitativa de lignina em solução (LI; DENCE, 1992). A espectrometria na região do UV foi utilizada nesse trabalho para determinação do coeficiente de extinção das diferentes ligninas a 280 nm e para obter informações estruturais. As amostras de lignina foram secas em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h, e preparadas soluções de diferentes concentrações de lignina (0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,002, 0,0005 e $0,0002\text{ g.L}^{-1}$) em meio aquoso contendo 40 gotas de NaOH $6,5\text{ mol.L}^{-1}$ por L de solução, e as absorbâncias registradas em espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. As análises foram realizadas em duplicata e a média das absorbâncias obtidas em cada concentração utilizada para se plotar a curva absorbância versus concentração de lignina.

4.5.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem facilitado enormemente as investigações sobre aspectos estruturais da lignina (PU et al., 2013). Para aumentar a solubilidade da amostra no solvente, foi realizada a acetilação da amostra misturando-se 2,0 mL de piridina e 2,0 mL de anidrido acético em 100 mg de lignina livre de umidade. A mistura foi borbulhada por 30 min com nitrogênio. A reação de acetilação se processou por 72 h a temperatura ambiente no escuro. Após esse período, foram adicionados 5,0 mL de metanol para neutralizar o excesso de

anidrido acético e os solventes foram evaporados sob pressão reduzida. Quando a lignina é acetilada, é formado ácido acético, que em contato com a piridina, forma sais que não são volatilizados, portanto, para se remover esses sais a lignina acetilada foi solubilizada em 2,0 mL de CHCl_3 e misturada a 2,0 mL de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, e a fase orgânica seca a vácuo e utilizada para realização das análises.

As ligninas acetiladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café foram analisadas por ^1H RMN, ^{13}C RMN e HSQC 2D RMN. Essas análises foram realizadas no Centro de Espectroscopia de RMN (Center for NMR Spectroscopy) da Universidade do Estado de Washington (Washington State University – WSU), em Pullman – EUA. As análises foram realizadas a 27°C em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, modelo Varian VNMRS 600 MHz (Agilent Technologies, EUA), utilizando como solvente DMSO-d_6 , operando a 599,7 MHz e um tempo de análise de 7,15 min para o ^1H RMN e 150,81 MHz e um tempo de análise de 16,67 h para o ^{13}C .

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das biomassas utilizadas na obtenção das ligninas

5.1.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

O processo de obtenção da lignina a partir das biomassas estudadas contou com 2 etapas, uma de pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (v/v) e outra de extração alcalina utilizando hidróxido de sódio 2,5% (m/v), ambas realizadas em um reator de aço inoxidável com 45 L de capacidade com tempo de residência de 10 min a 120 °C, desprezando-se o tempo de aquecimento e resfriamento do reator.

Na Tabela 3, encontram-se os valores da caracterização química e os desvios médios de cada componente, bem como os rendimentos em termos de preservação da celulose para o bagaço de cana após as etapas realizadas para obtenção da lignina. Visando a viabilização de uma biorrefinaria, a preservação da celulose para posterior produção de biocombustíveis e químicos é de grande importância, assim como uma remoção e recuperação efetiva da hemicelulose e da lignina. Neste trabalho, priorizou-se utilizar condições que pudessem proporcionar uma maximização na obtenção da lignina em um menor tempo, visto que este é o objeto de estudo, porém de forma cautelosa para que a celulose fosse também preservada. Rezende et al. (2011), avaliaram o efeito da concentração de NaOH na remoção de lignina e rendimento de celulose em bagaço de cana pré-tratado com H₂SO₄ 1%. No trabalho foram avaliadas 6 concentrações de NaOH (0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4%), e os autores observaram que após 2% a remoção de lignina não foi alterada, no entanto, o rendimento da etapa aumentou de 68,3% para 70,7% quando utilizado NaOH 3%, e caiu para 65,9% quando utilizado NaOH 4%. Para concentrações de NaOH de 0,25 e 0,5% foi possível verificar um aumento expressivo no rendimento (90,5 e 84,5%, respectivamente), no entanto, a remoção da lignina foi mais que 1,5 vezes menor quando comparado a concentrações superiores de soda. Neste trabalho optou-se por utilizar uma concentração de NaOH de 2,5%, o que propiciou uma remoção eficiente da lignina, um menor tempo de reação, porém obteve-se um rendimento de celulose em torno de 47,31%.

Tabela 3– Composição química do bagaço de cana in natura, do pré-tratado e do deslignificado.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Total (%)
Bagaço de cana in natura	42,37 ± 0,47	22,35 ± 0,17	26,72 ± 0,45	4,81 ± 0,11	3,87 ± 0,25	96,25
Bagaço de cana pré-tratado*	55,78 ± 0,18	7,56 ± 0,28	33,66 ± 0,55	2,90 ± 0,27	—	99,90
Bagaço de cana deslignificado**	73,44 ± 0,75	3,45 ± 0,17	13,65 ± 0,79	5,84 ± 0,26	—	96,38

* Rendimento mássico da etapa de pré-tratamento: 63,23%. ** Rendimento mássico da etapa de deslignificação: 47,31%.

Os valores obtidos para a composição química são comparáveis aos encontrados na literatura para bagaço de cana, conforme pode ser observado na Tabela 4. Variações observadas quando utilizado condições experimentais semelhantes podem ser atribuídas a variabilidade da biomassa, como o estágio de maturação, clima e propriedades do solo, ou mesmo a forma de lavagem do material, o que reflete diretamente no percentual de cinzas. Foi realizada a determinação de extrativos somente para o material in natura, pois para os materiais obtidos nas etapas posteriores, essa determinação é considerada insignificante dentro do desvio padrão das medidas quantitativas realizadas, uma vez que estas substâncias são removidas durante o pré-tratamento.

Tabela 4 – Composição química do bagaço de cana in natura e do tratado com ácido diluído e com NaOH de acordo com o determinado por outros autores.

Amostras de bagaço de cana	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Referência
Sem tratamento	45,0 ± 1,1	27,0 ± 0,8	21,1 ± 0,9	2,2 ± 0,1	4,6 ± 0,3	Rocha et al. (2011)*
Sem tratamento	42,8 ± 0,3	25,9 ± 0,3	22,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	6,1 ± 0,1	Silva et al., (2011)*
Sem tratamento	37,6 ± 1,4	29,4 ± 1,1	13,2 ± 0,5	0,9 ± 0,2		Pereira et al. (2015)
Sem tratamento	45,0	25,8	19,1	1,0	9,1	Canilha et al., (2011)*
Sem tratamento	35,2 ± 0,9	24,5 ± 0,6	22,2 ± 0,1	20,9 ± 4,3		Rezende et al. (2011)
H ₂ SO ₄ 1%	51,2 ± 0,2	7,8 ± 0,7	29,5 ± 0,6	12,2 ± 1,5		Rezende et al. (2011)
H ₂ SO ₄ 1,5%	48,9 ± 1,3	7,7 ± 0,1	31,4 ± 1,0	0,6 ± 0,1		Pereira et al. (2015)
NaOH 2%	84,7 ± 0,3	3,3 ± 0,1	9,5 ± 0,5	1,1 ± 0,4		Rezende et al. (2011)
NaOH 3%	85,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	9,5 ± 0,5	2,3 ± 0,2		Rezende et al. (2011)

*autores que utilizaram a metodologia de caracterização química descrita por Rocha et al. (1997) e validada por Gouvea et al. (2009).

Para o material in natura, é possível verificar valor de celulose intermediário, de hemicelulose um pouco inferior e de lignina superior; já para o teor de cinzas, o valor obtido é mais elevado do que o observado por outros autores, o que pode ser resultado provavelmente de inorgânicos provenientes do solo com o qual esse material esteve em contato e que não foram totalmente removidos durante a lavagem. Rezende et al. (2011) observaram um valor de cinzas muito superior para o bagaço in natura, o que pode ser explicado pela ausência da etapa de lavagem antecedendo a caracterização química. Ao comparar os resultados do material após o pré-tratamento com ácido encontram-se valores de celulose e lignina superiores e de hemicelulose bastante próximo. O mesmo é observado para hemicelulose após o tratamento com NaOH, e para a lignina é observado uma maior porcentagem, no entanto, a biomassa de partida também apresentou valores superiores de lignina, e para a celulose é observado um valor inferior após a deslignificação. Esses valores demonstram que esse tipo de biomassa contém uma considerável quantidade de lignina e outros componentes de interesse dentro de um processo de biorrefinaria.

Figura 18 – Distribuição dos componentes do bagaço de cana in natura (1), do pré-tratado (2) e do deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 18 apresenta a distribuição dos componentes nas frações de celulose, hemicelulose e lignina após a hidrólise do bagaço de cana para a determinação da composição química do material in natura, pré-tratado e deslignificado. É possível verificar a presença principalmente de xilose na fração hemicelulósica do material in natura após a hidrólise. Em termos de lignina, verifica-se que grande parte está na forma insolúvel no material in natura, sendo esta fração removida em maior intensidade durante a deslignificação. A fração solúvel presente em menor quantidade foi perdida em menores proporções durante ambas etapas.

Em relação ao aspecto físico do material, é possível verificar alteração na coloração do mesmo, bem como alteração no tamanho e forma das partículas moídas, que se apresentaram mais cominuídas (quase em pó) após os tratamentos (Figura 19). Após o pré-tratamento com ácido, o material recolhido foi lavado com água até a total remoção dos açúcares hidrolisados (hemiceluloses). O material pré-tratado apresentou uma coloração levemente amarronzada diferente do bagaço in natura que possui uma cor levemente amarelada. Essa coloração pode estar associada com a quebra de lignina e de extrativos (SUN et al, 2005) ou ainda relacionada com os produtos de degradação de açúcares que são gerados em temperaturas elevadas de pré-tratamento (caramelização dos açúcares). A etapa de deslignificação causou uma descoloração parcial da polpa, possivelmente devido a remoção de grande parte da lignina presente na polpa.

Figura 19 – Bagaço de cana moído: in natura (A), pré-tratado com ácido diluído (B) e deslignificado (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

A análise da composição química do bagaço in natura e pré-tratado, juntamente com o rendimento, reportados na Tabela 3, nos permite determinar a porcentagem de perda de cada componente durante essa etapa. Esses resultados estão dispostos na Figura 20, e nos revelam que o componente que sofreu maior perda foi a hemicelulose, que foi solubilizada em torno de 78,62%. Esse tipo de pré-tratamento causa a solubilização da hemicelulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a porosidade dos materiais (SUN; CHENG, 2005). Como a hemicelulose tem uma estrutura morfológica mais amorfa e de maior acesso aos reagentes químicos do que a celulose (FENGEL; WEGENER, 1989), que possui uma estrutura mais cristalina, o ácido presente durante o pré-tratamento vai provocar a hidrólise preferencialmente das hemiceluloses, removendo-as do material pré-tratado. Esse pré-tratamento tem como vantagem não somente solubilizar a hemicelulose, que é termicamente instável, mas também converter a hemicelulose solubilizada em açúcares fermentescíveis (ALVIRA et al., 2009). Em relação a celulose foi observada uma perda de 16,75%, correspondendo provavelmente grande parte à fração amorfa ou de baixa cristalinidade, tornando a fração celulósica mais susceptível à ação de outros reagentes. A lignina é pouco removida durante o pré-tratamento com ácido

diluído pois pode sofrer reações de condensação em condições ácidas. Nesta etapa do processo observou-se uma perda de 20,35% de lignina, em maior proporção de lignina solúvel, conforme observado na Figura 18.

Figura 20 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de bagaço de cana (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).

Fonte: Arquivo pessoal.

A segunda etapa utilizando NaOH visa principalmente solubilizar a lignina e separá-la da fração celulósica, promovendo dessa forma a possibilidade do aproveitamento dessas frações para obtenção de compostos de maior valor agregado. Conforme foi mencionado na revisão bibliográfica, dentro de um conceito de biorrefinaria poderíamos utilizar a hemicelulose já removida para produzir xilitol, por exemplo, essa celulose para obtenção de etanol e a lignina para obtenção de compostos aromáticos, que são produzidos em menores quantidades, mas que apresentam um valor de comércio relativamente mais elevado. Portanto, é desejável que o máximo de lignina seja removido, com a mínima perda de celulose.

Após a reação de deslignificação, a fração sólida (celulose) foi separada do licor negro rico em lignina e lavada com água até que houvesse queda do pH próximo ao neutro, o que pôde também ser acompanhado pela coloração da água de lavagem que foi passando de uma coloração amarelada a incolor. O licor negro foi armazenado para posterior precipitação e obtenção da lignina.

Essa etapa apresentou um rendimento mássico de 47,31% (Tabela 3). Esse rendimento para celulose foi baixo, visto que 37,71% da celulose foi perdida durante essa etapa (Figura 20). Em meio alcalino, a celulose pode sofrer hidrólise e, com isso, ocorrer reações de peeling, que são indesejáveis pelas seguintes razões: (1) a hidrólise alcalina promove a cisão da cadeia polimérica, decrescendo drasticamente o comprimento médio da cadeia; (2) nas reações de peeling, as

unidades de açúcar com extremidades redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas e, além da perda de açúcares, os carboidratos removidos são convertidos em diversos ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali efetivo no licor de cozimento (BERGGREN et al., 2003; KNILL; KENNEDY, 2003). Provavelmente a temperatura utilizada nessa etapa promoveu uma maior quebra da celulose, considerando que sua estrutura estava mais susceptível a ação dos reagentes após o pré-tratamento. Durante a deslignificação, grande parte da hemicelulose (78,41%) ainda presente na polpa também foi solubilizada (Figura 20). No entanto, a condição utilizada nos permitiu solubilizar pouco mais de 80% da lignina que compunha a biomassa após o pré-tratamento, com um curto tempo de reação. No contexto de obtenção de lignina, essa condição foi satisfatória, pois nos permitiu a rápida remoção de grande parte da lignina, economizando tempo e gastos energéticos, mas para uma biorrefinaria, conforme mencionado anteriormente seriam interessantes reações que promovessem o melhor custo/benefício visando a obtenção das três frações (celulose, lignina e hemicelulose).

Num balanço global das etapas, ao final de todo o processo de obtenção de lignina foi observada grande perda de celulose (48,15%), principalmente na etapa de deslignificação, fato que seria indesejável visando a utilização da biomassa como um todo, e para hemicelulose foi observada uma perda superior a 95% ao longo do processo, ocorrida principalmente na etapa de pré-tratamento. A perda de lignina foi observada ao longo do processo, mas sua maior remoção foi durante a deslignificação alcalina (80,81%), fator esse favorável quando se deseja um alto rendimento de lignina.

Tabela 5 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para o bagaço de cana-de-açúcar.

Amostra	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Rendimento da etapa (%)	Lignina solúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Lignina insolúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Relação lignina solúvel/insolúvel
Bagaço de cana in natura	3,88	22,84	100	3,88	22,84	0,17
Bagaço de cana pré-tratado	3,53	30,13	63,23	2,23	19,05	0,12
Bagaço de cana deslignificado	2,42	11,23	47,31	1,14	5,31	0,22

Considerando-se o rendimento obtido em cada etapa de tratamento utilizado, e os teores percentuais de lignina, solúvel e insolúvel, obtidos por meio da caracterização química, foi obtida a relação lignina solúvel/insolúvel para o bagaço, a qual está apresentada na Tabela 5.

Observando-se os dados presentes na Tabela 5, pode-se observar uma remoção de lignina, tanto insolúvel quanto solúvel, após a etapa de pré-tratamento. Entretanto, após a

deslignificação foi notada uma remoção preferencial da lignina insolúvel, provavelmente, essa remoção preferencial pode ocorrer segundo duas hipóteses: (1) a lignina insolúvel possui maior massa molar, sendo assim mais susceptível às etapas de tratamento; (2) a remoção ocorreria em cadeia: parte da lignina solúvel seria removida e a lignina insolúvel passaria a ser solúvel e assim sucessivamente.

Em termos de rendimento experimental de lignina obtida ao final das etapas de pré-tratamento e deslignificação do bagaço de cana in natura, verifica-se que para cada 1 g de bagaço tratado obteve-se 0,1 g de lignina, portanto, partindo do percentual de lignina inicialmente presente no material in natura, pode se estimar que cerca de 37,45% dessa lignina foi recuperada durante o processo. Assumindo-se que cerca de 20,35% foi perdida durante o pré-tratamento, e cerca de 80,81% do restante foi solubilizada no licor negro, obtém-se um rendimento teórico de 64,48%, e pode se estimar que cerca de 58,82% da lignina teoricamente presente no licor foi recuperada.

5.1.2 Análises de Infravermelho do bagaço de cana-de-açúcar

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é comumente utilizada para estudar os grupos funcionais de biomassa lignocelulósica e as alterações causadas devido a diferentes tratamentos. Os espectros oferecem informações qualitativa e semi-quantitativa, sugerindo a presença e ausência de compostos lignocelulósicos, e se a intensidade de uma banda de absorção mudou após o tratamento (LI et al., 2010). A Tabela 6 apresenta importantes regiões de absorção de material lignocelulósico no espectro de infravermelho e suas atribuições. De acordo com Zhbankov et al. (2002), as bandas de absorção de fibras naturais podem variar aproximadamente $\pm 16 \text{ cm}^{-1}$ de suas posições para diferentes estudos.

A Figura 21 apresenta o espectro de infravermelho do bagaço de cana durante as etapas de tratamento. No espectro de bagaço de cana in natura é possível observar bandas de absorção nas seguintes regiões: 3426, 2920, 2850, 1715, 1638, 1607, 1515, 1461, 1421, 1380, 1335, 1260, ombro em 1224, 1166, 1112, 1066, 1043, ombro em 922 e 837, 798, 775, ombro em 723, 695, 688, 616, 532 e 471 cm^{-1} .

Avaliando-se o espectro de infravermelho do bagaço de cana durante as diferentes etapas de obtenção de lignina é possível perceber na região de $3350\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento de vibrações de ligações O-H em celulose (JAYARAMUDU et al., 2010), que há um aumento progressivo com o pré-tratamento e a deslignificação. Na região de $2870\text{-}2930 \text{ cm}^{-1}$ representando as ligações do tipo C-H, podem se observar duas bandas, que são mais bem definidas no bagaço in natura, porém, menos acentuada. Kiruthika e Veluraja (2009) atribuíram o

estiramento C-H devido a vibração de celulose à presença de um pico moderado a 2919 cm^{-1} . Essas ligações estão presentes nos grupos funcionais alcanos, cetonas e álcoois que são característicos dos materiais lignocelulósicos (LEÃO, 2012).

Tabela 6 – Importantes regiões de absorção de material lignocelulósico no espectro de infravermelho e suas atribuições. Adaptado de Ding et al. (2012), Shi e Li (2012), Sills et al. (2012) e Kubo e Kadla (2005).

Faixa de número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Polímero
3412 - 3421	Estiramento O-H	Celulose, lignina
2840, 2923	Estiramento C-H	Celulose, lignina
1730	Estiramento C=O	Hemicelulose, lignina
1682	Estiramento C=O (não-conjugado)	Lignina
1595	Vibrações do esqueleto aromático influenciada por estiramento C=O	Lignina
1500 - 1511	Vibrações do esqueleto aromático	Lignina
1457 - 1465	Deformações C-H	Lignina
1427	Deformação angular de O-H no plano	Celulose, hemicelulose, lignina
1425 - 1427	Deformação C-H no plano	Lignina
1370 - 1380	Deformação angular de C-H	Celulose, hemicelulose, lignina
1335	Viração C-H e deformação angular O-H no plano	Celulose, hemicelulose, lignina
1327	C-O de anel siringil	Lignina
1280, 1320	Deformação angular de C-H	Celulose
1270	Vibrações do anel G, influenciada por estiramento C=O	Lignina
1215	Estiramento C-C e C-O	Lignina
1160	Estiramento assimétrico C-O-C	Celulose, hemicelulose
1043	Estiramento C-O, C-C, C-OH	Celulose, hemicelulose, lignina
1030 - 1035	Estiramento C-O, C=C, C-C-O	Celulose, hemicelulose, lignina

Os picos de absorbância associados com C=O variam de aproximadamente 1713 a 1704 cm^{-1} e são representados por grupos acetil e ésteres de hemicelulose ou ácidos carboxílicos e carbonilas presentes na lignina. A presença de aldeídos e cetonas é um indicativo de hemicelulose e lignina intacta (GRABBER, 2005; OHGREN et al., 2007). No bagaço pré-tratado esse pico é mais intenso, podendo estar relacionado a presença de lignina e também de hemicelulose que não foi totalmente degradada. Já no bagaço deslignificado essa banda desaparece, evidenciando a eficiência na remoção de grupos relacionados a hemicelulose e a lignina. A região correspondente ao estiramento C=O de carbonilas conjugadas em $1632\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ encontra-se presente em todos os espectros, indicando certa quantidade de lignina presente mesmo na amostra após tratamento com soda. No entanto, a região de $1604\text{-}1605\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de C=C aromático e atribuída ao conteúdo de lignina na fibra (SARAVANAKUMAR et al., 2013) não se encontra presente no espectro deslignificado, mas a grande remoção de lignina após o

tratamento com soda fica mesmo evidente ao se observar o quase desaparecimento da banda na região de 1510-1515 cm^{-1} típica de ligação C=C aromático associada à lignina.

Figura 21 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de bagaço de cana-de-açúcar. Os espectros não foram normalizados. Os números de bandas assinalados na região ampliada (1400 a 1800 cm^{-1}) se referem à Tabela 7.

Fonte: Arquivo pessoal.

Absorções entre 1440 e 800 cm^{-1} são atribuídas à ligações presentes em vários polímeros de parede celular de planta (por exemplo, em 1380 cm^{-1} C-H flexão em celulose, hemicelulose e lignina) (FAIX, 1994; NELSON; O'CONNOR, 1964a). Além disso, muitas absorções de bandas nessa região são resultantes de vibrações de diversos tipos de ligação (por exemplo, em 1335 cm^{-1} é atribuído a C-H, C-O, e ligações O-H) (FAIX, 1994; HULLEMAN et al., 1994; NELSON; O'CONNOR, 1964b), tornando esta área do espectro extremamente difícil de se interpretar (FAIX, 1994; HULLEMAN et al, 1994).

É possível verificar que as bandas na região de 1461 e 1260 cm^{-1} diminuem bastante no espectro de bagaço de cana deslignificado. Segundo Shi e Li (2012) a região de 1457 cm^{-1} está relacionada a parte alifática de ligninas e a região de 1266 cm^{-1} ao estiramento C-O em xilanas e ligninas e ao anel siríngeo em ligninas, indicando a remoção dessas estruturas após o tratamento com soda. Segundo Rosa et al. (2012), a redução da banda em 1460 cm^{-1} demonstra a eficácia do processo na remoção dos extrativos, gorduras, hemicelulose e lignina das fibras.

Inúmeras bandas de absorção são possivelmente associadas com hemiceluloses devido à sua grande diversidade estrutural, como por exemplo, 1462, 1419, 1384, 1330, 1244, 1162, 1122, 1090, 1040, 986, e 897 cm^{-1} (PENG et al. 2009). As arabinoxilanas (xilanas que possuem grande

número de resíduos de arabinose em cadeias laterais) geralmente apresentam banda máxima de absorção em 1035 cm^{-1} (KACURÁKOVÁ et al., 1999). É possível observar que a banda em 1043 cm^{-1} diminui progressivamente com o pré-tratamento e com o tratamento com soda, podendo indicar remoção de hemicelulose.

Tabela 7 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço de cana-de-açúcar durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	Bagaço de cana-de-açúcar in natura			Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado			Bagaço de cana-de-açúcar deslignificado		
	cm^{-1}	A	% A	cm^{-1}	A	% A	cm^{-1}	A	% A
1	1713	0,43	28,9	1704	0,56	37,6	—	—	—
2	1632	0,53	35,5	1632	0,57	37,8	1639	0,54	36,0
3	1605	0,47	31,5	1604	0,77	51,4	—	—	—
4	1515	0,46	30,9	1515	0,75	49,9	1510	0,29	19,7

Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos admitindo como 100 a banda de maior intensidade, conforme análise descrita por Faix (1994) e Gonçalves (1995).

Comparando as absorbâncias e absorbâncias relativa de algumas bandas que fornecem importantes informações relacionadas a lignina (Tabela 7), é possível verificar que após a extração com soda essas bandas diminuíram ou mesmo desapareceram, conforme discutido anteriormente. Avaliações relativas a hemiceluloses devem ser mais cautelosas devido a complexidade das bandas.

5.1.3 Caracterização química da palha de cana-de-açúcar

Os resultados obtidos para a caracterização química da palha de cana e os desvios médios de cada componente estão apresentados na Tabela 8. Como já descrito para o bagaço, a determinação de extrativos foi somente realizada para o material in natura, pois para aos materiais obtidos nas etapas posteriores essa determinação é considerada insignificante dentro do desvio padrão das medidas quantitativas realizadas, uma vez que estas substâncias são removidas durante o pré-tratamento.

O rendimento obtido na etapa de pré-tratamento foi cerca de 2,09% inferior ao observado para o bagaço de cana, e na etapa de deslignificação essa diminuição foi de 3,56%, podendo indicar que a celulose de palha é mais sensível a temperatura do que a celulose de bagaço de cana. É válido salientar que os cálculos de rendimento são comumente realizados em função da perda de polpa celulósica, portanto, esses cálculos não são em função da obtenção de lignina. Silva (2009) obteve um rendimento de 57% quando realizou o pré-tratamento em palha

de cana com ácido diluído, nas mesmas condições utilizadas neste trabalho, o que está próximo com o obtido neste trabalho.

Tabela 8 – Composição química da palha de cana in natura, da pré-tratada e da deslignificada.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Total (%)
Palha de cana in natura	33,74 ± 0,08	28,30 ± 0,04	30,07 ± 0,40	2,18 ± 0,25	2,30 ± 0,10	94,29
Palha de cana pré-tratada*	52,64 ± 0,89	6,25 ± 0,25	37,94 ± 0,12	2,67 ± 0,30		99,50
Palha de cana deslignificada**	82,74 ± 1,35	2,26 ± 0,10	12,60 ± 0,55	1,90 ± 0,10		99,51

* Rendimento mássico da etapa de pré-tratamento: 61,14%. ** Rendimento mássico da etapa de deslignificação: 43,75%.

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que a palha possui um percentual de lignina maior em relação ao determinado para o bagaço, e ainda em relação ao bagaço, um percentual de celulose menor. Esses valores podem ser comparados ao reportado por outros autores que avaliaram palha de cana, sem tratamento, pré-tratado com ácido diluído e posteriormente deslignificado usando soda, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição química da palha de cana in natura e da tratada com ácido diluído e com NaOH de acordo com o determinado por outros autores.

Amostras de palha de cana	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Referência
Sem tratamento	36,1 ± 0,5	28,3 ± 0,1	26,2 ± 0,5	2,1 ± 0,2	5,3 ± 0,1	Moriya, (2007)*
Sem tratamento	38,1 ± 0,2	29,2 ± 0,3	24,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	5,9 ± 0,2	Silva, (2009)*
Sem tratamento	39,8 ± 0,3	28,6 ± 0,2	22,5 ± 0,1	2,4 ± 0,3	6,2 ± 0,3	Oliveira, (2006)
Sem tratamento	41,1 ± 0,9	36,2 ± 0,9	11,4 ± 0,4	2,2 ± 0,5		Pereira et al., (2015)
Sem tratamento	41,7 ± 0,9	29,7 ± 0,7	25,0 ± 0,5	3,2 ± 0,1		Gambarato, (2014)*
H ₂ SO ₄ 1%	51,9 ± 0,1	17,0 ± 0,1	29,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0		Silva, (2009)*
H ₂ SO ₄ 1,5%	47,9 ± 0,9	6,5 ± 0,3	32,5 ± 0,5	1,0 ± 0,1		Pereira et al., (2015)
NaOH 1%	74,2 ± 0,2	9,1 ± 0,2	14,9 ± 0,2	1,0 ± 0,0		Silva, (2009)*

*autores que utilizaram a metodologia de caracterização química descrita por Rocha et al. (1997) e validada por Gouvea et al. (2009).

Ao comparar os resultados apresentados por outros autores, pode-se verificar que a palha in natura avaliada neste trabalho apresentou teores de celulose e extrativos inferiores, teor de hemicelulose semelhante e teor de lignina superior. Já no material pré-tratado, podem ser observados resultados semelhantes para o teores de celulose e hemicelulose, porém, ainda com valores de lignina superiores. A etapa de deslignificação apresentou um material com maior teor de celulose, um teor bastante inferior de hemicelulose, e uma quantidade de lignina inferior quando comparado ao apresentado por Silva (2009).

A Figura 22 apresenta a distribuição dos componentes nas frações de celulose, hemicelulose e lignina após a hidrólise da palha de cana para a determinação da composição química do material in natura, pré-tratado e deslignificado. É possível verificar a presença principalmente de xilose na fração hemicelulósica do material in natura após a hidrólise. Em termos de lignina, verifica-se que após a hidrólise da biomassa in natura existe uma maior fração de lignina solúvel ao se comparar com o observado no bagaço in natura. Essa fração solúvel foi perdida em menores proporções durante ambas etapas, enquanto a fração insolúvel foi removida em maior intensidade durante a deslignificação, comportamento este semelhante ao observado para o bagaço.

Figura 22 – Distribuição dos componentes da palha de cana in natura (1), do pré-tratado (2) e do deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação ao aspecto físico do material, é possível verificar alteração na coloração do mesmo, bem como alteração no tamanho e forma das partículas moídas, que se apresentaram numa forma cominuídos (quase em pó) após os tratamentos (Figura 23). Escurecimento semelhante do material pré-tratado em relação ao in natura, observado para o bagaço de cana, também pôde ser observado para a palha. Como já discutido anteriormente, a mudança de cor está provavelmente associada com a quebra da lignina e extrativos durante o pré-tratamento

(SUN et al., 2005), ou também devido às reações de caramelização dos açúcares que acontecem em altas temperaturas, gerando produtos de degradação escuros. O tratamento com NaOH causou uma descoloração parcial da polpa, fato este devido a remoção de grande parte da lignina presente na polpa.

Figura 23 – Palha de cana moída: in natura (A), pré-tratada com ácido diluído (B), e deslignificada (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

A palha de cana-de-açúcar foi pré-tratada e deslignificada nas mesmas condições já descritas para o bagaço. Após o pré-tratamento, o material recolhido foi lavado com água até a total remoção dos açúcares hidrolisados (hemiceluloses). Após a deslignificação alcalina da palha pré-tratada, a fração celulósica foi lavada até a água de lavagem não apresentar coloração amarelada e o pH atingir valores próximo da neutralidade. O licor negro foi armazenado para precipitação e obtenção da lignina.

A análise de composição química da palha in natura, pré-tratada e deslignificada reportada na Tabela 8, juntamente com o rendimento obtido nestas etapas, nos permite o cálculo da remoção de componentes em cada etapa (Figura 24). Durante o pré-tratamento, 86,50% da hemicelulose presente na palha in natura foi solubilizada, valor esse superior ao observado para o bagaço pré-tratado. Esse tipo de pré-tratamento, como já discutido para o bagaço, solubiliza as hemiceluloses (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), que, devido a sua estrutura, são mais susceptíveis à hidrólise no pré-tratamento ácido do que a fração celulósica (FENGEL; WEGENER, 1989). A partir das condições reacionais utilizadas no pré-tratamento da palha de cana obteve-se uma solubilização de 14,71% de celulose, provavelmente grande parte de celulose amorfa. A lignina foi pouco removida (22,86%), como já discutido, a lignina é pouco removida durante o pré-tratamento com ácido, pois sofre reações de condensação em condições ácidas.

Durante o pré-tratamento, apesar de grande parte da fração de hemicelulose ter sido removida, pouca lignina foi removida, portanto quando se foca na utilização de todos os componentes da biomassa, verifica-se a necessidade de uma etapa de extração alcalina para

solubilizar essa lignina ainda presente, e obter assim uma fração rica em celulose e outra rica em lignina.

O rendimento obtido na etapa de deslignificação foi de 43,75%, o que indica que as condições de reação foram muito drásticas, acarretando em uma perda de 31,23% da celulose. Nestas condições a celulose pode sofrer hidrólise alcalina e com isso ocorrer às reações de peeling, que promovem a cisão da cadeia polimérica (BERGGREN et al., 2003; KNILL; KENNEDY, 2003). Essas reações são indesejáveis quando se visa a máxima obtenção de cada componente para posterior aplicação num conceito de biorrefinaria. Observou-se também que a etapa de deslignificação deste material pré-tratado removeu 84,17% da hemicelulose. A lignina foi bastante removida com esse tratamento, sendo cerca de 85,46% da lignina solubilizada no licor, fator esse satisfatório para este trabalho que visa a obtenção e posterior aplicação da lignina.

Figura 24 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de palha de cana (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).

Fonte: Arquivo pessoal.

Observando as perdas de componentes de uma maneira global (incluindo as 2 etapas de tratamento) pode se concluir que houve uma perda substancial de celulose (41,35%) durante o processo. A hemicelulose foi praticamente removida em sua totalidade do material lignocelulósico (97,86%), principalmente durante o pré-tratamento, e 88,79% da lignina foi solubilizada, principalmente durante a extração alcalina.

A partir dos dados obtidos na caracterização química avaliou-se a proporção de lignina solúvel e insolúvel removida durante o processo. Com a etapa de pré-tratamento, grande parte da lignina solúvel foi perdida, a lignina insolúvel foi somente removida na etapa de deslignificação. Um fato interessante pôde ser observado com relação a porcentagem de lignina solúvel presente na palha in natura, que foi maior do que a observada para bagaço em cerca de 3 vezes (Tabela 10). Esse comportamento distinto entre as duas biomassas utilizadas, é mais um

indicativo da diferença de composição entre esses materiais. O bagaço é um material basicamente lenhoso, e a palha é majoritariamente constituída por folhas, por isso pode conter polifenóis que podem estar sendo contabilizados como lignina solúvel, e com isso, torna-se necessário o estudo e o entendimento da estrutura e das reações que envolvem a lignina de palha durante esses tratamentos.

Tabela 10 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para a palha de cana-de-açúcar.

Amostra	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Rendimento da etapa (%)	Lignina solúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Lignina insolúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Relação lignina solúvel/insolúvel
Palha de cana in natura	11,28	18,79	100	11,28	18,79	0,60
Palha de cana pré-tratada	6,54	31,40	61,14	4,00	19,20	0,21
Palha de cana deslignificada	5,62	6,99	43,75	2,46	3,06	0,80

Em termos de rendimento experimental de lignina obtida ao final das etapas de pré-tratamento e deslignificação da palha de cana in natura, verifica-se que para cada 1 g de palha in natura obteve-se 0,09 g de lignina, portanto, partindo da percentual de lignina inicialmente presente no material in natura, pode se estimar que cerca de 29,93% dessa lignina foi recuperada durante o processo. Assumindo-se que cerca de 22,86% foi perdida durante o pré-tratamento, e cerca de 85,46% do restante foi solubilizada no licor negro, obtém-se um rendimento teórico de 65,85%, e pode se estimar que cerca de 45,45% da lignina presente teoricamente no licor foi recuperada. O rendimento teórico obtido para a palha é similar ao obtido para o bagaço (64,48%), no entanto, o rendimento experimental foi inferior em cerca de 7,5%.

5.1.4 Análises de Infravermelho da palha de cana-de-açúcar

No espectro de palha de cana in natura é possível observar bandas de absorção nas seguintes regiões: 3433, 2920, 2850, 1732, 1634, 1606, 1539, 1515, 1464, 1428, 1386, 1321, 1254, ombro em 1209, 1165, 1099, 1064, 1032, 903, 842, 663, 607 cm^{-1} e pequenas bandas não muito definidas na região que vai de 800 a 400 cm^{-1} (Figura 25). Esse espectro apresenta bandas de absorção em regiões semelhantes ao observado para o bagaço in natura.

Durante as etapas de pré-tratamento e extração com soda da palha de cana é possível verificar grande alteração nas regiões entre 1732 a 1254 cm^{-1} . Os picos de absorbância associado com C=O variaram de aproximadamente 1732 a 1711 cm^{-1} , apresentando uma absorção bastante

inferior após o pré-tratamento e ausente após o tratamento com soda, podendo estar relacionado a degradação de hemicelulose e também de lignina. Na região correspondente ao estiramento C=O de carbonilas conjugadas em $1634\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ houve uma diminuição progressiva das bandas após os tratamentos, sendo o mesmo observado na região de $1605\text{-}1619\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de C=C aromático. As bandas nessa região também se tornaram menos definidas após os tratamentos sofrido pela biomassa. A banda em $1539\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ desaparece após o pré-tratamento, e aparece como um pequeno ombro no espectro de lignina deslignificada. Na região típica de ligação C=C aromática associada à lignina ($1515\text{-}1509\text{ cm}^{-1}$) a banda praticamente desaparece após o tratamento alcalino, indicando grande remoção da lignina.

Figura 25 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de palha de cana-de-açúcar. Os espectros não foram normalizados. Os números de bandas assinalados na região ampliada ($1400\text{ a }1800\text{ cm}^{-1}$) se referem à Tabela 11.

Fonte: Arquivo pessoal.

É possível verificar, de maneira geral, que as bandas na região de $1464\text{ e }1037\text{ cm}^{-1}$ diminuem bastante no espectro de bagaço de cana deslignificado, inclusive com desaparecimento das bandas de $1464\text{ e }1254\text{ cm}^{-1}$, semelhante ao ocorrido no bagaço de cana. A banda em 1037 cm^{-1} relacionada a contribuição de hemiceluloses com resíduos de arabinose, aparece presente em todos os espectros, mas em menor intensidade após a deslignificação.

As bandas de absorção em $1097\text{ e }895\text{ cm}^{-1}$ podem ser monitoradas a fim de investigar a proporção de celulose cristalina e amorfa, respectivamente (CORREDOR, 2008). Nesse caso, a banda a 1104 cm^{-1} está bem definida após o tratamento alcalino, indicando a exposição de celulose; se ausente implica degradação da celulose. A banda amorfa (895 cm^{-1}), por outro lado,

diminui progressivamente após os tratamento, mas não desapareceu, indicando certa degradação da celulose amorfa.

Comparando as absorvâncias de algumas bandas que fornecem importantes informações relacionadas à lignina (Tabela 11), é possível verificar que após a extração com soda essas bandas diminuíram bastante ou mesmo desapareceram, conforme discutido anteriormente. Após o pré-tratamento é possível ver diminuição nas bandas de 1711, 1635 e 1605 cm^{-1} , possivelmente devido a degradação da hemicelulose.

A lignina obtida após as etapas de pré-tratamento e deslignificação foi posteriormente caracterizada e utilizada nas reações de oxidação.

Tabela 11 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de palha de cana-de-açúcar durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorvância (A) e absorvância relativa (%A).

Número no gráfico	Palha de cana-de-açúcar in natura			Palha de cana-de-açúcar pré-tratada			Palha de cana-de-açúcar deslignificada		
	cm^{-1}	A	% A	cm^{-1}	A	% A	cm^{-1}	A	% A
1	1732	0,73	48,9	1711	0,55	36,3	—	—	—
2	1634	0,85	56,4	1635	0,56	37,7	1639	0,46	30,7
3	1606	0,88	58,9	1605	0,64	42,5	1619	0,44	29,0
4	1539	0,45	29,9	—	—	—	1540	0,22	14,4
5	1515	0,68	45,6	1515	0,71	47,3	1509	0,24	15,9

Valores relativos das bandas de absorvância (%A) foram medidos admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

5.1.5 Caracterização química da casca de café

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos para a caracterização química da casca de café e os desvios médios de cada componente. A metodologia utilizada para realizar a caracterização química de bagaço de cana e de palha foi também utilizada para determinação da composição química da casca de café. Os resultados obtidos para a casca in natura estavam gerando um balanço total em torno de 73,33%. Tentou-se adaptar a metodologia alterando o tempo de hidrólise que inicialmente era de 7 min (item 4.5.1), acreditando que o tempo não suficiente para atacar a estrutura polissacarídica da casca, testando-se então tempos de 5, 10, 15 e 20 min. Os resultados apresentados na Tabela 12 para a casca de café in natura foram provenientes de uma reação de hidrólise de 10 min, a qual apresentou o melhor balanço total (85,74%). No entanto, esta metodologia deve ser estudada mais profundamente em trabalhos

futuros para melhor se adequar à essa biomassa. Nas cascas de café pré-tratada e deslignificada foi utilizada a mesma metodologia aplicada ao bagaço e a palha de cana, com 7 min de hidrólise.

Conforme observado anteriormente para o bagaço e a palha de cana, a determinação de extrativos foi somente realizada para o material in natura, pois acredita-se que estas substâncias sejam removidas durante o pré-tratamento.

Tabela 12 – Composição química da casca de café in natura, da pré-tratada e da deslignificada.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Total (%)
Casca de café in natura	26,54 ± 0,43	25,48 ± 0,42	33,52 ± 0,00	0,20 ± 0,02	6,67 ± 0,55	85,74
Casca de café pré-tratado*	37,25 ± 0,62	10,13 ± 0,16	51,01 ± 0,43	0,48 ± 0,02		98,87
Casca de café deslignificado**	66,39 ± 0,30	7,90 ± 0,63	24,33 ± 0,40	0,89 ± 0,03		99,64

* Rendimento mássico da etapa de pré-tratamento: 58,85%. ** Rendimento mássico da etapa de deslignificação: 35,23%.

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que a casca de café in natura possui um percentual de lignina maior em relação ao determinado para bagaço e palha, e ainda em relação à essas biomassas, um percentual de celulose menor. Contudo, esse valores apresentados para casca de café in natura estão próximo aos encontrados para resíduos agroindustriais e madeiras, podendo representar uma fonte potencial para obtenção de lignina e demais componentes da biomassa.

Tabela 13 – Composição química da casca de café in natura de acordo com o determinado por outros autores.

Amostras de casca de café	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
Sem tratamento	43,0	7,0	9,0	3,0 – 7,0	Franca e Oliveira, (2009)
Sem tratamento	43,0	22,8	9,0		Navya e Murthy, (2012)
Sem tratamento	23,1	23,9	28,3	0,7	Ferraz e Silva, (2009)
Sem tratamento	16,0	11,0	9,0	5,4	Gouvea et al., (2009)

A Tabela 13 apresenta a composição química da casca de café in natura observada por outros autores. Verifica-se, de uma maneira geral, um balanço total bastante inferior a 100%, indicando que as técnicas de caracterização química utilizadas não foram adequadas, o que torna

difícil a comparação entre os resultados. Existe uma grande discrepância nos valores encontrados pelos autores, o que pode estar associado às características do próprio material (estágio de maturação, idade da planta, clima e outras) ou ainda devido a presença de outros compostos fenólicos poliméricos que não foram extraídos e foram precipitados e quantificados como lignina no procedimento de caracterização química. Segundo a EMBRAPA (2011), a casca de café contém teores de lignina em torno de 36%, presença de cafeína (0,4 a 1,5%), taninos (1,6 a 2,9%) e compostos fenólicos (0,6%). Portanto, de acordo com esses valores, mesmo quantificando como lignina outros compostos fenólicos que poderiam estar presentes na casca, o teor de lignina ainda assim deveria ser elevado.

Figura 26 – Distribuição dos componentes da casca de café in natura (1), da pré-tratado (2) e da deslignificado (3) após hidrólise para determinação da composição química. Os compostos agrupados como (A) representam a fração de hemicelulose, (B) a fração de celulose e (C) a fração de lignina.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 26 apresenta a distribuição dos componentes nas frações de celulose, hemicelulose e lignina após a hidrólise da casca de café para a determinação da composição química do material in natura, pré-tratado e deslignificado. É possível verificar a presença principalmente de xilose na fração hemicelulósica do material in natura após a hidrólise, mas observa-se também um teor de arabinose mais elevado ao se comparar com o bagaço e a palha. Em termos de lignina, verifica-se que existe uma maior fração de lignina insolúvel na biomassa in natura. A fração solúvel foi perdida em menores proporções durante ambas etapas, enquanto a fração insolúvel foi removida em maior intensidade durante a deslignificação, comportamento este semelhante ao observado para o bagaço e para a palha de cana.

Figura 27 – Casca de café moída: in natura (A), pré-tratada com ácido diluído (B), e deslignificada (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Comportamento semelhante ao bagaço e a palha foram observados para a casca de café em relação a alteração de cor e forma do material durante os pré-tratamentos (Figura 27), conforme discutido anteriormente.

A casca de café foi pré-tratada nas mesmas condições já descritas para o bagaço e para palha. Após o pré-tratamento, o material recolhido foi lavado com água até a total remoção dos açúcares hidrolisados (hemicelulose). Ao término da reação de deslignificação alcalina, a fração celulósica foi lavada até a água de lavagem não apresentar coloração amarelada e pH próximo da neutralidade. O licor negro foi armazenado para precipitação e obtenção da lignina.

O rendimento obtido na etapa de pré-tratamento foi de 58,85%. A análise da composição química da casca in natura, pré-tratada e deslignificada, juntamente com o rendimento, reportados na Tabela 12, nos permite determinar a porcentagem de remoção de cada componente durante essas etapas. Esses resultados estão dispostos na Figura 28, e nos revelam que o componente que sofreu maior perda foi a hemicelulose, cerca de 76,60%, devido a sua estrutura morfológica mais amorfa e menos cristalina quando comparada à celulose, conforme descrito anteriormente para o bagaço e para palha, que apesar de serem materiais diferentes apresentam da mesma forma uma estrutura morfológica típica de materiais lignocelulósicos. Com relação a celulose foi observada uma perda de 17,39%, provavelmente sendo grande parte de celulose amorfa ou de baixa cristalinidade. Além disso, também houve uma pequena perda de lignina durante o pré-tratamento, em torno de 10,43%. A lignina é pouco removida durante o pré-tratamento com ácido diluído pois podem sofrer reações de condensação em condições ácidas.

Em relação a etapa de deslignificação, o rendimento foi de 35,23%. Essa biomassa foi a que apresentou o menor rendimento durante essa etapa quando comparada com o bagaço e a palha da cana. Em meio alcalino, a celulose pode sofrer hidrólise e, com isso, ocorrer reações de peeling, que promovem a quebra da cadeia polimérica, gerando unidades de açúcar com extremidades redutoras que são removidas e causam essa perda de açúcares (BERGGREN et al.,

2003; KNILL; KENNEDY, 2003). Provavelmente a temperatura utilizada nessa etapa promoveu uma maior quebra da celulose que já estava com a estrutura mais susceptível a reagentes após o pré-tratamento, ocorrendo reações de peeling. Essa maior perda pode também ser um indicativo de diferenças na cristalinidade e estrutura, possivelmente essa biomassa contém mais regiões amorfas, por isso foi mais hidrolisada do que as demais biomassas estudadas. Durante a deslignificação, grande parte de hemicelulose (72,52%) ainda presente na polpa também foi solubilizada (Figura 28). No entanto, a condição utilizada nos permitiu solubilizar 83,20% da lignina presente na biomassa após as duas etapas avaliadas. Para nosso objetivo de obtenção de lignina essa condição foi satisfatória, pois possibilitou uma rápida remoção de grande parte da lignina, mas por outro lado, num conceito de biorrefinaria, essa perda de celulose seria inviável.

Figura 28 – Remoção dos componentes, a partir da fração sólida, em cada etapa do processo de obtenção de lignina de casca de café (1: pré-tratamento; 2: deslignificação; 3: perda global referente aos 2 tratamentos).

Fonte: Arquivo pessoal.

Avaliando essas perdas em âmbito geral, verifica-se que quase metade da celulose (48,14%) foi perdida, fato que seria indesejável visando a utilização da biomassa por um todo; para hemicelulose foi observada uma perda de 93,57% ao longo do processo, ocorrida principalmente na etapa de pré-tratamento. A perda de lignina foi observada ao longo do processo, mas sua maior remoção foi durante a extração alcalina (83,20%), fator esse favorável quando se deseja um alto rendimento de lignina.

Levando-se em consideração o rendimento obtido em cada etapa de tratamento utilizado, e os teores percentuais de lignina, solúvel e insolúvel, obtidos por meio da caracterização química, foi obtida a relação lignina solúvel/insolúvel para casca de café, a qual está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel para a casca de café.

Amostra	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Rendimento da etapa (%)	Lignina solúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Lignina insolúvel corrigida pelo rendimento da etapa (%)	Relação lignina solúvel/insolúvel
Casca de café in natura	9,76	23,75	100	9,76	23,75	0,41
Casca de café pré-tratada	6,69	44,32	58,85	3,94	26,08	0,15
Casca de café deslignificada	7,00	17,33	35,23	2,47	6,11	0,40

Observando-se os dados apresentados na Tabela 14, pôde-se verificar que durante o pré-tratamento somente a fração solúvel da lignina foi removida, ocorrendo uma grande remoção de lignina insolúvel durante a deslignificação.

Em termos de rendimento experimental de lignina obtida ao final das etapas de pré-tratamento e deslignificação da casca de café in natura, verifica-se que para cada 1 g de casca de café in natura obteve-se 0,096 g de lignina, portanto, partindo do percentual de lignina inicialmente presente no material in natura, pode-se estimar que cerca de 28,64% dessa lignina foi recuperada durante o processo. Assumindo-se que cerca de 10,43% foi perdida durante o pré-tratamento, e cerca de 83,20% do restante foi solubilizada no licor negro, obtém-se um rendimento teórico de 74,46%, e pode-se estimar que cerca de 38,40% da lignina teoricamente presente no licor foi recuperada. Apesar do maior rendimento teórico observado para essa biomassa ao se comparar com o bagaço e a palha de cana (64,48% e 65,85%, respectivamente), o rendimento experimental foi o menor entre as biomassas avaliadas.

5.1.6 Análise de Infravermelho da casca de café

A Figura 29 apresenta os espectros de infravermelho da casca de café durante as etapas de obtenção de lignina.

Avaliando-se o espectro de casca de café in natura é possível observar diversas bandas na região correspondente às hidroxilas (3557, 3480, 3411, ombro em 3272, 3241 cm^{-1}), bandas em 2930, pequeno ombro em 2849, 1734, 1639, 1617, 1516, ombro em 1448, 1432, 1373, 1320, 1261, 1165, 1113, 1058, 1038, 534 e 486 cm^{-1} . Esse espectro apresenta bandas de absorção mais intensas, porém, em regiões semelhantes ao observado para o bagaço e palha in natura, exceto pela região correspondente a O-H.

Figura 29 – Espectros no infravermelho obtidos durante as etapas de obtenção de lignina de casca de café. Os números de bandas assinalados na região ampliada (1400 a 1800 cm^{-1}) se referem à Tabela 15.

Fonte: Arquivo pessoal.

Durante as etapas de pré-tratamento e extração com soda é possível verificar grande alteração da absorção nas regiões entre 1734 a 837 cm^{-1} , com diminuição ou até desaparecimento de determinadas bandas, exceto pela banda de 899 cm^{-1} que apresentou um aumento progressivo após os tratamentos. Os picos de absorbância associados com C=O variaram de aproximadamente 1741 a 1734 cm^{-1} , apresentando uma absorção bastante inferior após o pré-tratamento e ausente após o tratamento com soda, podendo estar relacionado à degradação de hemicelulose e de certa lignina. Na região correspondente ao estiramento C=O de carbonilas conjugadas em 1651-1629 cm^{-1} houve uma diminuição progressiva das bandas após os tratamentos, com picos pouco definidos, sendo o mesmo observado na região de 1617-1606 cm^{-1} correspondente ao estiramento de C=C aromático. As bandas nessa região também se tornaram menos definidas após os tratamentos sofridos pela biomassa. Pequena banda em 1541-1538 cm^{-1} aparece após o pré-tratamento e a deslignificação. Na região típica de ligação C=C aromática associada à lignina (1518-1510 cm^{-1}) é possível verificar uma queda de cerca de 35% na absorção após o tratamento alcalino, indicando remoção de lignina.

As bandas na região de 1448 e 1038 cm^{-1} diminuem no espectro de casca de café deslignificado, principalmente nas bandas de 1448 e de 1261 cm^{-1} , que desapareceram e deram lugar a picos em 1271, 1240 e 1209 cm^{-1} . A banda em 1038 cm^{-1} relacionada à contribuição de hemiceluloses com resíduos de arabinose, aparece presente em todos os espectros, mas em menor intensidade após os tratamentos.

Comparando as absorbâncias e absorbâncias relativas de algumas bandas que fornecem importantes informações relacionadas à lignina e à hemicelulose (Tabela 15), é possível verificar

que após o pré-tratamento ocorre diminuição nas bandas de 1741 e 1651 cm^{-1} , relacionadas principalmente com a degradação de hemicelulose, e após a deslignificação alcalina, essas bandas diminuíram bastante ou mesmo desapareceram, indicando principalmente a remoção de lignina.

Tabela 15 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de casca de café durante as etapas de obtenção da lignina (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	Casca de café in natura			Casca de café pré-tratada			Casca de café deslignificada		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
1	1734	0,99	65,8	1741	0,68	45,3	—	—	—
2	1639	1,36	90,5	1651	1,02	67,8	1629	0,63	41,9
3	1617	1,44	96,0	—	—	—	1606	0,68	45,2
4	—	—	—	1538	0,61	40,9	1541	0,45	30,1
5	1516	0,76	50,5	1518	0,65	43,4	1510	0,49	32,6

Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

As ligninas obtidas após as etapas de pré-tratamento e deslignificação foram posteriormente caracterizadas e utilizadas nas reações de oxidação.

5.1.7 Análise de Infravermelho das biomassas in natura

A Figura 30 apresenta os espectros de infravermelho do bagaço, da palha de cana e casca de café na forma in natura.

Figura 30 – Espectros no infravermelho das biomassas in natura (bagaço e palha de cana, e casca de café). Para uma análise semi-quantitativa, os espectros foram normalizados pela região de 3401-3418 cm^{-1} , conforme sugerido por Sgriccia et al. (2008).

Fonte: Arquivo pessoal.

Fundamentalmente, tratamentos ácidos e alcalinos são utilizados para remover a hemicelulose e a lignina e as mudanças espectrais muitas vezes envolvem a variação na intensidade da banda. Neste estudo pode-se observar o desaparecimento de bandas típicas de hemicelulose e lignina nas regiões de 1710, 1515, 1265 e 1160 cm^{-1} . No entanto, em algumas regiões do espectro de bagaço de cana tratado com ácido diluído e com álcali, as bandas são inversamente melhoradas. Isso sugere que os aumentos ocorrem como resultado de acumulação de lignina e polissacarídeos degradados e condensados, que transforma a estrutura de rede tridimensional original para uma estrutura linear (HE et al., 2009). Samuel et al. (2011), e Kristensen et al. (2008) relataram comportamento semelhante. As mudanças observadas sugerem que biomassas diferentes são susceptíveis aos tratamentos em graus variados.

As bandas de absorção na região de 1165 e 1319 cm^{-1} , características de hemiceluloses e celulose (SIM et al., 2012), são relativamente mais abundantes no bagaço, seguido pela palha de cana e pela casca de café, sugerindo que o bagaço é mais rico em constituintes celulósicos e hemicelulósicos. Já a banda em 1510 cm^{-1} característica de lignina (SIM et al., 2012) sugere a casca de café como a biomassa mais rica em lignina, seguida pela palha e pelo bagaço de cana. Essas observações corroboram com os valores encontrados na análise composicional realizada.

5.2 Avaliações das ligninas obtidas

5.2.1 Caracterização química das ligninas

O material precipitado do licor negro após o pré-tratamento e a deslignificação do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, e da casca de café foram caracterizados conforme descrito no item 4.5.2, e foram denominados como lignina. Os resultados da caracterização química dessas ligninas estão apresentados na Tabela 16. Essa etapa de análise do trabalho foi realizada no Laboratório de Bioprodutos, Ciências e Engenharia (BSEL – Bioproducts, Sciences and Engineering Laboratory) da Universidade do Estado de Washington (WSU – Washington State University), nos EUA. A metodologia utilizada neste laboratório segue as normas da NREL (National Renewable Energy Laboratory), no entanto, o método desenvolvido por Rocha et al. (1997) e utilizado neste trabalho para caracterizar quimicamente as biomassas (item 4.5.1) baseia-se nos mesmos princípios, podendo se destacar algumas variações referentes a gama de compostos que compõem a fração celulósica e hemicelulósica (conforme pode se observar na Figura 31) e a forma de cálculo dos extrativos, uma vez que o método desenvolvido por Rocha et al. (1997) a realiza pela diferença de peso seco da biomassa antes e após a extração com etanol, e o método da NREL determina o peso do material extraído no etanol, após evaporação do etanol em rotaevaporador. Canilha et al.

(2011) determinaram a composição química de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar utilizando ambas metodologias e encontraram valores muito próximos, sendo que a quantificação de extrativos foi a que apresentou um maior desvio entre os métodos (0,42%). Portanto, os resultados obtidos seguem metodologia equivalente e podem ser comparáveis.

Tabela 16 – Composição química das ligninas obtidas a partir do bagaço e da palha de cana-de-açúcar e da casca de café após a etapa de deslignificação.

Amostra de Lignina	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Total (%)
Bagaço de cana	2,58 ± 0,18	0,78 ± 0,48	94,27 ± 0,62	1,23 ± 0,01	0,00	98,86
Palha de cana	3,55 ± 0,08	0,9 ± 0,46	93,55 ± 0,86	1,2 ± 0,06	0,00	99,19
Casca de café	1,95 ± 0,09	0,36 ± 0,09	91,62 ± 0,61	0,85 ± 0,07	6,10	94,78

Verifica-se que em torno de 91 – 94% da biomassa precipitada do licor negro é composta por lignina, sendo a lignina de bagaço a mais pura. Uma pequena porcentagem desses materiais são constituídos por cinzas e também por açúcares, exceto a lignina de casca de café que apresentou um alto teor de extrativos. Na casca de café in natura foi observado cerca de 6,67% de extrativos, que não foram totalmente removidos após o pré-tratamento e a deslignificação. Foi também realizada a determinação do teor de extrativos na lignina e na polpa celulósica da casca de café de acordo com o método desenvolvido por Rocha et al. (1997) e encontraram-se valores de 5,18% e de 1,38%, respectivamente, indicando que grande parte dos extrativos presentes na casca de café não foram removidos com o tratamento utilizando ácido diluído, mas sim quando utilizado NaOH, ficando depositado junto a lignina. Isso demonstra como a composição química da casca de café se difere da composição do bagaço e da palha de cana por exemplo, e também evidencia como os pré-tratamentos exercem efeitos diferentes em biomassas diferentes, tornando-se necessário estudos mais aprofundados sobre a estrutura de cada biomassa para se definir o tratamento mais efetivo.

Tabela 17 – Relação entre lignina solúvel e insolúvel.

Amostra	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	Relação lignina solúvel/insolúvel
Lignina de bagaço de cana	4,32 ± 0,56	89,95 ± 1,18	0,05
Lignina de palha de cana	5,48 ± 0,18	88,07 ± 1,04	0,06
Lignina de casca de café	1,43 ± 0,36	90,18 ± 0,25	0,02

De acordo com a relação lignina solúvel/insolúvel apresentada na Tabela 17, pode-se verificar como essa razão é bastante inferior na lignina de casca de café, indicando que essa lignina seria menos susceptível a solubilização em meio ácido em etapas posteriores. Os valores de lignina solúvel e insolúvel não possuem relação direta com a massa molar da lignina, porém fornecem uma dimensão da modificação sofrida por ela e têm sido utilizados como marcadores dessa modificação.

5.2.2 Análises de Ultravioleta (UV) das ligninas

A espectroscopia de ultravioleta é um dos métodos mais apropriados para a análise quantitativa e qualitativa de lignina em solução. Devido a sua estrutura aromática, a lignina absorve fortemente a luz ultravioleta e apresenta absorção máxima na região entre 200 e 380 nm. O local e a intensidade de absorção máxima vai depender do tipo de lignina, de suas modificações químicas e do solvente usado para realizar as medidas fotométricas (LIN; DENCE, 1992). Por exemplo, o espectro de madeiras mole (tipo G) consiste de uma absorção máxima a 280 nm, um ombro em 230 nm, e uma pico forte em 200-210 nm, enquanto para lignina de madeira dura (tipo GS), a absorção ocorre em comprimento de onda menor, 268-277 nm (LIN; DENCE, 1992).

Os espectros de UV e as curvas de calibração utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana, palha de cana e casca de café estão apresentados na Figura 31. É possível observar que as amostras de bagaço, palha de cana e casca de café exibiram um espectro no ultravioleta típico de lignina, com absorção máxima entre 275 - 285 nm, região correspondente a grupos fenólicos não conjugados (anel aromático) (SCALBERT et al., 1986). O comprimento de onda de máxima absorção nesta região para o bagaço de cana foi em 285 nm, levemente superior à da palha (pico em 283 nm), e ambas superiores a casca de café (pico em 275 nm). O pico de máxima absorção típico de ligninas geralmente ocorre a 280 nm, e correspondente à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel aromático. Esse deslocamento batocrômico observado pode ser um indicativo de que as ligninas de bagaço e de palha de cana apresentam mais unidades do tipo G, enquanto a lignina de casca de café apresenta mais unidades do tipo S, uma vez que ligninas do tipo S apresentam máximos de absorção na região de 268 – 277 nm, enquanto ligninas do tipo G apresentam máximos de absorção em valores maiores que 280 (LIN; DENCE, 1992; XU et al., 2007; MOROHOSHI, 1991). Pequenas diferenças no comprimento máximo de absorção podem estar também associadas a presença de contaminantes na amostra e não à proporção de unidades H, G e S.

Figura 31 – (A) Espectro de UV das soluções 0,025M de lignina de bagaço e palha de cana-de-açúcar e casca de café; (B) Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das soluções de lignina avaliadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 18 – Parâmetros obtidos a partir das curvas de calibração das amostras de lignina usando a lei de Lambert-Beer. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Amostra	Coefficiente Linear	Coefficiente de extinção ($L \cdot g^{-1}$)	R^2 médio
$Y = a + b \cdot X$			
Lignina de bagaço de cana	0,0009	$23,18 \pm 0,34^a$	0,9991
Lignina de palha de cana	0,0014	$23,67 \pm 0,38^a$	0,9999
Lignina de casca de café	0,0023	$21,18 \pm 1,01^a$	0,9995

As absorvidades a 280 nm (em $L \cdot g^{-1}$) das amostras de lignina apresentadas na Figura 31 (B) e na Tabela 18, foram calculadas a partir da leitura da absorbância de sucessivas diluições da lignina e da medida da respectiva absorbância no espectro de UV a 280 nm. É possível verificar que houve um bom ajuste das curvas, validando a lei de Lambert-Beer. Neste trabalho obteve-se absorvidade de $23,18 L \cdot g^{-1}$ para a lignina de bagaço, o que está um pouco acima do valor de $20,45 L \cdot g^{-1}$ encontrado por Maziero et al. (2012) para lignina de bagaço de cana obtido por método semelhante ao usado neste trabalho. A absorvidade da lignina obtida a partir da palha de cana foi de $23,67 L \cdot g^{-1}$, valor este próximo ao observado para o bagaço e semelhante ao observado por Gambarato (2014) em estudo utilizando palha de cana proveniente de polpação soda (NaOH 1% m/v) por 45 min, que foi de $22,05 L \cdot g^{-1}$ e inferior ao observado após polpação soda por 60 min, que foi de $20,71 L \cdot g^{-1}$. Essa diferença pode estar associada ao grau de condensação e substituição dessas ligninas. De acordo com Nascimento (2007), anéis substituídos devem aumentar a absorvidade em 280 nm. A absorvidade da lignina de casca de café foi de

21,18 L.g⁻¹, sendo em torno de 8,63 e 10,52% menor do que a absorptividade obtida para bagaço e palha de cana, respectivamente. Dados referente a absorptividade de lignina extraída da casca de café não foram encontrados na literatura.

5.2.3 Análises de Infravermelho (FTIR) das ligninas

Os espectros de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das ligninas de bagaço e palha de cana e da casca de café obtidas após pré-tratamento com ácido diluído e extração com soda, lavadas até pH 5,0 e secas a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) são apresentados na Figura 32. Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 19, a qual foi formulada baseando-se em trabalho desenvolvido por Faix (1994), onde foram analisadas e determinadas as principais regiões de absorção no espectro de infravermelho de ligninas do tipo G, GS e HGS (Tabela 20).

Figura 32 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (região de 4000 a 400 cm⁻¹). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 19.

Fonte: Arquivo pessoal.

As ligninas apresentaram bandas típicas de espectro de lignina, exibindo grupos funcionais esperados, com absorções na região de 2940 – 2840 cm⁻¹, decorrentes do estiramento C-H em metoxilas aromáticas e em grupos metil e metileno de cadeias laterais, banda de absorção média em 1700 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de carbonilas e carboxilas não conjugadas. Na região dos aromáticos é possível verificar bandas na região de 1600, 1510 e 1424 cm⁻¹,

relacionadas às vibrações do anel aromático e a deformação C-H combinada com a vibração do anel aromático a 1460 cm^{-1} . A região espectral abaixo de 1460 cm^{-1} é mais difícil de analisar, uma vez que as bandas são complexas, estando associadas às vibrações de diferentes estruturas (FAIX, 1994). Nesta região podemos observar uma maior distinção ao comparar os espectros de bagaço e palha de cana com o espectro de casca de café devido a ausência de determinadas bandas, conforme pode ser observado na Tabela 19.

Tabela 19 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço, palha de cana-de-açúcar e casca de café (cm^{-1}), seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

* Faixa de número de onda (cm^{-1})	Número no gráfico	Lignina de bagaço de cana-de-açúcar			Lignina de palha de cana-de-açúcar			Lignina de casca de café		
		cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
3460-3412	1	3416	0,99	83,76	3417	0,96	90,62	3384	1,39	87,94
3000-2842	2	2935	0,70	58,85	2919	0,92	87,30	2921	1,58	100,00
	3	2849	0,51	43,40	2850	0,72	67,92	2851	1,15	73,06
1738-1709	4	1697	0,62	52,02	1704	0,80	75,92	1703	1,24	78,80
	5	1633	0,66	56,07	1633	0,76	71,67	—	—	—
1605-1593	6	1598	0,92	77,88	1602	0,88	83,09	1627	1,42	89,81
1515-1505	7	1513	1,00	84,36	1513	1,00	94,39	1516	1,00	63,35
1470-1460	8	1463	0,94	79,58	1463	0,87	82,16	1455	1,02	64,91
1430-1422	9	1424	0,80	67,25	1424	0,77	72,46	—	—	—
1370-1365	10	1380	0,61	51,85	1373	0,63	59,58	1377	0,95	60,18
1330-1325	11	1328	0,76	64,11	1328	0,70	66,01	—	—	—
1270-1262	12	1264	0,91	76,56	1267	1,00	94,35	1275	1,12	71,03
1230-1220	13	1222	1,11	93,22	1219	1,06	100,00	1223	1,12	70,87
1140	14	1138	0,77	65,13	1141	0,78	73,78	—	—	—
1128-1125	15	1124	1,19	100,00	1124	0,95	89,72	1119	0,79	50,13
1035-1030	16	1031	0,68	57,73	1031	0,71	67,00	1060	0,56	35,45
925-915	17	907	0,20	16,84	927	0,22	20,41	882	0,22	13,62
835-834	18	835	0,30	25,52	833	0,26	25,01	—	—	—
832-817	19	—	—	—	—	—	—	817	0,23	14,59

*Faixa de número de onda baseado em tabela desenvolvida por Faix (1994). Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos a partir da linha base de espectro normalizado em $1505\text{-}1516\text{ cm}^{-1}$, admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

A análise do espectro de lignina de bagaço indica a presença de grupos carboxilas e carbonilas relacionados principalmente à ácidos carboxílicos devido a absorção observada em 1697 cm^{-1} juntamente com um pico pronunciado de absorção em 3416 cm^{-1} correspondente a hidroxilas ligadas na cadeia. Esse deslocamento da banda de carbonila pode indicar que esta se encontra conjugada a uma ligação dupla ou a um anel aromático, o que faz sentido quando observamos as bandas de absorção em 1633 , 1598 , 1513 e 1424 cm^{-1} correspondentes a região

de vibração do esqueleto aromático típica de ligninas. A banda a 1633 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de carbonila conjugada ao anel aromático (VAZQUEZ et al., 1997). Tais bandas são típicas de ligninas e são mais pronunciadas em ligninas de gramíneas, uma vez que essas apresentam um número maior de carbonilas em relação às ligninas de madeiras, devido, principalmente, à ocorrência dos complexos lignina-carboidrato (BURANOV; MAZZA, 2008). Na região dos hidrocarbonetos é possível observar dois picos de intensidade média em 2935 e 2849 cm^{-1} , que correspondem a grupos metílicos, e que também pode estar relacionado a presença das bandas de 1466 e 1380 cm^{-1} típica de grupos metil, e indiretamente pelas bandas de 1328 cm^{-1} correspondentes a anéis S (siringil) e G (guaiacil) condensados. Um pequeno ombro em 1264 cm^{-1} correspondente a vibrações do anel G, e a intensa banda em 1124 cm^{-1} e pequena banda em 1138 cm^{-1} que indicam deformação de CH aromático no plano para os tipos S e G, respectivamente. Esse intenso pico de absorção observado em 1124 cm^{-1} de lignina tipo S pode também indicar a presença de ligações do tipo éter na molécula de lignina. Singh et al. (2005) em estudo realizado utilizando lignina de bagaço de cana-de-açúcar observaram por meio de análise de infravermelho a presença dos tipos siringil e guaiacil, conforme observado neste trabalho. A presença das unidades siringil e guaiacil são importantes nesse trabalho, pois durante o processo de oxidação elas serão as precursoras da vanilina e do siringaldeído, respectivamente, sendo que para lignina de bagaço foi observado maior proporção de unidades tipo S.

O espectro de lignina de palha de cana apresentou bandas semelhantes às observadas no espectro de lignina de bagaço de cana, no entanto, a intensidade de absorção de determinadas bandas variou. Observa-se uma maior intensidade das bandas de 2919 e 1850 cm^{-1} juntamente com um aumento da banda de 1633 cm^{-1} , o que pode indicar a presença de grupos metilênicos. A banda relacionada ao estiramento de carbonilas e carboxilas em 1704 cm^{-1} apresentou uma maior absorção quando comparada a lignina de bagaço, apresentando uma porcentagem de absorbância relativa A(%) de 75,92%. Esse maior número de grupos carboxilas e carbonilas na molécula poderia ser um indicativo de que esta lignina esteja menos condensada em relação a lignina de bagaço, o que a tornaria mais reativa, entretanto, esta análise por si só não é suficiente para confirmar essa hipótese. A banda em 1124 cm^{-1} relacionada à deformação de CH aromático no plano para os tipos S apresentou uma menor absorção quando comparada as bandas relacionadas as unidade do tipo G (1267 e 1141 cm^{-1}), mas essa variação foi moderada.

Tabela 20 – Principais regiões de absorção no espectro de infravermelho de ligninas do tipo G, GS e HGS de acordo com Faix (1994).

Faixa de número de onda (cm^{-1})	Atribuições e comentários
3412 - 3460	Estiramento O-H
2842 - 3000	Estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos
1709 - 1738	Estiramento C=O em cetonas não conjugadas, carbonilas e grupos éster (frequentemente originários de açúcares); aldeídos conjugados e ácidos carboxílicos absorvem por volta e abaixo de 1700 cm^{-1} .
1655 - 1675 *	Estiramento C=O de arilcetonas em sistemas conjugados <i>p</i> -substituídos; substituintes de eletronegatividade maior abaixará o número de onda de absorção
1593 - 1605	Vibrações do esqueleto aromático influenciada por estiramento C=O; S > G; G condensado > G esterificado
1505 - 1515	Vibrações do esqueleto aromático; G > S
1460 - 1470	Deformações assimétricas C-H em -CH ₃ e -CH ₂ -
1422 - 1430	Vibrações do esqueleto aromático combinados com deformação C-H no plano
1365 - 1370 *	Estiramento de C-H alifático em CH ₃ , mas não em OCH ₃
1325 - 1330	Anéis S e G condensados (anéis G substituídos na posição 5)
1266 - 1270	Vibrações do anel G, influenciada por estiramento C=O
1221 - 1230	Estiramento C-C, C-O e C=O; G condensado > G esterificado
1166	Estiramento C=O em grupos éster cojugados, típico de ligninas HGS
1140	Deformação C-H aromático no plano (típico de unidades G); G condensado > G esterificado
1125 - 1128	Deformação no plano de C-H aromático (típico para unidades S) e deformação C=O de álcoois secundários
1086 *	Deformação de C-O em álcoois secundários e éteres alifáticos
1030 - 1035	Deformação no plano de C-H aromático, G > S; deformação C-O em álcoois primários, influenciada por estiramento C=O não conjugado
966 - 990	Deformação -HC=CH- fora do plano (trans)
915 - 925 *	Deformação de C-H aromático fora do plano
853 - 858 *	Deformação de C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades G
834 - 835	Deformação de C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de unidade S e em todas as posições de unidades H
817 - 832 *	Deformação de C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades G

* Bandas não detectadas para lignina HGS, típica de gramíneas.

O perfil espectral da lignina de casca de café apresentou variações em relação ao observado para o bagaço e a palha de cana, exibindo de uma maneira geral picos mais largos, de maior intensidade e com algumas bandas ausentes. As bandas em 2921 e 2851 cm^{-1} referentes ao estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos e a banda em 1703 cm^{-1} referente ao estiramento de carboxilas e carbonilas apresentaram-se mais pronunciadas e intensas. Esse aumento poderia ser um indicativo de que esta molécula apresenta mais pontas de cadeia. A banda de 1627 cm^{-1} correspondente as vibrações do esqueleto aromático influenciada por estiramento C=O encontra-se deslocada no espectro de lignina de casca de café. Este fato poderia estar relacionado à presença de polifenóis não extraídos ou mesmo uma mudança estrutural da

lignina, que não pôde ser detalhada com os dados experimentais obtidos, além de haver pouca informação na literatura sobre ligninas de outras partes de vegetais que não o caule.

Em relação a banda de 1516 cm^{-1} referente a vibrações no esqueleto aromático, foi possível observar uma menor absorbância relativa (A%) quando comparada aos espectros de bagaço e palha de cana-de-açúcar. As bandas nas regiões de 1633 , 1424 , 1328 , 1140 e 835 cm^{-1} não foram observadas nesse espectro. A ausência da banda em 1633 cm^{-1} pode ser um indicativo de que as carbonilas estejam de forma não conjugada ao anel aromático, no entanto, a banda de absorção foi deslocada à 1703 cm^{-1} . As demais bandas ausentes estão relacionadas a deformações de C-H dentro e fora do plano, podendo indicar que as deformações de C-H sejam mais influenciadas por estiramento de C=O, entretanto, essa região apresenta bandas complexas o que torna sua análise difícil.

5.2.4 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das ligninas

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta apropriada para investigação estrutural da lignina, refletindo em alta precisão nas estruturas químicas, funcionalidades, na natureza das ligações químicas e no ambiente da macromolécula (LIN; DENCE, 1992). RMN de ^1H é uma técnica frequentemente utilizada no estudo estrutural da lignina, de forma qualitativa e quantitativa (FAIX et al., 1994). Os diferentes prótons presentes na lignina acetilada podem ser usados para quantificar muitos elementos estruturais na macromolécula, tais como grupos metoxílicos, grupos aromáticos e acetatos aromáticos e alifáticos (RAMIRES et al., 2010). A Figura 33 e a Tabela 21 apresentam os espectros e as atribuições dos sinais de ^1H -RMN para as ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café.

Verifica-se, qualitativamente, que os espectros de bagaço e de palha de cana são semelhantes entre si e apresentam grandes variações quando comparados ao espectro de casca de café, principalmente na região dos aromáticos, das metoxilas e dos alifáticos não oxigenados. Numa análise semi-quantitativa, verifica-se que apesar da intensidade dos sinais no espectro do bagaço serem duas vezes maiores em relação ao espectro de palha, as porcentagens relativas na região dos aromáticos e das metoxilas são semelhantes. A lignina de bagaço apresenta uma porcentagem relativa de prótons benzílicos e prótons alifáticos bastante superior à lignina de palha, e também da casca de café, podendo ser um indicativo de que a lignina de bagaço é mais pura e foi melhor solubilizada para a medida de RMN, em relação às de palha e de casca.

Tabela 21 – Atribuições e percentagens de diferentes tipos de prótons das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, baseado na integração dos sinais de ^1H RMN. Regiões de atribuições de acordo com Chen e Robert (1988).

δ (ppm)	Atribuição	Lignina de bagaço de cana		Lignina de palha de cana		Lignina de casca de café	
		Área	%	Área	%	Área	%
9,00 - 12,00	Ácidos carboxílicos e aldeídos	0,06	0,58	0,01	0,23	0,02	1,12
6,25 - 7,90	Região dos Aromáticos	1,96	19,02	0,78	17,89	0,08	4,49
5,75 - 6,25	Prótons benzílicos não cíclicos	0,38	3,69	0,05	1,15	0,00	0,00
5,20 - 5,75	Prótons benzílicos cíclicos	0,38	3,69	0,00	0,00	0,02	1,12
3,95 - 5,20/2,50 - 3,55	Prótons alifáticos	3,32	32,22	1,03	23,62	0,37	20,79
3,55 - 3,95	Metoxilas	2,22	21,55	0,96	22,02	0,13	7,30
2,20 - 2,50	Prótons acetoxílicos aromáticos	0,39	3,75	0,16	3,67	0,03	1,87
1,60 - 2,20	Prótons acetoxílicos alifáticos	0,60	5,79	0,37	8,49	0,13	7,12
< 1,60	Região dos alifáticos não oxigenados	1,00	9,71	1,00	22,94	1,00	56,18
Soma		10,30	100,00	4,36	100,00	1,78	100,00

Figura 33 – Espectros de ^1H RMN das ligninas acetiladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (solvente: DMSO- d_6). A região de 5 a 9 ppm, que inclui a região dos aromáticos, foi ampliada para possibilitar uma melhor visualização do espectro.

Fonte: Arquivo pessoal.

A lignina de casca de café apresenta um alto percentual na região correspondente aos alifáticos oxigenados. Esse fato pode estar relacionado também a presença de contaminantes aromáticos (VELOSO et al., 1993), o que poderia ser explicado pelo alto teor de extrativos, conforme apresentado anteriormente nos dados referentes a caracterização química. Mesmo com essa alta absorção na região dos alifáticos não oxigenados subestimando a porcentagem relativa de aromáticos, pôde se observar claramente que a lignina apresenta uma pequena absorção de prótons nessa região, o que pode ser um indicativo de que a lignina de casca de café esteja mais condensada, diminuindo a sua reatividade.

Os picos de absorção de acetatos aromáticos e acetatos alifáticos, respectivamente, estão relacionados com a presença de hidroxilas aromáticas e alifáticas presentes na lignina antes da acetilação (RAMIRES et al., 2010). As áreas desses picos apresentadas na Tabela 21 foram corrigidas em relação a absorção oriunda da incorporação de prótons durante a acetilação (dividiu-se por 3). A acetilação permite a diferenciação de hidroxilas aromáticas e alifáticas (HOAREAU et al., 2004). Portanto, essa integração fornece uma razão OH alifático/OH aromático de 1,54 para lignina de bagaço, 2,31 para lignina de palha e 3,80 para lignina de casca de café, indicando que a lignina de bagaço têm mais pontas de cadeia do que as demais ligninas, que apresentam uma menor proporção de OH aromático.

Os espectros de RMN de ^{13}C podem ser utilizados para atribuir diferentes estruturas em ligninas (WEN et al., 2013), podendo ser divididos em três segmentos principais: o primeiro (200 a 165 ppm) contém sinais atribuídos a carbono de carbonilas; o segundo (165 a 100 ppm) é atribuído a carbonos aromáticos e de oleofinas; e o terceiro (100 a 10 ppm) é atribuído a átomos de carbono alifático (NIMZ et al., 1981). Dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6) é o solvente mais utilizado para lignina. Seu sinal no ^{13}C a 39,6 ppm cai num intervalo de frequência onde não se observam sinais significantes para lignina (LIN; DENCE, 1992). Quando comparado ao ^1H RMN, o ^{13}C apresenta os benefícios de apresentar uma espectro mais amplo (240-0 ppm), oferecendo melhor resolução e menor sobreposição de sinais (PU et al., 2013). Embora muitos trabalhos têm contribuído para análise quantitativa de ^{13}C RMN de lignina, alguns problemas tais como atribuições e quantificações de sinais mais precisas, são difíceis de serem resolvidos devido à sobreposição de sinais e outros fatores (WEN et al., 2013). No entanto, métodos semi-quantitativos podem ser adequados quando se deseja comparar alterações na estrutura durante certo tratamento (XIAO et al., 2011). Neste caso, a análise das áreas obtidas serão utilizadas para se comparar as ligninas obtidas após o pré-tratamento das três biomassas e fazer uma estimativa dos grupos e ligações existentes nas moléculas.

A Figura 34 e a Tabela 22 apresentam os espectros e as atribuições dos sinais de RMN ^{13}C para as ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café.

Figura 34 – Espectros de RMN de ^{13}C das ligninas acetiladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar e de casca de café (solvente: DMSO-d₆).

Fonte: Arquivo pessoal.

A maioria dos sinais observados para as 3 ligninas foram previamente observados em espectro de lignina de bagaço de cana (RAMIRES et al., 2010; MANCERA et al., 2010), de bambu (SUN et al., 2013), de palha de centeio (SUN et al., 2000a), de palha de cevada (SUN et al., 2002) e de palha de trigo (SUN et al., 2000b). Conforme esperado, as frações de lignina não apresentaram sinais típicos de polissacarídeos entre 57 e 103 ppm. O espectro de lignina de bagaço mostra dois sinais pequenos em 74,4 e 76,3 e o de palha um sinal em 73,2, que poderiam ser associados a resíduos de hemicelulose quimicamente ligados. Este comportamento foi anteriormente relatado por Sun et al. (2002) usando palha de cevada e por Scalbert et al. (1986) usando lignina de palha de trigo. Contudo, as intensidades dos picos são bastante fracas, indicando uma pequena

quantidade de polissacarídeos associados na fração de lignina, o que corresponde aos dados obtidos para caracterização composicional da lignina obtida.

Tabela 22 – Atribuições e percentagens dos sinais de RMN de ^{13}C das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café em DMSO- d_6 . Regiões de atribuições de acordo com as publicações de Ramires et al. (2010), Capanema et al. (2005) e Lin e Dence (1992).

Atribuição	Lignina de bagaço de cana			Lignina de palha de cana			Lignina de casca de café		
	δ (ppm)	Área	%	δ (ppm)	Área	%	δ (ppm)	Área	%
Ésteres, carbonilas		0,00	0,00	174,6	77,51	0,25	174,4	121,49	1,25
CO em acetila alifática	170,1	62,54	4,50	170,1	1327,36	4,36	171,9/173,2	324,52	3,34
CO em acetila aromática	168,2/169,4	120,29	8,66	168,6/169,4	2901,31	9,53	169,9	803,34	8,26
Ácido p-cumárico	115,5/124,4/143,7	19,74	1,42	115,4/124,4/143,9	371,56	1,22	123,9	311,92	3,21
Ácido Ferúlico	122	61,36	4,42	122,2	1203,98	3,96		0,00	0,00
Cem unidades S	104,3/132,7/134,6 138/151,7/152,6	269,99	19,44	103,8/132,4/135 138/139,3/152,6	1765,39	5,80	134/136	132,31	1,36
Cem unidades G	111,9/119,5/132,7 134,6/149	85,46	6,15	111,8/119,5/132,4 135/148,8/150,2 150,9	2576,665	8,47	134/149,5	334,88	3,44
Cem unidades H	128,4/129,8	75,22	5,42	128,2/129,8	1139,1	3,74	127,7/129,6	455,36	4,68
Polissacarídeos	74,4/76,3	11,81	0,85	73,2	46,66	0,15		0,00	0,00
Ligações C-C (β - β) e (β -5)	51,3	3,77	0,27	47,6/51,3/84,9	479,42	1,58	51	269,32	2,77
Ligações éter β -O-4 em (C α), (C β), (C γ)	(73,4) (79,1/80,5) (62,7/63,5)	88,52	6,37	() (79,3/80,2) (62,7/63,9)	1197,68	3,94	() (79,1) ()	196,58	2,02
OCH ₃ em unidades S e G	56	311,77	22,45	56	6460,05	21,23	55,8	194,63	2,00
CH ₃ na cadeia propílica	13,9 a 33,8	278,46	20,05	13,9 a 33,8	10885,14	35,77	13,9 a 33,8	6584,89	67,68
Soma		1388,93	100,00		30431,83	100,00		9729,24	100,00

O forte sinal a 56 ppm observado nos espectros de lignina de bagaço e palha é atribuído a presença de grupo metila em unidades do tipo siringila (S) e guaiacila (G). Esse sinal no espectro da lignina de casca de café é menos intenso, e explica a menor proporção dessas unidades quando se analisa a região dos aromáticos no espectro (103 a 160 ppm) e se compara com as demais ligninas avaliadas.

A análise quantitativa das unidades H, G e S foi realizada de acordo com o relatado por Capanema et al. (2005) e por Yang et al. (2013), e incluem os sinais apresentados na Tabela 22 atribuídos à essas unidades. O espectro das 3 ligninas é típico de lignina HGS, pois o polímero apresenta altas proporções de unidades *p*-hidroxifenil (CRESTINI; ARGYROPOULOS, 1997). A partir das integrais apresentadas na Tabela 23, as proporções relativas das estruturas fenólicas H/G/S foram calculadas, e obteve-se 1/1,14/3,59 para a lignina de bagaço, 1/2,26/1,55 para a de palha de cana e 1/0,74/0,29 para a de casca de café, o que demonstra que a lignina de bagaço

apresenta em sua estrutura mais unidades tipo S, a palha do tipo G e a casca de café do tipo H. Essa informação é importante quando se deseja oxidar um polímero e obter compostos de valor agregado, como a vanilina e o siringaldeído por exemplo, que são obtidos pela degradação de unidades G e S, respectivamente. A reatividade da lignina em processos de polpação é outro importante fator relacionado a esse parâmetro. Isso porque, conforme Gomide et al. (2005), as unidades do tipo S são as que formam menos estruturas condensadas durante o processo de polpação. Assim, ligninas com maior teor de unidades do tipo S são mais facilmente solubilizadas no licor de cozimento. Ramires et al. (2010), em avaliação de lignina de bagaço de cana obtida via processo organosolv obtiveram uma relação H/G/S de 1/0,9/1,1. Hoareau et al. (2004) obtiveram um relação 1/0,79/0,30 para lignina de bagaço de cana obtida por extração alcalina. Gambarato (2014) obteve uma relação de 1/3,22/3,68 para lignina de palha de cana obtida por acidólise branda. A lignina de bagaço obtida neste trabalho apresentou um conteúdo de unidades siringil bastante elevado, enquanto a lignina de palha apresentou um teor de unidades S inferior ao obtido por Gambarato (2014), evidenciando o efeito dos diferentes pré-tratamentos na modificação estrutural do polímero.

Sinais entre 13 e 33 ppm podem ser atribuídos a grupos metil na cadeia propílica ou a algumas impurezas alifáticas (XIAO et al., 2001). A lignina de casca de café apresentou um forte sinal nessa região, o que pode estar associado a alta porcentagem de extrativos determinado na caracterização química dessa lignina, caracterizando impurezas alifáticas que geraram um forte sinal do espectro de ^{13}C RMN, assim como no espectro de ^1H RMN.

Na região correspondente a grupos cetonas (197-203 ppm) e aldeídos (191 ppm) não foram verificados sinais. Segundo Xiao et al. (2001), grupo carbonilas normalmente encontrados em ligninas não provenientes de madeira podem estar relacionados ao sinal em 174 ppm. Segundo Sun et al. (2000a,b) este sinal pode estar relacionado a pequenas contaminações com ácido urônico que provavelmente estejam ligados à lignina por ligações éster.

A ocorrência de condensações se dá principalmente devido a ligações 5-5', β -5' e β -1' entre unidades fenilpropanóicas (GONÇALVES et al., 2000). É possível verificar que a lignina de casca de café apresentou uma maior proporção de ligações C-C, indicando que esta lignina seja mais condensada quando comparada com as ligninas de bagaço de cana, que apresentou uma menor proporção dessas ligações, e com a de palha de cana, que apresentou um valor intermediário. Esse dado está de acordo com o constatado por meio da razão OH alifático/OH aromático e porcentagem relativa de aromáticos observados no espectro de ^1H RMN para a lignina de casca de café.

Na lignina de bagaço foi possível verificar uma maior proporção de ligações β -O-4 em C α , C β e C γ . A lignina de palha de cana também apresentou uma maior proporção de ligações β -O-4

em sua estrutura, e uma proporção intermediária quando comparada as demais ligninas, com ligações em C β e C γ . A lignina de casca de café apresentou uma menor proporção dessas ligações em sua estrutura quando comparada as demais ligninas, com ligações β -O-4 apenas em C β .

Apesar do ^1H e ^{13}C 1D RMN serem ferramentas bastante eficientes para indentificação estrutural de lignina, essas técnicas de RMN 1D sofrem com problemas de sobreposição de sinais. Já técnicas mais modernas, como a espectroscopia de coerência quântica único heteronuclear ou 2D-HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy), fornecem informações estruturais de lignina com maior riqueza e menor ambiguidade (RALPH et al., 1999), e é o espectro de 2D RMN mais frequentemente coletado quando se deseja realizar não somente uma identificação estrutural, mas também uma estimativa da abundância relativa de ligações e da relação H/G/S em lignina (PU et al., 2013).

A Figura 35 e a Tabela 23 apresentam os espectros e as atribuições dos sinais de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ RMN HSQC para as ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café. As siglas utilizadas correspondem a: ligação éter β -O-4 (A), ligação C-C (B), spiro-dienona formada por ligações β -1' e α -O- α' (D), unidade siringil (S), unidade siringil oxidada com C α = O (S'), unidade guaiacil (G), unidade guaiacil oxidada com C α = O (G'), unidade *p*-hidroxifenil (H) e ácido *p*-cumárico (pCA).

Diferentemente do 1D RMN que apresenta sobreposição de sinais, o 2D RMN é uma técnica eficiente para determinação de estruturas na lignina (MOGHADDAM et al., 2014), portanto, posteriormente poderá ser comparada essa relação H/G/S obtida pelo ^{13}C RMN com os dados extraídos da análise de 2D RMN. Esses dados complementam os obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C , auxiliando ou confirmando informações obtidas anteriormente, como a relação H/G/S por exemplo.

Um dos métodos quantitativos para análise de ligninas em espectro HSQC é a utilização das unidades aromáticas como padrão interno (WEN et al., 2013). No caso de madeira mole essa quantificação é baseada no sinal de guaiacil (G₂) como padrão interno, já que a posição C₂ na unidade guaiacil nunca é substituída, e também por ser facilmente atribuível no espectro HSQC. Contudo, para madeira dura é validado a utilização além do G₂, os sinais de C₂-H para siringil (S_{2,6} e S'_{2,6}), e para gramíneas também o sinal de C₂-H para *p*-hidroxifenil (H_{2,6}) (SETTE et al., 2013). Por meio do volume relativo das integrais dos picos cruzados de H_{2/6}, G₂, S_{2/6} e S'_{2/6} foi possível obter a relação H/G/S para cada uma das ligninas (SAMUEL et al., 2011). A integral obtida para G₂ foi duplicada devido à proporção que esse sinal gera em relação aos demais, conforme dados da literatura (WEN et al., 2013).

Figura 35 – Espectros de 2D HSQC RMN das ligninas acetiladas de bagaço (A) e palha de cana-de-açúcar (B) e de casca de café (C) (solvente: DMSO-d₆).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 23 – Atribuições dos sinais de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC RMN das ligninas acetiladas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café em DMSO- d_6 . Regiões de atribuições de acordo com as publicações de Pu et al. (2013), Yuan et al. (2011) e Sun et al. (2013).

Sigla	Atribuição	Lignina de bagaço	Lignina de palha	Lignina de casca café
		δ_C/δ_H (ppm)	δ_C/δ_H (ppm)	δ_C/δ_H (ppm)
B $_{\beta}$	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ em ligação β - β' (B)	50,91/3,55	51,0/3,57	50,8/3,57
-OCH $_3$	C-H em metoxila	55,5/3,73	55,6/3,76	55,5/3,76
A $_{\alpha}$	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ em ligação β -O-4' (A)	72,8/4,89	72,9/4,91	
D $_{\beta}$	C $_{\beta}$, H $_{\beta}$ em spiro-dienona (β -1'/ α -O- α') (D)	80,0/4,54		
S $_{2,6}$	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ em unidades siringil (S)	103,6/6,65	103,4/6,73	103,6/7,2
S' $_{2,6}$	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ em unidades siringil oxidada (S')	105,2/7,31	105/7,30	
G $_2$	C $_2$ -H $_2$ em unidades guaiacil (G)	111,5/7,04	111,5/7,06	111,5/7,02
G $_2'$	C $_2$ -H $_2$ em unidades guaiacil oxidada (G')	111,5/7,29	111,5/7,32	
G $_5$	C $_5$ -H $_5$ em unidades guaiacil (G)	115,4/6,79	115,0/6,75	
G $_6$	C $_6$ -H $_6$ em unidades guaiacil (G)	121,5/7,04	121,7/7,07	121,0/6,98
H $_{2,6}$	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ em unidades <i>p</i> -hidroxifenil (H)	128,3/7,22	128,2/7,24	127,9/7,23
pCA $_{\alpha}$	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ em ácido <i>p</i> -cumárico (pCA)	143,5/7,50	143,5/7,51	

A relação H/G/S obtida por meio do HSQC RMN mostrou-se bastante semelhante ao observado para o bagaço e para a palha de cana, demonstrando a eficiência da técnica de ^{13}C RMN para determinação dessas estruturas na lignina (Tabela 24). Já a relação obtida para a casca de café foi muito divergente da obtida pelo espectro de ^{13}C RMN, no entanto, pode-se verificar um forte sinal no espectro de HSQC na região atribuída as metoxilas em unidades G e S, comprovando que estas estruturas estão presentes na lignina de casca de café apesar do sinal em G $_2$ e S $_{2,6}$ terem sido baixos, indicando que o tempo de aquisição de sinal não foi suficiente para esta lignina. Neste caso, considerou-se a relação obtida por meio da análise do espectro de ^{13}C RMN como a mais coerente.

Tabela 24 – Relação H/G/S e porcentagem relativas dessas unidades obtidas por meio de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC RMN e de ^{13}C RMN das ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café.

Lignina	Técnica	Relação			% relativo das unidades		
		H	G	S	H	G	S
Bagaço de cana	HSQC RMN	1	1,68	3,69	15,7	26,4	57,9
	^{13}C RMN	1	1,14	3,59	17,5	19,9	62,7
Palha de cana	HSQC RMN	1	2,38	1,27	21,5	51,2	27,3
	^{13}C RMN	1	2,26	1,55	20,8	47,0	32,2
Casca de café	HSQC RMN	1	0,06	0,07	88,5	5,3	6,2
	^{13}C RMN	1	0,74	0,29	49,3	36,5	14,3

Portanto, as ligninas de bagaço e de palha apresentaram-se relativamente livres de polissacarídeos e contaminantes, enquanto a lignina de casca de café, apesar do baixo percentual de polissacarídeos, apresentou um alto teor de extrativos, que pôde ser confirmado pelos resultados de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC. As 3 ligninas são do tipo H/G/S, sendo que para a lignina de bagaço predominam-se unidade S e proporções similares de H e G, e prevalência de ligações β -O-4, enquanto a lignina de palha de cana apresentou características similares à lignina de bagaço, porém com predominância de unidades G em sua estrutura e também maior proporção de ligações β -O-4; a lignina de casca de café apresentou uma estrutura mais condensada, composta principalmente por unidades H e com maior proporção de ligações C-C em sua estrutura. Os resultados referentes as proporções H/G/S sugerem que o deslocamento observado no pico de máxima absorção dessas ligninas no UV ocorra devido a influência de grande quantidade de unidades H ou de impurezas na amostra, principalmente para a lignina de casca de café.

5.3 Avaliação das oxidações das ligninas

A lignina representa a única fonte renovável para química fina de compostos aromáticos. Muitos estudos têm sido realizados para se obter compostos aromáticos de maior valor agregado a partir de lignina, principalmente a partir de compostos modelo, no entanto, utilizar a lignina modificada tal qual obtida após o(s) tratamento(s) para separação dos polissacarídeos da biomassa vegetal constitui um grande desafio, visto sua estrutura complexa e heterogênea. Neste trabalho, foram avaliados os compostos aromáticos obtidos a partir de diferentes condições de oxidação das ligninas obtidas após o pré-tratamento ácido e a deslignificação alcalina, em especial aldeídos aromáticos, como a vanilina, que representa importante valor comercial na área de fragrâncias e aromas. As ligninas de bagaço e palha de cana e de casca de café foram submetidas a oxidação utilizando como agente oxidante lacase à temperatura ambiente, e utilizando peróxido de hidrogênio em meio ácido e em meio alcalino à temperatura mais elevada (98 °C), e em meio neutro e alcalino à temperaturas ainda mais elevadas (150, 180, 210, 230 e 250 °C), sob pressão.

5.3.1 Oxidação enzimática

A oxidação enzimática das ligninas utilizou lacase como agente oxidante, em 3 diferentes concentrações no meio reacional: 10 UI, 100 UI e 200 UI. A atividade da lacase utilizada foi de 13 U/mg.

Para se acompanhar a evolução da oxidação enzimática do bagaço, da palha e da casca de café, foram retiradas amostras a cada 15 min durante a primeira hora de reação e a cada 30 min nas 4 horas finais, e as absorbâncias determinadas em espectro de UV a 280 nm, comprimento de onda típico de estruturas aromáticas fenólicas presentes na lignina, correspondendo à inserção de grupos α -carbonílicos (GOLDSCHMIDT, 1971). O aumento da intensidade de absorção em 280 nm pode ser um indicativo da formação de produtos de degradação da lignina, como os aldeídos aromáticos vanilina e siringaldeído. Os resultados de absorbância obtidos da análise do meio reacional nos diferentes tempos de reação estão apresentados na Figura 36. Para a determinação da cinética de reação, foram testados modelos de ordem 0, 1, 2 e n , e nenhum dos modelos apresentou ajuste satisfatório, no entanto, para todas as biomassas e condições avaliadas foi possível observar um aumento da absorbância no tempo final de reação em comparação ao tempo inicial.

Figura 36 – Absorbância no UV a 280 nm durante a reação de oxidação enzimática do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Essa falta de ajuste pode estar relacionada a problemas na amostragem, por se tratar de uma amostra heterogênea, ou ainda à alterações estruturais que podem estar ocorrendo simultaneamente na molécula de lignina (produtos sendo formado e degradado), o que pode levar a esta oscilação da absorção. O método de UV, apesar de ser adequado para determinar concentração ou alterações estruturais na lignina, não é utilizado para identificação de

compostos, pois diferentes compostos aromáticos absorvem no mesmo comprimento de onda (JINGJING, 2011).

A Tabela 25 apresenta a variação de pH no início e no final da reação. Pode-se verificar que essa variação foi pouco expressiva devido a presença do tampão para manter o pH apropriado à enzima.

Tabela 25 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.

Meio	10 UI		100 UI		200 UI	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Bagaço de cana	5,00	5,02	5,00	5,02	5,00	5,01
Palha de cana	5,00	4,99	5,00	4,99	5,00	5,00
Casca de café	5,00	5,01	5,01	5,04	5,00	5,00

Ao final da reação, após a adição de 5 mL de HCl 0,25 mol.L⁻¹ para precipitação da lignina, a fase sólida (lignina residual do processo oxidativo) denominada como lignina oxidada foi filtrada, lavada com água destilada até pH neutro, seca e utilizada para determinação do coeficiente de extinção e do espectro de infravermelho, e a fase líquida foi utilizada para realização da extração dos compostos de baixa massa molar utilizando diclorometano, para posterior avaliação por CLAE. O objetivo foi identificar os compostos formados para saber se algum composto de valor agregado foi formado de forma expressiva, focando principalmente na obtenção de aldeídos aromáticos.

5.3.1.1 Análise de Ultravioleta

Para definir mudanças estruturais e morfológicas causadas pelo grau de oxidação, a absorbância das ligninas oxidadas foi medida a 280 nm. Devido a baixa solubilidade das ligninas, adicionou-se NaOH 6,5 mol.L⁻¹ à solução, elevando o pH a aproximadamente 12. As curvas de calibração das ligninas oxidadas (absorbância vs concentração) foram utilizadas para determinar o parâmetro de Lambert-Beer. Devido a presença de anéis aromáticos na lignina (FERGUS et al., 1969), a análise da curva num gráfico absorbância vs concentração, medidos num comprimento de onda de 280 nm, possibilita a determinação do coeficiente de extinção, uma ferramenta utilizada para definir as condições de oxidação que promovem abertura do anel fenólico (Tabela 26). Condições de alta severidade deveriam se manifestar por um decréscimo no ângulo da curva (MAZIERO et al., 2012).

Tabela 26 – Média do coeficiente de extinção (ϵ) das ligninas após a oxidação enzimática e seus respectivos desvios padrão. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Amostra	ϵ lignina não oxidada ($L \cdot g^{-1}$)	R^2 médio	ϵ oxidação enzimática ($L \cdot g^{-1}$)					
			10 UI	R^2	100 UI	R^2	200 UI	R^2
Bagaço de cana	$23,18 \pm 0,34^{a, b}$	0,9991	$22,39 \pm 0,07^{a, b}$	0,9995	$25,88 \pm 1,89^a$	0,9998	$22,59 \pm 1,17^{a, b}$	0,9996
Palha de cana	$23,67 \pm 0,38^{a, b}$	0,9999	$21,94 \pm 0,12^{a, b}$	0,9976	$23,19 \pm 1,53^{a, b}$	0,9991	$23,11 \pm 0,81^{a, b}$	0,9985
Casca de café	$21,18 \pm 1,01^b$	0,9995	$20,13 \pm 1,59^b$	0,9992	$21,07 \pm 0,78^b$	0,9993	$22,65 \pm 0,10^{a, b}$	0,9984

De acordo com os dados apresentados na Tabela 26, observa-se que o coeficiente de extinção das ligninas oxidadas nas 3 condições avaliadas para as 3 biomassas foram semelhantes ao apresentado para lignina antes da oxidação, com valores variando entre 22,39 e 25,88 para o bagaço, 21,94 e 23,19 para a palha de cana, e 20,13 e 22,65 para a casca de café. Isso é um indicativo de que a reação utilizando lacase como agente oxidante foi amena, não provocando abertura de anéis aromáticos. As curvas apresentaram um bom ajuste, validando a lei de Lambert-Beer. A Figura 37 nos mostra de forma ilustrativa como a absorbância variou de acordo com a biomassa e condição testada.

Figura 37 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.1.2 Análise de Infravermelho

Os espectros de infravermelho das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, e casca de café após a oxidação enzimática são mostrados nas Figuras 38, 39 e 40, respectivamente. Os espectros foram normalizados na região de 1510 cm^{-1} e comparados com o espectro da respectiva

lignina antes da oxidação, visando verificar as modificações estruturais que cada condição testada promoveu na lignina.

Figura 38 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar antes e após a oxidação enzimática (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 27.

Fonte: Arquivo pessoal.

Comparando-se os espectros de lignina de bagaço é possível verificar que poucas mudanças ocorreram, as bandas de absorção mostram-se bastante similares, com pequenos incrementos de absorção em determinadas regiões. Na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3416 cm^{-1}) verifica-se uma pequena diminuição da absorção para as ligninas submetidas a oxidação, o que poderia estar associado com a ruptura de grupos fenólicos (SILVERSTEIN et al., 2005) durante a oxidação, mas nesse caso a oxidação enzimática foi bastante branda o que pode ser observado pelas demais bandas de absorção na região dos aromáticos fazendo, portanto, com que a hipótese não se sustente, estando provavelmente associada a presença de umidade. As bandas correspondentes ao estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos sofreram ligeiro aumento após a oxidação.

Importantes regiões a serem avaliadas na lignina após um processo oxidativo estão associadas ao estiramento C=O de carboxilas e carbonilas não conjugadas (1710 cm^{-1}) e conjugadas (1600 cm^{-1}), pois estas fornecem um indicativo da eficiência do processo oxidativo. Esses valores podem ser observados na Tabela 27, onde a banda em 1596 cm^{-1} aumentou discretamente, mas progressivamente, com o aumento da atividade enzimática no sistema oxidativo, e

para banda em 1698 cm^{-1} observou-se um pequeno aumento para as ligninas das reações que utilizaram 100 e 200 UI. Esses dados indicam que uma maior atividade enzimática intensificou o processo oxidativo, no entanto, essa modificação foi pequena.

Tabela 27 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de bagaço de cana-de-açúcar (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorvância (A) e absorvância relativa (%A).

Número no gráfico	Lignina oxidada - 10 UI			Lignina oxidada - 100 UI			Lignina oxidada - 200 UI			Lignina de bagaço de cana		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
1	1698	0,62	51,0	1698	0,70	62,0	1698	0,69	56,0	1697	0,62	52,02
2	1596	0,96	78,9	1596	0,98	86,8	1596	1,02	83,4	1598	0,92	77,88
3	1509	1,00	82,0	1509	1,00	88,5	1509	1,00	81,6	1513	1,00	84,36

Valores relativos das bandas de absorvância (%A) foram medidos a partir da linha base de espectro normalizado em $1505\text{-}1516\text{ cm}^{-1}$, admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

Figura 39 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana-de-açúcar antes e após a oxidação enzimática (região de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 28.

Fonte: Arquivo pessoal.

Ao observar a Figura 39, verifica-se que os espectros de infravermelho das ligninas de palha de cana após a oxidação é equivalente ao espectro da lignina antes da oxidação, apenas com intensidade diferente em determinadas bandas. O ombro em 1633 cm^{-1} presente no espectro da lignina não oxidada correspondente ao estiramento de carbonilas e carboxilas conjugadas, não é observado nas ligninas após reação com lacase. A região de absorção

correspondente ao estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos (2850 e 2919 cm^{-1}), bem como as bandas de $1698\text{-}1707\text{ cm}^{-1}$ e $1597\text{-}1599\text{ cm}^{-1}$ (Tabela 28) foram ligeiramente intensificadas com a oxidação, indicando que houve pequena modificação na molécula, sendo esta mais acentuada na reação com atividade enzimática mais alta.

Tabela 28 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de palha de cana-de-açúcar (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	10 UI			100 UI			200 UI			Lignina de palha de cana-de-açúcar		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	A (%)
1	1706	0,85	83,7	1707	0,82	75,0	1698	0,92	83,0	1704	0,80	75,9
2	1598	0,96	94,8	1599	0,97	89,0	1597	1,02	92,2	1602	0,88	83,1
3	1509	1,00	98,5	1509	1,00	91,7	1509	1,00	90,5	1513	1,00	94,4

Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos a partir da linha base de espectro normalizado em $1505\text{-}1516\text{ cm}^{-1}$, admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

Figura 40 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação enzimática (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 29.

Fonte: Arquivo pessoal.

O espectro de infravermelho das ligninas de casca de café apresentados na Figura 40 são semelhantes entre si, sendo possível observar um aumento na banda de $1708\text{-}1711\text{ cm}^{-1}$ para as ligninas oxidadas pela lacase a 100 e 200 UI quando comparado com a lignina não oxidada. É possível verificar que essa banda foi deslocada, indicando estiramento C=O em cetonas e

carbonilas não conjugadas. A banda em 1628-1631 cm^{-1} não foi aumentada após a oxidação. Esses valores podem ver vistos na Tabela 29, indicando que a lacase a 10 UI não oxidou a molécula e a lacase a 100 e 200 UI apresentaram desempenho bastante equivalente, ocasionando uma oxidação branda.

Para nenhuma das biomassas observou-se um aumento expressivo das bandas na região de 1710 e 1600 cm^{-1} , indicando que a oxidação foi muito amena, concordando com os coeficientes de extinção apresentados anteriormente.

Tabela 29 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de casca de café (cm^{-1}) após oxidação enzimática, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	10 UI			100 UI			200 UI			Lignina de casca de café		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
1	1710	1,25	76,5	1711	1,35	75,8	1708	1,36	75,9	1703	1,29	78,8
2	1631	1,42	87,2	1628	1,47	82,4	1631	1,49	83,3	1627	1,47	89,8
3	1515	1,00	61,3	1515	1,00	56,2	1515	1,00	56,0	1516	1,04	63,4

Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos a partir da linha base de espectro normalizado em 1505-1516 cm^{-1} , admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

5.3.1.3 Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE

Os dados de CLAE apresentados na Tabela 30 estão expressos em mg de produto obtido por g de lignina submetida à oxidação após 5 h de reação com lacase. A Figura 41 demonstra de forma ilustrativa a variação no rendimento da vanilina, do siringaldeído, e de seus respectivos ácidos, ácido vanílico, e ácido sirínico, de acordo com os valores apresentados na Tabela 30.

Para o bagaço de cana pôde se verificar que, de uma maneira geral, esses compostos foram obtidos em maior quantidade conforme a atividade da enzima utilizada foi aumentada, exceto para o ácido vanílico que não foi detectado em nenhuma condição. Essa tendência é clara especialmente para a vanilina, e pôde ser observada também quando lignina de palha foi utilizada como substrato da reação. A reação com lacase a 10 UI foi muito amena e não propiciou a formação de nenhum dos produtos avaliados, com exceção para o ácido *p*-cumárico, que é um precursor do *p*-hidroxibenzaldeído, e pôde ser observado em maiores proporções nessa condição. O mesmo foi observado para a lignina de palha de cana, que converteu cerca de 0,42% em *p*-hidroxibenzaldeído quando utilizado lacase à 10 UI. Nas reações utilizando lignina de casca de café, não foi possível observar um efeito da carga enzimática na obtenção dos produtos avaliados, sendo que a conversão de lignina foi bastante inferior ao se comparar com as demais biomassas. Devido a proporção de precursores determinados para a lignina de casca de café,

essa menor obtenção de derivados guaiacil e siringil já eram esperadas, associadas a uma maior condensação da molécula e a presença de contaminantes, dificultando a ação da enzima. Pelo fato da lignina de casca de café apresentar uma proporção de unidades H bastante superior, seria previsto uma maior concentração de ácido *p*-cumárico, no entanto, esta não foi superior ao determinado para as demais biomassas nas mesmas condições. O fato da concentração de ácido ferúlico, álcool vanílico e de ácido vanílico serem baixas, até mais baixa do que da própria vanilina, sugerem uma baixa degradação da lignina, e não uma degradação um pouco mais severa que gerou altos índices de ácidos.

Contudo, as taxas de conversão foram muito baixas para todos os compostos identificados, independentemente da biomassa utilizada, todos com porcentagem de conversão de lignina em produto inferior a 0,5%. Mathias et al. (1995), avaliaram a obtenção de vanilina a partir de lignina kraft de *Pinus pinaster* (madeira mole) por meio de oxidação biológica e química. Para a oxidação biológica, foi utilizado uma ligninase (368 mmol de álcool benzílico/g proteína*min) produzida por *Acinetobacter anitratus* e H₂O₂ para iniciar a reação, que ocorreu a 35-40 °C por 24 h, obtendo-se um rendimento de vanilina de 1,00 mg/g de sólido, enquanto para a oxidação química utilizando oxigênio molecular a 136 °C por 50 min foi obtido 9,04 mg/g de sólido. Esses resultados demonstram como a degradação de lignina utilizando um oxidante biológico é muito menor comparado a um oxidante químico. A maior vantagem da oxidação biológica é a baixa pressão e temperatura utilizadas no processo (MATHIAS et al., 1995). Os resultados obtidos neste trabalho para vanilina apesar de baixos, estão acima do observado por Mathias et al. (1995) trabalhando com madeira mole, que contém em maior proporção unidades G precursoras da vanilina, no entanto, os autores utilizaram enzima na forma bruta, o que poderia explicar esse rendimento mais baixo.

Metodologia semelhante de oxidação enzimática foi previamente estudada em nosso grupo de pesquisa utilizando lignina de bagaço de cana obtida por processo acetosolv, e foi observado que a lacase promoveu um aumento de grupos hidroxilas e carbonilas na lignina, indicando que houve oxidação (CALABRIA; GONÇALVES, 2006). Não foi verificada a proporção de compostos aromáticos formados, visto que o objetivo do trabalho foi estudar as propriedades quelantes da lignina oxidada enzimaticamente.

Em recente revisão realizada por Munk et al. (2014), foi discutida a capacidade da lacase em catalisar a quebra de ligações em lignina. Segundo os autores, acredita-se que a lacase pode quebrar ligações fenólicas em compostos modelo de lignina, como por exemplo entre C α -C β , sem o uso de mediador. No entanto, lacase seria capaz de quebrar ligações em sub-unidades não fenólicas da lignina somente na presença de mediador.

Tabela 30 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação enzimática e seus respectivos desvios padrão. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina)	Bagaço de cana			Palha de cana			Casca de café		
	10 UI	100 UI	200 UI	10 UI	100 UI	200 UI	10 UI	100 UI	200 UI
Ácido Gálico	0,08 ± 0,11	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,10	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,04
Hidroxitilfurfural	0,33 ± 0,41	0,04 ± 0,05	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,02
Ácido Furóico	0,39 ± 0,02	0,45 ± 0,21	0,23 ± 0,07	0,79 ± 0,32	0,48 ± 0,25	0,22 ± 0,07	0,09 ± 0,12	0,37 ± 0,32	0,42 ± 0,27
Álcool Vanilil	0,29 ± 0,42	0,57 ± 0,33	0,45 ± 0,64	0,56 ± 0,38	0,24 ± 0,34	0,33 ± 0,47	0,6 ± 0,05	0,77 ± 0,18	0,48 ± 0,40
Furfural	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Pirocatecol	0,33 ± 0,05	1,18 ± 0,27	1,82 ± 0,17	0,49 ± 0,10	0,81 ± 0,09	1,20 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,03
Ácido Vanílico	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	1,25 ± 0,15 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,43 ± 0,04 ^b	0,46 ± 0,08 ^b	0,39 ± 0,01 ^b
Ácido Siríngico	0,50 ± 0,15 ^c	2,18 ± 0,19 ^a	2,26 ± 0,18 ^a	0,44 ± 0,50 ^{c,d}	0,83 ± 0,08 ^{b,c}	1,10 ± 0,04 ^b	0,03 ± 0,00 ^d	0,03 ± 0,02 ^d	0,03 ± 0,02 ^d
Vanilina	0,46 ± 0,08 ^{c,d}	1,05 ± 0,25 ^b	1,76 ± 0,11 ^a	0,47 ± 0,02 ^{c,d}	0,89 ± 0,22 ^{b,c}	1,03 ± 0,03 ^b	0,17 ± 0,07 ^d	0,30 ± 0,01 ^d	0,22 ± 0,06 ^d
Siringaldeído	0,32 ± 0,20 ^d	0,18 ± 0,01 ^d	1,07 ± 0,06 ^{c,d}	3,19 ± 0,40 ^a	0,88 ± 0,32 ^{c,d}	2,21 ± 0,02 ^b	1,82 ± 0,38 ^{b,c}	0,34 ± 0,19 ^d	0,44 ± 0,14 ^d
Ácido p-cumárico	0,64 ± 0,06	0,27 ± 0,09	0,25 ± 0,00	4,18 ± 0,59	0,82 ± 0,15	0,29 ± 0,06	0,61 ± 0,26	0,11 ± 0,06	0,08 ± 0,02
Ácido Ferúlico	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,11 ± 0,08	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,07

Figura 41 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido siríntrico e siringaldeído sob condições de oxidação enzimática utilizando lacase a 10 UI (1), 100 UI (2) e 200 UI (3) a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação a obtenção de vanilina, observou-se o melhor resultado quando utilizou-se lignina de bagaço e lacase com atividade de 200 UI, no entanto, esse resultado é muito pouco expressivo para que fosse realizada uma etapa posterior de separação e purificação do produto. A partir dos dados obtidos da análise de variância (ANOVA) das condições utilizadas no processo enzimático em termos de obtenção de vanilina (Tabela 31), verifica-se que tanto a fonte de lignina e a atividade da enzima, bem como a combinação desses fatores influenciaram estatisticamente no rendimento de vanilina ($p < 0,05$), o que pode ser compreensível, devido ao mecanismo de oxidação ser complexo.

Tabela 31 – ANOVA dos efeitos da variáveis aplicados ao processo enzimático na produção de vanilina. Valores de $p \leq 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Biomassa	2	2,29	1,15	75,66	0,000
Atividade enzimática	2	1,22	0,61	40,35	0,000
Biomassa*Atividade enzimática	4	0,81	0,20	13,35	0,001
Resíduo	9	0,14	0,02		
Total	17	4,47			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

O rendimento médio das reações em termos de massa de lignina oxidada recuperada ao final da reação estão apresentados da Figura 42. Essas perdas observadas são decorrentes de degradação de lignina durante a oxidação, processo de filtração e lavagem da lignina e amostragem realizada durante a oxidação para avaliação no UV.

Figura 42 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação enzimática do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2 Oxidação em meio ácido

A oxidação em meio ácido ocorreu a 98 °C por 120 min e utilizou H_2O_2 como agente oxidante, em 3 diferentes condições: variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio (9,1% m/v e 6,1% m/v) e variando a concentração de ácido no meio (HCl 2M e 0,2M). Obviamente, essa variação na concentração de peróxido de hidrogênio influenciou na percentagem de O_2 disponível do meio, sendo esta de 20,1% O_2 /g biomassa para H_2O_2 a 9,1% e de 13,5% O_2 /g biomassa para H_2O_2 6,1%. A variação da concentração de HCl ocasionou uma variação no pH da reação, podendo esta ser observada posteriormente nesse item.

Para se acompanhar a evolução da oxidação química em meio ácido, amostras foram retiradas a cada 30 min, e as absorvâncias determinadas em espectro de UV a 280 nm (Figura 43), comprimento de onda típico de estruturas aromáticas fenólicas presentes na lignina. No estudo cinético, foram testados modelos de ordem 0, 1, 2 e n, e nenhum dos modelos apresentou ajuste satisfatório, no entanto, para todas as biomassas e condições avaliadas foi possível observar um aumento crescente da absorvância até o tempo final de reação, seguindo a ordem H_2O_2 9,1% - HCl 0,2 M > H_2O_2 6,1% - HCl 2M > H_2O_2 9,1% - HCl 2 M, porém, pouco expressivo.

Figura 43 – Absorbância no UV-vis a 280 nm durante a reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Esta falta de ajuste pode estar relacionada a problemas na amostragem, por se tratar de uma amostra heterogênea, tanto em relação a lignina em si, como pelo fato da lignina ser pouco solúvel em meio ácido. Pode ainda estar relacionada à alterações estruturais que podem estar ocorrendo simultaneamente na molécula de lignina (diferentes compostos aromáticos absorvem no mesmo comprimento de onda sendo formados e degradados).

Mesmo com essa falta de ajuste para se determinar um modelo cinético, existe uma tendência clara para todas as biomassas, que foi uma maior absorbância para a condição H_2O_2 9,1% - HCl 0,2M ao final do tempo de reação, sugerindo uma maior concentração de compostos aromáticos obtidos nessa condição.

A Tabela 32 apresenta a variação de pH no início e no final da reação. Verifica-se que a variação do pH foi pouco expressiva em todas as condições avaliadas.

Tabela 32 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.

Meio Biomassa	H ₂ O ₂ 9,1% (m/v) - HCl 2M		H ₂ O ₂ 6,1% (m/v) - HCl 2M		H ₂ O ₂ 9,1% (m/v) - HCl 0,2M	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Bagaço de cana	2,00	1,60	2,00	2,00	4,00	2,00
Palha de cana	2,00	1,62	2,00	2,00	4,00	2,00
Casca de café	2,00	1,53	2,00	2,00	3,60	2,67

Ao final da reação, como a lignina já se apresentava na forma precipitada devido ao pH final da reação estar em torno de 2, a fase sólida (lignina residual do processo oxidativo) denominada como lignina oxidada foi separada por filtração, lavada com água destilada até pH neutro, seca e utilizada para determinação do coeficiente de extinção e do espectro de infravermelho, e a fase líquida foi utilizada para realização da extração dos compostos de baixa massa molar utilizando diclorometano, para posterior avaliação em CLAE.

5.3.2.1 Análise de Ultravioleta

A determinação do coeficiente de extinção das ligninas após a oxidação é uma ferramenta utilizada para indicar a severidade da reação, conforme mencionado anteriormente. De acordo com os dados apresentados na Tabela 33, verifica-se que os resultados foram semelhantes ao apresentado para a lignina antes da oxidação para o bagaço de cana, com valores variando de 21,85 a 22,41 L.g⁻¹, e para a palha foi observado uma discreta diminuição, especialmente para a condição utilizando 9,1% de H₂O₂ e HCl 2 M, que apresentou $\epsilon = 21,13 \text{ L.g}^{-1}$. Para a casca de café observou-se um decréscimo em todas as condições de oxidação avaliadas, sendo este mais pronunciado nas reações utilizando maior concentração de peróxido de hidrogênio, indicando que durante a reação houve ruptura de anéis aromáticos. A Figura 44 nos mostra de forma ilustrativa como a absorvância variou de acordo com a biomassa e a condição testada. Verifica-se que a variação da absorvância foi pouco expressiva em todas as condições avaliadas. Nesse caso a biomassa parece ter o efeito mais significativo na absorvância, visto que as reações com lignina de casca de café apresentaram absorvância menores em relação a lignina sem oxidar.

Tabela 33 – Absortividade das ligninas após a oxidação química em meio ácido utilizando H_2O_2 como agente oxidante. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Amostra	ε lignina não oxidada (L.g ⁻¹)	ε oxidação química - H ₂ O ₂ em meio ácido (L.g ⁻¹)						
		R ²	H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 2M	R ²	H ₂ O ₂ 6,1% - HCl 2M	R ²	H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 0,2M	R ²
Bagaço de cana	23,18 ± 0,34 ^{a,b}	0,9991	21,85 ± 0,05 ^{a,b,c}	0,9995	22,40 ± 0,46 ^{a,b,c}	0,9983	22,41 ± 0,53 ^{a,b,c}	0,9817
Palha de cana	23,67 ± 0,38 ^a	0,9999	21,13 ± 0,08 ^{c,d}	0,9999	22,69 ± 0,10 ^{a,b,c}	0,9851	22,14 ± 0,05 ^{a,b,c}	0,9811
Casca de café	21,18 ± 1,01 ^{b,c,d}	0,9995	17,74 ± 0,07 ^e	0,9992	19,47 ± 0,02 ^{d,e}	0,9807	17,85 ± 1,13 ^e	0,9993

Figura 44 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2.2 Análise de Infravermelho

Os espectros de FTIR das ligninas de bagaço e palha de cana, e casca de café após a oxidação com peróxido de hidrogênio em meio ácido são mostrados nas Figuras 45, 46 e 47, respectivamente. Os espectros foram normalizados na região de $1505\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$ e comparados com o espectro da lignina antes da oxidação, visando verificar as modificações estruturais que cada condição promove na lignina.

Figura 45 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar antes e após a oxidação química em meio ácido (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 34.

Fonte: Arquivo pessoal.

Pôde-se observar nos espectros de lignina de bagaço que após a oxidação as bandas foram preservadas mas a intensidade de absorção foi consideravelmente maior em determinadas bandas, especialmente a banda em $1712\text{-}1717\text{ cm}^{-1}$ e um pouco menor na banda em $1599\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, que representam um importante parâmetro ao se avaliar reações de oxidação. Essa deslocização e aumento na banda em 1697 cm^{-1} pode indicar a formação de grupos cetonas e grupos carbonilas não conjugados e o aumento da absorção na região de 1598 cm^{-1} pode indicar a formação de grupos carboxilas e aldeído conjugados, ambos indicando que a molécula sofreu oxidação. Essas modificações vieram acompanhadas de outras variações que podem estar sendo influenciadas pela variação na concentração do agente oxidante e no pH do meio reacional. Nas reações onde foi utilizado uma maior concentração de H_2O_2 (9,1%) é possível verificar um maior aumento nas bandas nas regiões de 2935 e 1697 cm^{-1} quando comparada ao espectro de lignina oxidada a uma concentração menor de H_2O_2 (6,1%). É possível obter uma relação também avaliando-se a concentração inicial do ácido, observando que nas reações com um pH inicial em torno de 2,0 (HCl 2 M) a absorção nas bandas de 1124 e 1031 cm^{-1} foram mais intensas quando comparada ao espectro de lignina oxidada a um pH maior, em torno de 4 (HCl 0,2 M). Essas observações nos permitem verificar

que o peróxido de hidrogênio tem um efeito direto na formação de grupos carbonilas não conjugados, aumentando o grau de oxidação quando adicionado em maior concentração, bem como aumenta a proporção de estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos. Já o aumento na concentração inicial de ácido favoreceu a deformação de C-H aromático no plano e deformação de C=O e C-O em álcoois secundários e primários, respectivamente, o que pode ter uma interferência na correspondência de carbonil com a oxidação.

A Tabela 34 nos permite visualizar como a absorbância e a proporção relativa das bandas de 1712-1717 cm^{-1} e 1599-1600 cm^{-1} foram mais elevadas nas ligninas oxidadas, especialmente na condição em que se utilizou maior concentração do agente oxidante quando se avalia a região de 1712-1717 cm^{-1} .

Tabela 34 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço de cana (cm^{-1}) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 6,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 0,2M			Lignina de bagaço de cana		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
1	1717	0,98	74,7	1714	0,93	70,2	1712	1,00	80,8	1697	0,62	52,02
2	1599	1,08	82,1	1600	1,10	83,1	1599	1,11	89,7	1598	0,92	77,88
3	1509	1,00	76,0	1512	1,00	75,3	1509	1,00	80,8	1513	1,00	84,36

Pôde se observar nos espectros de lignina de palha (Figura 46) que após a oxidação as bandas foram preservadas mas a intensidade de absorção foi consideravelmente maior em determinadas bandas, especialmente a banda em 1712-1717 cm^{-1} e um pouco menor na banda em 1602-1603 cm^{-1} , assim como observado para as ligninas de bagaço de cana oxidadas. Essa deslocalização e aumento na banda em 1704 cm^{-1} pode indicar a formação de grupos cetonas e grupos carbonilas não conjugados e o aumento da absorção na região de 1602 cm^{-1} pode indicar a formação de grupos carboxilas e aldeído conjugados, ambos indicando que a molécula sofreu oxidação. Essas modificações vieram acompanhadas de outras variações que podem estar sendo influenciadas pela variação na concentração do agente oxidante e no pH do meio reacional. Nas reações onde foi utilizado uma maior concentração de H₂O₂ (9,1%) e de HCl (2 M) é possível verificar um maior aumento na absorção das bandas de 1704, 1602, 1328, 1267 e 1219 cm^{-1} , seguida por um aumento um pouco menor dessas bandas na condição H₂O₂ 6,1% e HCl 2 M e pela condição H₂O₂ 9,1% e HCl 0,2 M, respectivamente. Isso indica que uma maior concentração de H₂O₂ (9,1%) e de HCl (2 M)

favoreceu a formação de grupos carbonilas e carboxilas não conjugados e conjugadas, da banda em 1328 cm⁻¹ associada aos anéis do tipo S e G condensados na posição 5, de vibrações do anel G influenciada por estiramento C=O (1267 cm⁻¹) e o estiramento C-C, C-O e C=O (1219 cm⁻¹). Essa diversificação do efeito das diferentes condições sobre a oxidação observados ao comparar a lignina de bagaço e de palha de cana, principalmente na região entre compreendida entre 1400 – 1100 cm⁻¹ enfatiza como ligninas diferentes sofrem modificações diferentes a uma mesma condição oxidativa.

Figura 46 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana-de-açúcar antes e após a oxidação química em meio ácido (região de 4000 a 400 cm⁻¹). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 35.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 35 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de palha de cana (cm⁻¹) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 6,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 0,2M			Lignina de palha de cana-de-açúcar		
	cm ⁻¹	A	A (%)	cm ⁻¹	A	%	cm ⁻¹	A	%	cm ⁻¹	A	A (%)
1	1712	1,34	100,0	1717	1,12	94,9	1712	1,19	100,0	1704	0,80	75,9
2	1603	1,12	83,3	1602	1,00	84,8	1602	1,06	89,6	1602	0,88	83,1
3	1512	1,00	74,5	1509	1,00	84,9	1509	1,00	84,1	1513	1,00	94,4

A Tabela 35 nos permite visualizar como a absorbância e a proporção relativa das bandas de $1712\text{-}1717\text{ cm}^{-1}$ e $1599\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ foram mais elevadas nas ligninas de palha oxidadas, especialmente na condições em que se utilizou maior concentração de agente oxidante e de HCl quando se avalia a região de $1712\text{-}1717\text{ cm}^{-1}$.

Ao avaliar os espectros de lignina de casca de café (Figura 47) após a oxidação verifica-se que as bandas foram preservadas mas a intensidade de absorção foi consideravelmente maior em determinadas bandas, especialmente nas banda em $1703\text{-}1709\text{ cm}^{-1}$ e em $1639\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$, indicando a formação de grupos carboxilas e carbonilas não conjugados e conjugados, ambos indicando que a molécula sofreu oxidação. Na região chamada de impressão digital ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) também é possível verificar um aumento da absorção da molécula de lignina após a oxidação, acompanhado de uma diminuição da absorção na região das deformações fora do plano ($1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). Essas modificações podem estar sendo influenciadas pela variação na concentração do agente oxidante e no pH do meio reacional. Nas reações onde foi utilizado uma maior concentração de H_2O_2 (9,1%) é possível verificar um aumento maior na absorção das bandas de 2921 , 2851 e 1703 cm^{-1} . Já a diminuição da concentração de HCl (0,2 M) aumentou a absorção na região de $1639\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$.

Figura 47 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação química em meio ácido (região de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 36.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 36 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de casca de café (cm^{-1}) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 6,1% - HCl 2M			H ₂ O ₂ 9,1% - HCl 0,2M			Lignina de casca de café		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	A (%)
1	1711	2,09	97,5	1709	2,11	96,9	1709	2,30	100,0	1703	1,24	78,80
2	1652	1,72	80,4	1639	1,82	83,6	1645	1,94	84,3	1627	1,42	89,81
3	1516	1,00	46,6	1516	1,00	46,0	1517	1,00	43,4	1516	1,00	63,35

A Tabela 36 nos permite visualizar como a absorbância e a proporção relativa das bandas de 1709 cm^{-1} e $1639\text{-}1654 \text{ cm}^{-1}$ foram mais elevadas nas ligninas de casca de café oxidadas, especialmente nas condições em que se utilizou maior concentração do agente oxidante quando se avalia a região de 1709 cm^{-1} .

Portanto, na maioria das condições e biomassas avaliadas, a maior concentração de H₂O₂ favoreceu a absorção na região de $1698\text{-}1717 \text{ cm}^{-1}$, exceto pela palha que com essa concentração de agente oxidante e uma concentração menor de HCl não apresentou o mesmo efeito. Em relação a banda na região de 1600 cm^{-1} a variação da biomassa parece ter um maior efeito do que a variação das condições de oxidação em si.

5.3.2.3 Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE

Os dados de CLAE estão apresentados na Tabela 37, e estão expressos em g de produto formado por g de lignina. A Figura 48 demonstra de forma ilustrativa a variação no rendimento da vanilina, do siringaldeído, e de seus respectivos ácidos, ácido vanílico, e ácido siríntrico, de acordo com os valores apresentados na Tabela 35. Observou-se que as taxas de conversão foram muito baixas para todos os compostos identificados, todos com valores inferiores a 0,5% de lignina convertida em produto, exceto pelo ácido siríntrico, que pôde-se observar valores em torno de 0,8% quando utilizado lignina de bagaço de cana e H₂O₂ 6,1% em meio de menor pH e H₂O₂ 9,1 em meio de maior pH, conforme ilustra a Figura 48. Em relação a obtenção de vanilina, observou-se que todos os resultados foram inferiores a 0,1% de conversão de lignina, um rendimento bastante baixo, não justificando a realização de qualquer etapa para recuperação do produto. Contudo, a proporção de seus precursores e derivados – ácido ferúlico, álcool vanilil e ácido vanílico, somados indicam cerca de 0,42%, 0,60% e 0,09% de conversão de lignina em produto, para o bagaço, a palha e a casca de café, respectivamente.

O valor do pH tem um efeito na conversão de lignina e aldeídos aromáticos (KINDSIGO; KALLAS, 2006; HASEGAWA et al., 2001). Valores de pH menores, diminuem a uma taxa considerável o rendimento da conversão de lignina em vanilina (ARAÚJO et al., 2010; SILVA et al., 2009).

Figura 48 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação ácida utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e 2 M HCl (1), 6,1% H_2O_2 e 2 M HCl (2) e 9,1% H_2O_2 e 0,2 M HCl (3) , a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

É possível verificar na Figura 48, que existe um aumento progressivo na obtenção de ácido vanílico, ácido sirínico e siringaldeído quando utilizado as condições H_2O_2 9,1% - HCl 0,2 M > H_2O_2 6,1% - HCl 2 M > H_2O_2 9,1% - HCl 2 M, conforme sugerido pelos dados de UV. O mesmo, porém em menores proporções, pôde ser observado para a palha, e em proporções bem pequenas para a casca de café.

Tabela 37 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação ácida utilizando H₂O₂ como agente oxidante e seus respectivos desvios padrão. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).

Biomassa	H ₂ O ₂ (%)	HCl (M)	Conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina)											
			Ácido Gálico	HMF	Ácido Furóico	Álcool Vanilil	Furfural	Pirocatecol	Ácido Vanílico	Ácido Siringico	Vanilina	Siringaldeído	Ácido p- cumárico	Ácido Ferúlico
Bagaço de cana	9,1	2,0	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,36 ± 0,25	0,23 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,30 ± 0,03	1,46 ± 0,24 ^{b,c}	4,46 ± 0,86 ^b	0,04 ± 0,02 ^b	1,23 ± 0,24 ^{a,b,c}	0,67 ± 0,08	0,46 ± 0,10
	6,1	2,0	0,04 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,84 ± 0,53	0,49 ± 0,09	0,11 ± 0,01	0,64 ± 0,15	2,15 ± 0,37 ^{b,c}	8,62 ± 0,65 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	1,93 ± 0,42 ^a	1,51 ± 0,09	0,58 ± 0,15
	9,1	0,2	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,83 ± 0,46	0,66 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,67 ± 0,07	2,88 ± 0,83 ^b	8,43 ± 0,38 ^a	0,04 ± 0,00 ^b	2,29 ± 0,36 ^a	1,97 ± 0,41	0,68 ± 0,27
Palha de cana	9,1	2,0	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,65 ± 0,45	0,33 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,41 ± 0,04	2,16 ± 0,65 ^{b,c}	2,30 ± 0,80 ^c	0,06 ± 0,05 ^b	1,26 ± 0,45 ^{a,b,c}	0,38 ± 0,01	0,44 ± 0,17
	6,1	2,0	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,65 ± 0,47	0,36 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,38 ± 0,06	1,97 ± 0,44 ^{b,c}	4,20 ± 0,30 ^{b,c}	0,06 ± 0,00 ^b	1,83 ± 0,43 ^{a,b}	0,48 ± 0,04	0,74 ± 0,21
	9,1	0,2	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,75 ± 0,49	0,4 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,47 ± 0,18	4,96 ± 0,68 ^a	0,35 ± 0,08 ^d	0,52 ± 0,10 ^a	1,91 ± 0,53 ^{a,b}	0,59 ± 0,09	0,62 ± 0,11
Casca de café	9,1	2,0	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	2,24 ± 1,15	0,22 ± 0,10	0,06 ± 0,00	0,13 ± 0,04	0,69 ± 0,13 ^c	0,34 ± 0,09 ^d	0,02 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,04 ^c	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00
	6,1	2,0	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	1,33 ± 0,63	0,15 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,49 ± 0,13 ^c	0,32 ± 0,09 ^d	0,01 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,03 ^c	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	9,1	0,2	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	2,49 ± 0,64	0,29 ± 0,09	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,58 ± 0,19 ^c	0,25 ± 0,07 ^d	0,06 ± 0,01 ^b	0,56 ± 0,22 ^{b,c}	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Em relação à obtenção de ácido *p*-cumárico, maiores rendimentos foram observados para o bagaço (1,97 mg/g lignina), sendo que para palha obteve-se 0,59 mg/g lignina e para a casca de café somente 0,04 mg/g lignina, um rendimento bastante baixo visto a grande proporção relativa de unidade H na lignina de casca de café.

Metodologia semelhante de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido e catalisador Co/Mn/Br foi previamente estudada em nosso grupo de pesquisa utilizando lignina de bagaço e de palha de cana, constatando-se que houve a incorporação de grupos oxigenados na lignina, como grupos hidroxilas e carbonilas, indicando que houve oxidação (LABAT, 2008; LABAT; GONÇALVES, 2008). Não foi verificada a proporção de compostos aromáticos formados, visto que o objetivo do trabalho foi estudar a oxidação da lignina em meio ácido e verificar suas propriedades como substituinte da fração fenol em resinas fenol-formaldeído e como quelante.

Voitl e von Rohr (2010) estudaram a oxidação em meio ácido de lignina kraft (indulin) em escala laboratorial, e demonstraram que pode se obter um rendimento de 3,5% de lignina convertida em vanilina. Segundo os autores, a oxidação em meio ácido de lignina kraft à vanilina têm um rendimento baixo, menor que 4% de conversão, sendo necessário um método alternativo, razão pela qual o estudo foi realizado. Os autores utilizaram polioxometalato como catalisador da reação com O_2 em meio ácido composto por metanol/água.

Comparando os resultados obtidos com dados da literatura, verifica-se que o rendimento obtido em termos de vanilina nas condições testadas foram bastante baixos. Poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura para produção de vanilina por oxidação de lignina em meio ácido, e a maioria avalia a utilização de lignina de madeira. Neste trabalho utilizam-se biomassas que foram pouco estudadas para esse fim, e portanto, optou-se por avaliar condições mais simplificadas e conhecidas pelo grupo de pesquisa para se avaliar os compostos aromáticos que poderiam ser obtidos. A otimização do processo não foi a prioridade desse estudo, mas sim buscar possibilidades potenciais para se obter compostos aromáticos de maior valor agregado.

Partenheimer (2009), realizou um intensivo estudo avaliando condições de oxidações em meio ácido para produção de compostos aromáticos a partir da lignina. Para isso foram testadas 5 ligninas diferentes provenientes de madeira e bagaço, em oxidação por O_2 em meio contendo ácido acético e Co/Mn/Zr/Br como catalisador, variando-se os fatores tempo, temperatura, pressão, concentração de lignina e de catalisador (26 condições testadas no total). Dezoito produtos foram identificados, incluindo vanilina, ácido vanílico, hidroxibenzaldeído, ácido hidroxibenzóico, siringaldeído e ácido siringico. A condição que levou a maior conversão desses 6 compostos

mencionados utilizou lignina proveniente de processo organosolv, a 180 °C por 2 h, totalizando uma conversão de 10,9% (m/m), sendo que 0,99% correspondente a vanilina e 2,52% correspondente a siringaldeído. A condição que levou ao maior rendimento de vanilina utilizou uma lignina de bagaço de cana proveniente de hidrólise em uma planta piloto comercial, a uma temperatura de 140 °C por 2 h, com um rendimento de lignina convertida à vanilina de 1,45% e à siringaldeído de 1,73%.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) das condições utilizadas no processo oxidativo utilizando H₂O₂ em meio ácido para saber quais as variáveis exercem efeito significativo na obtenção de vanilina após 90 min de reação (Tabela 38). Verifica-se que tanto a fonte de lignina e a concentração de HCl (pH), bem como, a combinação desses fatores influenciam estatisticamente no rendimento de vanilina ($p < 0,05$). A concentração de agente oxidante, nesse caso, não foi significativa no rendimento da vanilina, o que poderia ser devido a variação da concentração do agente oxidante não ser suficiente para causar um efeito significativo na conversão de lignina à vanilina, ou ainda, essa concentração de agente oxidante já estar em seu máximo para que seja capaz de promover uma maior conversão à vanilina, portanto, seu aumento não aumentaria o rendimento.

Tabela 38 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo oxidativo químico em meio ácido em termos de produção de vanilina. Valores de $p \leq 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Biomassa	2	0,16	0,08	50,81	0,000
H ₂ O ₂	1	0,00	0,00	0,04	0,840
HCl	1	0,08	0,08	51,45	0,000
Biomassa * H ₂ O ₂	2	0,00	0,00	0,31	0,740
Biomassa * HCl	2	0,13	0,07	40,96	0,000
Resíduo	9	0,01	0,00		
Total	17	0,42			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

O rendimento médio das reações em termos de massa de lignina oxidada recuperada ao final da reação estão apresentados da Figura 49. Essas perdas observadas são decorrentes de degradação de lignina durante a oxidação, processo de filtração e lavagem da lignina e amostragem realizada durante a oxidação para avaliação no UV.

De uma forma geral, para o bagaço de cana, as condições com 9,1% H₂O₂ e HCl 0,2 M foram as que propiciaram uma oxidação mais intensa, com maior relação entre as bandas de 1700/1510 no infravermelho e menores coeficientes de extinção. Em termos de obtenção dos fenólicos de

interesse, essa condição foi também a que gerou os maiores rendimentos, o que está de acordo com os dados de UV, indicando que uma oxidação intensa levou a menores rendimentos. O mesmo pôde ser observado para a palha de cana, com exceção para o ácido siringico que foi obtido em maior concentração na condição 9,1% H_2O_2 e HCl 2M. Já para a casca de café foi observado um rendimento bastante baixo para todos os componentes determinados, mas ainda a condição 9,1% H_2O_2 e HCl 0,2 M apresentou os maiores rendimentos de vanilina e siringaldeído, acordando com os resultados de UV. As condições utilizadas pareceram ser mais severas para a lignina de casca de café, em especial às condições que utilizaram maior concentração de agente oxidante, pois os menores coeficientes de extinção obtidos e o grande aumento observado na relação 1700/1510 no infravermelho, indicam uma oxidação mais severa.

Figura 49 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.3 Oxidação em meio alcalino

A oxidação química em meio alcalino ocorreu a 98 °C por 90 min e utilizou H_2O_2 como agente oxidante, em 3 diferentes condições: variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio (9,1% m/v e 6,1% m/v) e variando a concentração de alcali no meio (NaOH 10% e 1%). Obviamente, essa variação na concentração de peróxido de hidrogênio influenciou na percentagem de O_2 disponível do meio, sendo esta de 20,1% O_2/g biomassa para H_2O_2 a 9,1% e de 13,5% O_2/g biomassa para H_2O_2 6,1%. A variação da concentração de NaOH ocasionou uma variação no pH da reação, podendo esta ser observada posteriormente nesse item.

Para se acompanhar a evolução da oxidação química em meio alcalino, amostras foram retiradas a cada 30 min, e as absorvâncias determinadas em espectro de UV a 280 nm (Figura 50),

comprimento de onda típico de estruturas aromáticas fenólicas presentes na lignina. No estudo cinético, foram testados modelos de ordem 0, 1, 2 e n, e nenhum dos modelos apresentou ajuste satisfatório; pouca variação na absorbância pôde ser observada durante a reação, no entanto, para todas as biomassas é possível verificar que a condição utilizando menor concentração de soda apresentou uma absorbância mais baixa durante toda a reação.

Essa falta de ajuste pode estar relacionada a problemas na amostragem, por se tratar de uma amostra heterogênea, ou ainda à alterações estruturais que podem estar ocorrendo simultaneamente na molécula de lignina (produtos sendo formado e degradado), o que pode levar a esta oscilação da absorção.

Figura 50 – Absorbância no UV a 280 nm durante a reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio alcalino do bagaço de cana (A), da palha de cana (B) e da casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 39 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação enzimática das ligninas de bagaço e de palha de cana, e de casca de café, nos diferentes meios reacionais.

Meio Biomassa	H ₂ O ₂ 9,1% (m/v) - NaOH 10% (m/v)		H ₂ O ₂ 6,1% (m/v) - NaOH 10% (m/v)		H ₂ O ₂ 9,1% (m/v) - NaOH 1% (m/v)	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Bagaço de cana	13,82	12,98	14,00	13,68	9,39	4,35
Palha de cana	13,80	13,90	13,82	13,10	10,26	4,39
Casca de café	13,80	13,71	13,77	13,45	9,17	4,57

A Tabela 39 apresenta a variação de pH no início e no final da reação. Foi possível verificar que o pH pouco variou nas condições utilizando NaOH 10%, no entanto, para as reações utilizando menor concentração, o pH caiu de aproximadamente 10 para 5. Quando se oxida lignina em meio alcalino para produzir vanilina, é importante que se utilize condições que mantenham o pH ajustado, pois degradação de vanilina aumenta bruscamente quando o pH é inferior a 11,5 (ARAÚJO et al., 2010), visto que o pKa dos fenólicos relacionadas à lignina varia de 10-11,5 a 25 °C (RAGNAR et al., 2000), diminuindo conforme a temperatura aumenta (JI, 2007).

Ao final da reação, após a adição de 25 mL de HCl 0,25M para precipitação da lignina, a fase sólida (lignina residual do processo oxidativo) denominada como lignina oxidada foi filtrada, lavada com água destilada até pH neutro, seca e utilizada para determinação do coeficiente de extinção e do espectro de infravermelho, e a fase líquida foi utilizada para realização da extração dos compostos de baixa massa molar utilizando diclorometano, para posterior avaliação em CLAE.

5.3.3.1 Análise de Ultravioleta

A determinação do coeficiente de extinção da lignina é um importante indicativo de mudanças estruturais e morfológicas causadas pelo grau de oxidação. Os coeficientes de extinção das ligninas oxidadas utilizando H_2O_2 como agente oxidante em meio alcalino estão apresentados na Tabela 40. Pôde-se verificar que os resultados em todas as condições foram inferiores aos determinados para a lignina sem oxidar, exceto pela absorvidade da lignina de bagaço oxidada com H_2O_2 6,1% e NaOH 10% que foi bastante superior, $44,42 \text{ L.g}^{-1}$. Este alto valor apresentado pode estar relacionado à agregação da lignina oxidada (MAZIERO et al., 2012).

Tabela 40 – Coeficiente de extinção das ligninas após a oxidação química em meio alcalino utilizando H_2O_2 como agente oxidante. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Amostra	ϵ lignina não oxidada (L.g^{-1})	R^2	Oxidação química - H_2O_2 em meio alcalino (L.g^{-1})					
			H_2O_2 9,1% - NaOH 10% (m/v)	R^2	H_2O_2 6,1% - NaOH 10% (m/v)	R^2	H_2O_2 9,1% - NaOH 1% (m/v)	R^2
Bagaço de cana	$23,18 \pm 0,34^b$	0,9991	$10,21 \pm 0,20^g$	0,9997	$44,42 \pm 1,70^a$	0,9999	$20,03 \pm 0,20^{c,d}$	0,9999
Palha de cana	$23,67 \pm 0,38^b$	0,9999	$7,21 \pm 0,18^h$	0,9990	$21,34 \pm 0,05^{b,c}$	0,9999	$18,66 \pm 0,07^d$	0,9999
Casca de café	$21,18 \pm 1,01^{b,c,d}$	0,9995	$11,73 \pm 0,45^{f,g}$	1,0000	$14,48 \pm 0,89^e$	0,9998	$13,49 \pm 0,31^{e,f}$	0,9998

A Figura 51 nos mostra de forma ilustrativa como a absorvância variou de acordo com a biomassa e condição testada, juntamente com a variação de pH no início e no fim da reação. Curvas de absorção de UV a 280 nm versus concentração de lignina mostram uma queda de até 55,95% quando utilizado bagaço de cana, 69,54% quando utilizado palha de cana e 44,62% quando utilizado casca de café, todos sob condições de oxidação utilizando H_2O_2 9,1% e NaOH 10%, demonstrando que essa maior concentração de O_2 juntamente a um pH mais elevado tiveram uma maior influência na degradação da lignina, caracterizando condições mais severas com abertura de anéis aromáticos. Maziero et al. (2012) observaram uma queda de 60% na absorvância de lignina de bagaço de cana após oxidação utilizando peróxido de hidrogênio sob condições semelhantes.

Figura 51 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), nas condições avaliadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.3.2 Análise de Infravermelho

Os espectros de FTIR das ligninas de bagaço e palha de cana, e casca de café após a oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino são mostrados nas Figuras 52, 53 e 54, respectivamente. Os espectros foram normalizados na região de $1505\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ e comparados com o espectro da lignina antes da oxidação, visando verificar as modificações estruturais que cada condição promove na lignina. Deve-se fazer uma ressalva em relação a comparação semiquantitativa realizada nos espectros normalizados devido à modificações estruturais que a oxidação pode ocasionar nas carbonilas presentes na lignina.

Figura 52 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço de cana antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 41.

Fonte: Arquivo pessoal.

Ao avaliar os espectros de infravermelho da lignina de bagaço é possível verificar que a oxidação gerou algumas mudanças estruturais na lignina, principalmente na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3416 cm^{-1}), estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos (2935 e 2849 cm^{-1}), estiramento C=O de carboxilas e carbonilas não conjugadas (1697 cm^{-1}), na região de impressão digital ($1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$) e na região das deformações fora do plano ($1000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$). Essas modificações podem estar sendo influenciadas pela variação na concentração do agente oxidante e no pH do meio reacional. Nas reações onde foi utilizada uma maior concentração de NaOH (10%) é possível verificar uma diminuição nas banda de 3416 cm^{-1} . Na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3416 cm^{-1}) essa diminuição da absorção para as ligninas submetidas a oxidação em um meio com pH mais elevado (13,82 – 14,20) poderia estar associado com a ruptura de grupos fenólicos (SILVERSTEIN et al., 2005), indicando uma oxidação mais drástica. Nas regiões de 2935 e 2849 cm^{-1} e de 1697 a 1709 cm^{-1} foi possível observar um aumento da absorção em todas as condições de oxidação avaliadas. Em relação a banda em 1687 cm^{-1} , importante indicativo de que a oxidação esteja ocorrendo, uma menor concentração de NaOH (pH inicial em torno de 9,39) elevou a absorção. Na

região de impressão digital é possível ver um decréscimo de determinadas bandas especialmente quando utilizado H_2O_2 e NaOH em maiores concentrações.

A Tabela 41 nos permite visualizar como a absorbância e a proporção relativa das bandas de $1698\text{-}1709\text{ cm}^{-1}$ e $1596\text{-}1597\text{ cm}^{-1}$ foram mais elevadas nas ligninas oxidadas, especialmente na condição em que se utilizou maior concentração do agente oxidante e menor concentração de NaOH, indicando que houve oxidação.

Tabela 41 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço de cana (cm^{-1}) após oxidação química em meio alcalino, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H_2O_2 9,1% - NaOH 10% (m/v)			H_2O_2 6,1% - NaOH 10% (m/v)			H_2O_2 9,1% - NaOH 1% (m/v)			Lignina de bagaço de cana		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	A (%)
1	1706	0,70	65,3	1706	0,64	52,7	1709	0,77	64,0	1697	0,62	52,02
2	1596	0,94	87,9	1596	0,91	75,3	1597	0,97	80,9	1598	0,92	77,88
3	1509	1,00	93,5	1509	1,00	83,0	1509	1,00	83,1	1513	1,00	84,36

No espectro de lignina de palha (Figura 53) é possível verificar que a oxidação gerou algumas mudanças estruturais na lignina, principalmente na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3417 cm^{-1}), estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos (2919 e 2850 cm^{-1}), estiramento C=O de carboxilas e carbonilas não conjugadas (1704 cm^{-1}) e conjugadas (1602 cm^{-1}) e na região das deformações fora do plano ($1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). Essas modificações podem estar sendo influenciadas pela variação na concentração do agente oxidante e no pH do meio reacional. Nas reações onde foi utilizada uma maior concentração de H_2O_2 (9,1%) é possível verificar um aumento nas bandas de 2935 , 2849 e 1704 cm^{-1} . Na condição onde se utilizou maior concentração de H_2O_2 e NaOH observou-se um expressivo aumento nas bandas de 2919 e 2850 cm^{-1} , associado a um aumento na banda de 1463 cm^{-1} (deformações assimétricas C-H em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$), indicando a grande proporção de grupos metílicos e metilênicos na amostra.

Figura 53 – Espectros no infravermelho das ligninas de palha de cana antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 42.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 42 nos permite visualizar como a absorbância e a proporção relativa das bandas de 1711-1715 cm^{-1} foram mais elevadas nas ligninas oxidadas quando utilizou maior concentração do agente oxidante, especialmente a um pH mais elevado. A absorção em 1598-1602 cm^{-1} pouco variou em relação a lignina sem oxidar quando utilizado uma concentração maior de NaOH (pH 13,77 – 13,80), somente quando se utilizou uma menor concentração de NaOH, portanto, quando a reação foi realizada em pH menor (9,17) foi possível observar um favorecimento na formação dessas bandas de carbonilas conjugadas.

Tabela 42 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de palha de cana (cm^{-1}) após oxidação química em meio alcalino, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H ₂ O ₂ 9,1% - NaOH 10% (m/v)			H ₂ O ₂ 6,1% - NaOH 10% (m/v)			H ₂ O ₂ 9,1% - NaOH 1% (m/v)			Lignina de palha de cana-de-açúcar		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	A (%)
1	1711	1,18	50,8	1711	0,96	80,2	1715	1,10	78,0	1704	0,80	75,9
2	1599	0,87	37,3	1599	0,89	74,5	1602	0,96	68,4	1602	0,88	83,1
3	1509	1,00	43,0	1509	1,00	83,3	1509	1,00	71,1	1513	1,00	94,4

Avaliando-se os espectros de lignina de casca de café (Figura 54) é possível verificar que a oxidação gerou mudanças estruturais na lignina principalmente na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3384 cm^{-1}), estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos (2921 e 2851 cm^{-1}), estiramento C=O de carboxilas e carbonilas não conjugadas (1703 cm^{-1}) e conjugadas (1627 cm^{-1}). Em todas as condições avaliadas foi observado um aumento nas bandas mencionadas, exceto pela banda na região das hidroxilas que diminuiu para todas, indicando oxidação da molécula. Na condição de pH mais baixo a banda de hidroxila foi deslocada a 3172 cm^{-1} , indicando mudanças estruturais devido provavelmente à formação de ligações de hidrogênio. A banda em 1627 cm^{-1} , apesar de mais intensa se torna menos evidente após a oxidação, e na condição de pH mais baixo ela quase desaparece.

Figura 54 – Espectros no infravermelho das ligninas de casca de café antes e após a oxidação química em meio alcalino (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 43.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados apresentados na Tabela 43 nos permite visualizar como a absorbância nas bandas de 1706 - 1712 cm^{-1} aumentaram drasticamente, mesmo com uma porcentagem de absorbância relativa na região de 1515 - 1517 cm^{-1} menor em relação a lignina antes da oxidação. Na condição onde foi utilizada maior concentração de peróxido de hidrogênio num pH em torno de 9,17 essa modificação estrutural parece ser ainda mais acentuada.

Tabela 43 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de casca de café (cm^{-1}) após oxidação química em meio ácido, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	H ₂ O ₂ 9,1% - NaOH 10% (m/v)			H ₂ O ₂ 6,1% - NaOH 10% (m/v)			H ₂ O ₂ 9,1% - NaOH 1% (m/v)			Lignina de casca de café		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	A (%)
1	1709	2,13	73,4	1708	2,15	81,9	1712	2,56	85,2	1703	1,29	78,8
2	1654	1,50	51,6	1674	1,66	63,2	1666	1,76	58,5	1627	1,47	89,8
3	1515	1,00	34,4	1517	1,00	38,1	1515	1,00	33,2	1516	1,04	63,4

5.3.3.3 Análise dos compostos de baixa massa molar por CLAE

Os dados da análise de CLAE apresentados na Tabela 44 estão expressos em mg de produto formado por g de lignina, após 90 min de reação em meio alcalino utilizando como agente oxidante o H₂O₂. A Figura 55 demonstra de forma ilustrativa a variação no rendimento da vanilina, do siringaldeído, e de seus respectivos ácidos, vanílico e siríngico, de acordo com os valores apresentados na Tabela 44. Observou-se que as taxas de conversão foram baixas para todos os compostos identificados, todos com valores inferiores a 0,5%, exceto pelo vanilina, que apresentou valores em torno de 0,81% quando utilizado lignina de bagaço de cana (H₂O₂ 9,1% e NaOH 10%), e 0,65% quando utilizado lignina de palha de cana (H₂O₂ 6,1% e NaOH 10%). Nessas mesmas condições, foi possível verificar maiores rendimentos também para o demais produtos avaliados, como o ácido ferúlico por exemplo, que é um precursor da vanilina. É possível verificar também que existe uma menor conversão de lignina em produtos para todas as biomassas quando utilizado H₂O₂ 9,1% e NaOH 1%, conforme sugerido pelos dados de UV.

Em relação ao ácido p-cumárico, maiores rendimentos foram observados para o bagaço (2,84 mg/g lignina), sendo que com a lignina de palha obteve-se 1,36 mg/g lignina e para a casca de café somente 0,33 mg/g lignina, um rendimento bastante baixo visto a grande proporção relativa de unidade H na lignina de casca de café. Esse comportamento está provavelmente associado a estrutura mais condensada dessa lignina, e já foi observado também nas oxidações em meio ácido e enzimática.

Tabela 44 – Média da conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina) ao término da oxidação alcalina utilizando H₂O₂ como agente oxidante e seus respectivos desvios padrão. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).

Biomassa	H ₂ O ₂ (%)	NaOH (%)	Conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina)											
			Ácido Gálico	HMF	Ácido Furóico	Álcool Vanilil	Furfural	Pirocatecol	Ácido Vanílico	Ácido Siringico	Vanilina	Siringaldeído	Ácido p-cumárico	Ácido Ferúlico
Bagaço de cana	9,1	10	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,02	1,28 ± 0,40 ^b	1,95 ± 0,25 ^a	8,13 ± 1,43^a	0,08 ± 0,02 ^{b,c}	1,83 ± 0,35	3,10 ± 0,36
	6,1	10	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,56 ± 0,11	1,43 ± 0,06 ^b	1,67 ± 0,31 ^a	2,30 ± 0,50 ^b	0,28 ± 0,05 ^a	2,84 ± 0,39	1,26 ± 0,26
	9,1	1	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,38 ± 0,13	0,28 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,25 ± 0,10	0,88 ± 0,23 ^{b,c}	0,11 ± 0,05 ^b	0,10 ± 0,05 ^b	0,36 ± 0,02 ^a	0,5 ± 0,01	0,23 ± 0,14
Palha de cana	9,1	10	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,10 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,00 ^b	1,01 ± 0,38 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,18 ± 0,05	0,16 ± 0,02
	6,1	10	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,24 ± 0,03	3,16 ± 0,27 ^a	2,28 ± 0,28 ^a	6,48 ± 0,57^a	0,21 ± 0,10 ^{a,b}	1,36 ± 0,27	2,91 ± 0,23
	9,1	1	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,28 ± 0,02	1,29 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00 ^b	0,21 ± 0,01 ^{a,b}	0,38 ± 0,01	0,32 ± 0,00
Casca de café	9,1	10	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	1,02 ± 0,03 ^{b,c}	0,37 ± 0,16 ^b	1,15 ± 0,26^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,33 ± 0,15	0,13 ± 0,06
	6,1	10	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,63 ± 0,29 ^{b,c}	0,43 ± 0,20 ^b	0,48 ± 0,23 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,25 ± 0,12	0,07 ± 0,03
	9,1	1	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,38 ± 0,16 ^c	0,05 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,02 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00

Figura 55 – Obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação alcalina utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e NaOH 10% (1), 6,1% H_2O_2 e NaOH 10% (2) e 9,1% H_2O_2 e 1% NaOH (3), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Metodologia semelhante de oxidação utilizando H_2O_2 em meio alcalino foi previamente estudada em nosso grupo de pesquisa visando verificar as mudanças estruturais causadas pela oxidação na lignina de bagaço de cana obtida por pré-tratamento com ácido diluído e deslignificada com soda, constatando-se que, ao utilizar H_2O_2 9,1% (m/v), pH 13,3, por 1 h a 98 °C, uma maior degradação foi observada, refletindo-se em um menor coeficiente de extinção e diminuição dos picos característicos de anel aromático e grupos fenólicos no espectro de FTIR (MAZIERO et al., 2012). A proporção de compostos aromáticos formados após essa degradação não foi objeto de estudo neste trabalho.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura que avaliam a oxidação de lignina para obtenção de compostos aromáticos, avaliaram ligninas de coníferas, devido a maior proporção de unidade guaiacil presentes nessas ligninas, provenientes de processo Kraft, em temperaturas acima do ponto de ebulição da água e na presença de catalisador. Dos compostos aromáticos avaliados, na grande maioria, a vanilina é o foco principal. Dos compostos que podem ser produzidos por meio de oxidação de lignina, a vanilina constitui-se como a mais conhecida e mais valorizada (SILVA et al., 2009), no entanto, sua conversão é ainda complexa (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2013).

Shakeri et al. (2013) estudaram a oxidação de lignina Kraft de *Pinus* na obtenção de vanilina. Foram avaliados 2 agentes oxidantes, o O_2 a uma pressão de 6,5 bar (aplicado após o

sistema ter atingido 101 °C), e utilizando o nitrobenzeno, 170 °C por 2,5 h, ambos em meio contendo NaOH. A primeira condição teve um rendimento de vanilina maior, com 4,2% (m/m) de conversão e a reação que utilizou nitrobenzeno apresentou 1,2% de rendimento. O oxigênio é um oxidante mais brando do que o nitrobenzeno na conversão do ácido ferúlico em vanilina (SHAKERI et al., 2013).

Um estudo utilizando lignina de bagaço de cana proveniente de processo soda para produção de aldeídos aromáticos foi realizado por Sales et al. (2007). A reação ocorreu em um reator de leito, utilizando O₂ como agente oxidante em meio alcalino, cloreto de paládio e alumina como catalisador, temperatura de 100 – 140 °C, pressão de 2 – 10 bar, por até 2,5 h. Os autores verificaram que a concentração máxima de aldeídos aromático foi alcançada mais rapidamente conforme a temperatura e a pressão de oxigênio na reação foram aumentadas. Constataram também que, considerando que grupos aldeídos e grupos hidroxilas podem ser sujeitos a oxidação, o componente aldeído com o maior número de grupos metoxilas substituídos no anel aromático foi o mais susceptível a oxidação, portanto, siringaldeído foi o mais reativo e o *p*-hidroxibenzaldeído o mais estável. A depolimerização da lignina em um meio oxidante leva a produção de aldeídos, ácidos e outros produtos de baixa massa molar, como o CO₂. Finalmente, após 2 h de reação, a uma pressão de 5 bar e 120 °C, foi observado um rendimento de vanilina de 18,75 mg/g lignina e de siringaldeído de 16,67 mg/ g lignina, que somados totalizam 3,55% de lignina convertida em produto. Ao comparar o rendimento de vanilina obtido neste trabalho a partir do bagaço de cana com os resultados obtidos por Sales et al. (2007), verifica-se que os autores obtiveram um rendimento pouco mais de 2 vezes maior, o que pode ser atribuído ao uso de catalisador e de um sistema que permite um controle da pressão e de temperaturas mais elevadas, assim como variações estruturais que possam existir entre as biomassas devido ao processo de separação dos componentes lignocelulósicos a quais elas foram submetidas anteriormente.

Araújo (2008), obteve um rendimento máximo de vanilina a partir de lignina Kraft (Indulin AT) de 3,7%, a 123 °C, pressão de 4 bar, por 75 min e pH inicial 14. Mathias (1993), obteve um rendimento máximo de vanilina a partir de lignina de *Pinus pinaster* de 4,1%, a 127 °C, pressão de 3,5 bar, por 90 min e pH inicial 14.

Em trabalho realizado por Sun et al. (1995) utilizando lignina de palha de trigo, foram comparadas oxidação alcalina com nitrobenzeno e com óxido cúprico, a 170 °C por 2,5 h, na obtenção de ácidos e aldeídos aromáticos. Os autores obtiveram uma rendimento de vanilina de 2,34% e 0,98%, de siringaldeído de 2,22 e 0,99%, de *p*-hidroxibenzaldeído de 0,28 e 0,08%, de ácido vanílico de 0,14 e 0,05%, ácido siringico de 0,20 e 0,23%, e de ácido *p*-hidroxibenzóico de 0,08 e 0,05%, para as oxidações com nitrobenzeno e CuO, respectivamente. A oxidação utilizando

CuO apresentou um rendimento de ácidos e aldeídos aromáticos próximo ao observado neste trabalho para o bagaço e a palha de cana. No experimento utilizando nitrobenzeno, esse rendimento foi maior, porém, ainda inferior ao observado por outros autores que trabalharam com oxidação alcalina de lignina de madeira.

A Borregaard é a única empresa que comercializa vanilina produzida a partir de lignina. O processo utiliza lignina de madeira de abeto, produzindo vanilina com um rendimento em torno de 0,75% (BACKA, 2013). A empresa produz celulose, bioetanol e outros produtos químicos, e mesmo com esse baixo rendimento, o processo ainda sim é economicamente viável, existindo por 49 anos. Podem-se verificar rendimentos mais elevados na literatura, em torno de 13%, porém, em escala laboratorial, sem incluir processo de separação e purificação.

A Figura 56 apresenta os dados da evolução da produção de vanilina, ácido vanílico, siringaldeído e ácido siringico durante os tempos 0, 30, 60 e 90 min de reação para as ligninas de bagaço e palha de cana, e de casca de café submetidas à oxidação alcalina.

Pôde-se verificar que na oxidação do bagaço com H_2O_2 9,1% e NaOH 10%, com 30 min já se pode verificar um acréscimo na produção da vanilina. Os demais produtos tem uma produção máxima com 60 min, quando a produção da vanilina decresce. A produção de vanilina atinge o pico em 90 min de reação, enquanto as demais curvas decrescem. As demais condições avaliadas para o bagaço apresentaram pouca variação na produção dos compostos avaliados em função do tempo. Para a palha de cana, a condição a H_2O_2 9,1% e NaOH 10% apresentou um pico de produção com 30 min para todos os compostos, indicando que um prolongamento do tempo de reação nessas condições degrada esses compostos. Já a condição a H_2O_2 6,1% e NaOH 10% apresentou picos máximos de produção a 90 min, exceto pelo siringaldeído que não foi produzido nessa condição. Para a reação restante, pouca variação foi observada. Para a lignina de casca de café pouca variação foi observada, somente na condição a H_2O_2 9,1% e NaOH 10% nota-se um aumento na produção do ácido vanílico com 30 e 60 min e seguido de uma queda, quando então a vanilina atinge um pico máximo.

O rendimento de vanilina utilizando oxidação alcalina foi muito superior ao obtido pela oxidação enzimática e pela oxidação química em meio ácido, no entanto, esse rendimento ainda é baixo considerando-se os valores encontrados na literatura, não justificando a realização de qualquer etapa para separação do produto.

Fargues et al. (1996), realizaram um estudo utilizando lignina kraft de *Pinus spp.* para produção de vanilina por oxidação em meio alcalino, avaliando-se a influência da concentração inicial de lignina (30 a 120 g/L), pressão de O_2 (1,2 a 5 bar), da temperatura (110 a 154 °C) e tempo de reação (20 a 70 min), e obtiveram um rendimento máximo de vanilina de 10,8% quando

utilizado uma concentração inicial de lignina de 60 g/L, a 133 °C, 2,8 bar, por 35 min. Tempos superiores de reação apresentaram uma maior degradação da vanilina.

Figura 56 – Cinética de obtenção de ácido vanílico, vanilina, ácido sirínico e siringaldeído sob condições de oxidação alcalina utilizando 9,1 % H_2O_2 como agente oxidante e 10% NaOH (1), 6,1% H_2O_2 e 10% NaOH (2) e 9,1% H_2O_2 e 1% NaOH (3) , a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) das condições utilizadas no processo oxidativo utilizando H_2O_2 em meio alcalino para saber quais as variáveis exercem efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na obtenção de vanilina após 90 min de reação (Tabela 45). Verifica-se que todos os efeitos influenciam estatisticamente no rendimento de vanilina, e a interação dos fatores tempo com a lignina, H_2O_2 e com NaOH não foi significativa no rendimento da vanilina, indicando que o tempo seria uma variável dependente.

Tabela 45 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo oxidativo químico em meio alcalino em termos de produção de vanilina. Valores de $p < 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.

Variação	GL	SQ	QM	F	P
Lignina	2	25,06	12,53	31,54	0,000
tempo	3	10,54	3,51	8,84	0,000
H_2O_2	1	14,54	14,54	36,59	0,000
NaOH	1	79,23	79,23	199,46	0,000
Lignina * tempo	6	5,64	0,94	2,36	0,050
Lignina * H_2O_2	2	97,61	48,80	122,86	0,000
Lignina * NaOH	2	60,79	30,39	76,51	0,000
tempo * H_2O_2	3	3,07	1,02	2,58	0,069
tempo * NaOH	3	3,27	1,09	2,75	0,057
Lignina * tempo * H_2O_2	6	19,53	3,25	8,19	0,000
Lignina * tempo * NaOH	6	8,04	1,34	3,37	0,010
Resíduo	36	14,30	0,40		
Total	71	319,42			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

De uma forma geral, para todas as biomassas, a condição com 9,1% H_2O_2 e NaOH 10% foram as que propiciaram uma oxidação mais intensa, com maior relação entre as bandas de 1700/1510 no infravermelho e menores coeficientes de extinção. A condição que utilizou 6,1% de H_2O_2 foi a menos severa entre as biomassas, indicando que a concentração do agente oxidante é um importante fator no grau de oxidação sofrido pela lignina. Em termos de obtenção dos fenólicos de interesse, a condição tida como mais severa foi também a que gerou os maiores rendimentos, exceto para palha de cana que foi observado uma queda no rendimento após 30 min de reação. Para a palha de cana, a condição de menor severidade levou a obtenção de maior proporção de compostos aromáticos. Para as 3 biomassas avaliadas, a condição que utilizou um pH mais baixo, próximo a 10, foi também a que apresentou os menores rendimentos de ácidos e aldeídos aromáticos, sofrendo pouca alteração com o transcorrer da reação.

O rendimento médio das reações em termos de massa de lignina oxidada recuperada ao final da reação estão apresentados da Figura 57. Essas perdas observadas são decorrentes de

degradação de lignina durante a oxidação, retirada de amostras durante a oxidação e ao processo de precipitação, filtração e lavagem da lignina.

Figura 57 – Rendimento em percentual de massa de lignina oxidada obtida ao final da reação de oxidação utilizando H_2O_2 em meio ácido do bagaço de cana (1), da palha de cana (2) e da casca de café (3).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.4 Oxidação úmida

A oxidação úmida ou do termo em inglês, Wet Oxidation (WO), é um tratamento térmico onde substâncias orgânicas e inorgânicas em soluções aquosas ou suspensões, são oxidadas por um agente oxidante em temperatura e pressão elevadas (LUCK, 1996). No processo, as temperaturas variam de 100 a 320 °C e a pressão de 0,3 a 20 MPa (MISHRA et al., 1995). A maioria das depolimerizações de lignina por oxidação úmida são realizadas para produzir aldeídos aromáticos (KANG et al., 2013), usando normalmente temperaturas que variam de 100 a 180°C, por períodos de 30 a 150 min. Neste trabalho, optou-se por avaliar temperaturas mais elevadas (150, 180, 210, 230 e 250 °C), porém, por períodos de reação mais curtos (5 e 15 min), em três meios reacionais – aquoso, alcalino NaOH 11,6% (m/m) (1g NaOH/g biomassa) e alcalino NaOH 17,4% (m/m) (1,5g NaOH/g biomassa), e utilizando como agente oxidante H_2O_2 1,88% (m/v). Essa menor concentração de peróxido de hidrogênio utilizada, foi estabelecida de forma a se garantir que os experimentos fossem realizados com segurança, devido aos tubos de aço-inox utilizados não contarem com dispositivo de controle de pressão. Essa concentração de H_2O_2 utilizada disponibilizou no reator 7,5% de O_2 /g de biomassa.

Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Bioprodutos, Ciências e Engenharia (BSEL – Bioproducts, Sciences and Engineering Laboratory) na Universidade de Washington (WSU – Washington State University), nos EUA.

As diferentes condições dos meios reacionais, fizeram com que o pH inicial e final das reações variassem, conforme pode ser observado na Tabela 46.

Tabela 46 – Variação do pH inicial e final das reações de oxidação úmida das ligninas de bagaço e palha da cana-de-açúcar, e da casca de café, nos diferentes meios reacionais.

Meio Biomassa	Aquoso		NaOH 11,6%		NaOH 17,4%	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Bagaço de cana	6,01-7,09	2,81-3,80	13,71-13,82	12,41-12,83	13,82-14,00	12,81-12,44
Palha de cana	5,28-6,76	2,85-4,79	13,69-13,80	12,30-12,92	13,69-13,77	12,38-13,37
Casca de café	5,71-6,56	3,16-4,41	13,69-13,77	12,38-13,37	13,80-14,00	11,89-12,88

Ao final da reação, as ligninas foram precipitadas (exceto pelas reações que ocorreram em meio aquoso), filtradas, a fase líquida utilizada para análise dos compostos de baixa massa molar em CLAE, e a fase sólida (lignina residual do processo oxidativo) denominada como lignina oxidada foi filtrada, lavada com água destilada até pH neutro, e seca. Após determinada a condição para cada biomassa que levou a maior obtenção de aldeídos aromáticos, utilizou-se essa fração sólida obtida para determinar o coeficiente de extinção e o espectro de infravermelho.

5.3.4.1 Análise dos compostos de baixa massa molar

A Tabela 47 apresenta a média dos rendimentos dos compostos obtidos após a oxidação úmida em meio aquoso das ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, e a Figura 58 apresenta de forma ilustrativa a variação do rendimento dos aldeídos aromáticos nos diferentes tempos, para as diferentes biomassas.

Pôde se verificar para o bagaço de cana, que um aumento do tempo de reação, juntamente com um aumento da temperatura propiciou a formação de vanilina e siringaldeído, alcançando valores máximos de conversão de lignina em vanilina de 0,67 mg/g lignina com 5 min e 0,98 mg/g lignina com 15 min, ambos a 250 °C. Para o *p*-hidroxibenzaldeído, com 5 min de reação verificou-se uma queda no rendimento com o aumento da temperatura, e com 15 min, essa obtenção foi favorecida a 150 e 230 °C. Existe uma queda no rendimento a 180 °C para todos os compostos, tanto com 5 como com 15 min. Nessas condições, foi favorecida a formação de siringaldeído > vanilina > *p*-hidroxibenzaldeído, o que seria justificável de acordo com a relação H/G/S obtida para essa biomassa.

Tabela 47 – Obtenção de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio aquoso nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Biomassa	Temperatura (°C)	Concentração (mg produto/g lignina)							
		Ácido fórmico		Ácido acético		Ácido Levulínico		Hidroxiacetilfurfural	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	10,42 ± 1,02	15,75 ± 0,96	2,70 ± 0,24	4,57 ± 0,26	0,84 ± 0,14	0,92 ± 0,01	1,34 ± 0,38	1,03 ± 0,27
	180	20,21 ± 3,59	17,07 ± 0,27	7,00 ± 0,72	6,37 ± 0,72	1,41 ± 0,27	1,02 ± 0,09	0,84 ± 0,36	1,70 ± 0,22
	210	17,82 ± 1,13	11,45 ± 1,58	6,47 ± 2,24	6,85 ± 0,12	1,42 ± 0,29	1,05 ± 0,17	1,58 ± 1,35	1,55 ± 0,64
	230	18,90 ± 1,72	13,81 ± 2,26	6,54 ± 1,40	7,06 ± 0,90	1,43 ± 0,60	1,38 ± 0,73	1,10 ± 0,45	1,52 ± 0,68
	250	7,22 ± 0,29	5,40 ± 0,01	6,68 ± 1,49	7,25 ± 0,00	1,44 ± 0,40	0,99 ± 0,04	1,31 ± 0,55	1,58 ± 0,76
Palha de cana	150	5,63 ± 0,01	6,01 ± 1,03	2,36 ± 0,05	2,08 ± 0,11	1,05 ± 0,02	0,66 ± 0,00	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,00
	180	12,91 ± 1,84	16,22 ± 1,11	4,05 ± 0,94	7,03 ± 0,38	0,65 ± 0,03	1,17 ± 0,07	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,04
	210	2,01 ± 0,26	8,02 ± 0,93	1,70 ± 0,37	5,87 ± 0,38	0,56 ± 0,03	1,20 ± 0,00	0,18 ± 0,05	0,10 ± 0,02
	230	3,59 ± 0,07	6,04 ± 0,49	3,95 ± 0,70	5,17 ± 1,6	0,98 ± 0,07	1,19 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,55 ± 0,20
	250	3,79 ± 0,38	5,34 ± 0,32	4,46 ± 0,21	7,00 ± 1,23	1,02 ± 0,24	1,42 ± 0,16	0,13 ± 0,02	0,25 ± 0,04
Casca de café	150	6,00 ± 0,37	3,99 ± 0,07	5,15 ± 0,08	4,12 ± 0,10	0,96 ± 0,06	0,56 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,83 ± 0,33
	180	8,00 ± 1,20	8,54 ± 0,65	6,41 ± 0,19	5,94 ± 0,6	1,28 ± 0,06	1,42 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,04
	210	3,13 ± 0,10	4,84 ± 0,00	2,72 ± 0,20	6,25 ± 1,63	1,12 ± 0,06	0,85 ± 0,17	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	230	3,04 ± 0,00	4,58 ± 0,57	3,50 ± 0,01	6,17 ± 0,83	0,80 ± 0,12	0,93 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,26 ± 0,00
	250	3,06 ± 0,02	3,67 ± 0,05	3,65 ± 0,16	5,27 ± 0,38	1,38 ± 0,04	1,38 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01
		Furfural		<i>p</i> -Hidroxi benzaldeído		Vanilina		Siringaldeído	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	0,99 ± 0,24	1,02 ± 0,54	0,60 ± 0,01 ^{a,b}	0,46 ± 0,08 ^{b,c}	0,38 ± 0,03 ^{e,f,g,h}	0,34 ± 0,05 ^{f,g,h,i}	0,24 ± 0,01 ^{d,e}	0,28 ± 0,09 ^{d,e}
	180	0,78 ± 0,48	2,88 ± 0,42	0,42 ± 0,02 ^{c,d}	0,26 ± 0,08 ^{e,f}	0,26 ± 0,02 ^{g,h,i,j}	0,23 ± 0,05 ^{h,i,j,k,l}	0,29 ± 0,01 ^{d,e}	0,37 ± 0,05 ^d
	210	1,18 ± 0,34	2,46 ± 1,00	0,41 ± 0,13 ^{c,d,e}	0,41 ± 0,05 ^{c,d,e}	0,43 ± 0,12 ^{d,e,f,g}	0,57 ± 0,02 ^{b,c,d,e}	0,68 ± 0,07 ^c	0,88 ± 0,08 ^b
	230	1,02 ± 0,05	1,54 ± 1,02	0,44 ± 0,03 ^c	0,67 ± 0,05 ^a	0,52 ± 0,00 ^{c,d,e,f}	0,76 ± 0,01 ^b	0,68 ± 0,05 ^c	0,91 ± 0,02 ^b
	250	1,27 ± 1,19	1,44 ± 1,17	0,44 ± 0,05 ^c	0,62 ± 0,09 ^a	0,67 ± 0,07 ^{b,c}	0,98 ± 0,09 ^a	0,84 ± 0,08 ^b	1,08 ± 0,08 ^a
Palha de cana	150	0,09 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,00 ^{g,h}	0,10 ± 0,06 ^{g,h}	0,10 ± 0,04 ^{j,k,l,m,n}	0,11 ± 0,08 ^{i,j,k,l,m,n}	0,01 ± 0,01 ^h	0,02 ± 0,01 ^h
	180	0,06 ± 0,03	0,18 ± 0,07	0,08 ± 0,02 ^{g,h}	0,16 ± 0,01 ^{f,g}	0,08 ± 0,03 ^{j,k,l,m,n}	0,20 ± 0,04 ^{h,i,j,k,l,m}	0,02 ± 0,00 ^h	0,07 ± 0,00 ^{g,h}
	210	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,00 ^{g,h}	0,09 ± 0,08 ^{g,h}	0,05 ± 0,02 ^{k,l,m,n}	0,16 ± 0,19 ^{i,j,k,l,m,n}	0,02 ± 0,02 ^h	0,09 ± 0,09 ^{f,g,h}
	230	0,09 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,10 ± 0,02 ^{g,h}	0,28 ± 0,04 ^{d,e,f}	0,27 ± 0,00 ^{g,h,i,j}	0,58 ± 0,03 ^{b,c,d}	0,08 ± 0,04 ^{g,h}	0,20 ± 0,02 ^{e,f,g}
	250	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,11 ± 0,06 ^{g,h}	0,27 ± 0,05 ^{d,e,f}	0,24 ± 0,07 ^{g,h,i,j,k}	0,63 ± 0,02 ^{b,c}	0,08 ± 0,05 ^{g,h}	0,24 ± 0,03 ^{d,e,f}
Casca de café	150	0,18 ± 0,15	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01 ^{g,h}	0,05 ± 0,01 ^{g,h}	0,13 ± 0,02 ^{j,k,l,m,n}	0,04 ± 0,02 ^{i,l,m,n}	0,05 ± 0,00 ^{g,h}	0,04 ± 0,01 ^h
	180	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00 ^{g,h}	0,10 ± 0,01 ^{g,h}	0,03 ± 0,01 ^{m,n}	0,11 ± 0,02 ^{h,i,j,k,l,m,n}	0,02 ± 0,00 ^h	0,05 ± 0,02 ^{g,h}
	210	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,12	0,03 ± 0,01 ^{g,h}	0,03 ± 0,01 ^{g,h}	0,03 ± 0,00 ^{l,m,n}	0,04 ± 0,00 ^{l,m,n}	0,01 ± 0,00 ^h	0,02 ± 0,00 ^h
	230	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,01 ^{g,h}	0,04 ± 0,01 ^{g,h}	0,02 ± 0,00 ^{m,n}	0,06 ± 0,01 ^{k,l,m,n}	0,01 ± 0,00 ^h	0,03 ± 0,01 ^h
	250	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,06	0,01 ± 0,00 ^h	0,05 ± 0,01 ^{g,h}	0,01 ± 0,00 ⁿ	0,05 ± 0,02 ^{k,l,m,n}	0,00 ± 0,00 ^h	0,03 ± 0,00 ^h

Para a palha de cana, verifica-se que tanto com 5 como com 15 min de reação, a formação dos compostos aromáticos é somente favorecida a partir de 230 °C, mantendo-se praticamente constante, ou apresentando ligeira queda a partir de 250°C. Os valores máximos de conversão de lignina em vanilina com 5 min de reação foi de 0,27 mg/g lignina (230 °C) e 0,63

mg/g lignina com 15 min (250 °C). Nessas condições, foi favorecida a formação de vanilina > siringaldeído > *p*-hidroxibenzaldeído, o que seria de justificável de acordo com a relação H/G/S obtida para essa biomassa.

Figura 58 – Obtenção de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio aquoso nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir das ligninas de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Comportamento antagônico foi observado para a lignina de casca de café. Maiores temperaturas degradaram esses compostos, sendo observado melhores rendimentos a 150 °C com 5 min de reação e a 230 °C com 15 min de reação. Os rendimentos obtidos para a casca de café foram os mais baixos dentre as biomassas avaliadas, atingindo um valor máximo de vanilina

de 0,13 mg/g lignina com 5 min e de 0,11 mg/g lignina com 15 min. Além da lignina de casca ser menos reativa, ela mostrou-se mais sensível a temperatura. Nessas condições, mesmo a lignina de casca de café apresentando predominantemente unidades H, a formação de vanilina e de *p*-hidroxibenzaldeído foram equivalentes, com um menor rendimento de siringaldeído.

De maneira geral, verifica-se que todas as biomassas apresentaram uma degradação da lignina à aldeídos aromáticos de maneiras diferentes, sendo sensíveis a variação da temperatura e do tempo de reação.

A Tabela 48 apresenta a média dos rendimentos dos compostos obtidos após a oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 11,6% das ligninas de bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, e a Figura 59 apresenta de forma ilustrativa a variação do rendimento dos aldeídos aromáticos nos diferentes tempos, para as diferentes biomassas.

Pôde-se verificar para o bagaço de cana, que o aumento da temperatura propiciou a formação de aldeídos aromáticos nas reações com 5 min, e até certo ponto nas reações com 15 min, quando a 250 °C há uma queda brusca no rendimento desses compostos, indicando que essa condição é bastante severa e causa a degradação desses compostos. Os maiores rendimentos de vanilina foram de 3,01 mg/g lignina quando utilizado 5 min (250 °C), e de 2,76 mg/g lignina quando utilizado 15 min de reação (230 °C). Nessas condições, os rendimentos de vanilina e siringaldeído foram equivalentes, com rendimentos inferiores de *p*-hidroxibenzaldeído.

Comportamento semelhante ao do bagaço de cana foi observado para a palha em meio alcalino, no entanto, a degradação dos aldeídos aromáticos com 15 min de reação ocorreu ainda em temperatura inferior, observando-se um pico acentuado de com 210 °C e uma queda brusca a partir de 230 °C. O rendimento máximo de vanilina após 5 min de reação foi de 2,86 mg/g lignina, a 250 °C, e após 15 min foi de 2,63 mg/g lignina, a 210 °C. Nessas condições avaliadas, observou-se novamente um favorecimento na formação de vanilina > siringaldeído > *p*-hidroxibenzaldeído, justificável de acordo com a relação H/G/S obtida para essa lignina. É possível verificar também, que houve um aumento na produção de ácidos fórmico e acético nas reações em meio alcalino, em especial do ácido acético para a lignina de palha de cana. Esse ácido acético está relacionado a porção de hemicelulose ainda presente na lignina, e que na lignina de palha foi observada em maiores proporções, conforme indicado na caracterização química (item 5.1.1). O favorecimento dessa formação em meio alcalino deve-se provavelmente à maior estabilização de intermediários iônicos formados durante as etapas da reação.

Tabela 48 – Obtenção de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 11,6% nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Biomassa	Temperatura (°C)	Concentração (mg produto/g lignina)							
		Ácido fórmico		Ácido acético		Ácido Levulínico		Hidroxiacetilfurfural	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	21,59 ± 0,10	16,55 ± 3,08	8,97 ± 0,74	7,33 ± 0,20	2,29 ± 0,10	1,95 ± 0,09	1,10 ± 0,09	0,95 ± 0,13
	180	21,67 ± 0,28	20,19 ± 0,55	7,74 ± 0,35	8,50 ± 0,41	2,05 ± 0,47	1,84 ± 0,03	0,18 ± 0,07	0,19 ± 0,01
	210	21,16 ± 0,28	27,83 ± 0,55	9,05 ± 0,00	15,75 ± 0,16	2,03 ± 0,05	2,97 ± 0,50	0,26 ± 0,03	0,48 ± 0,11
	230	29,00 ± 1,61	33,85 ± 3,64	14,21 ± 1,37	16,40 ± 0,22	3,01 ± 0,58	2,53 ± 0,51	0,39 ± 0,04	0,25 ± 0,17
	250	35,65 ± 2,33	43,64 ± 3,96	17,19 ± 0,76	34,16 ± 1,81	2,73 ± 0,07	1,50 ± 0,49	2,56 ± 0,51	0,98 ± 0,06
Palha de cana	150	10,94 ± 0,39	11,08 ± 1,09	130,45 ± 0,00	185,61 ± 16,22	3,71 ± 0,18	3,79 ± 0,74	0,42 ± 0,20	0,40 ± 0,42
	180	23,38 ± 8,96	19,57 ± 0,30	152,78 ± 48,64	206,35 ± 65,7	7,45 ± 0,78	3,31 ± 0,07	1,12 ± 0,09	0,14 ± 0,05
	210	15,39 ± 0,24	37,58 ± 0,19	142,74 ± 37,29	275,4 ± 24,29	4,75 ± 0,42	6,44 ± 0,27	0,28 ± 0,08	0,40 ± 0,24
	230	24,63 ± 0,02	28,42 ± 1,61	163,52 ± 28,53	201,18 ± 49,65	6,10 ± 0,09	3,38 ± 0,25	0,17 ± 0,03	0,97 ± 0,98
	250	26,25 ± 0,50	27,39 ± 0,58	114,78 ± 135,57	30,38 ± 0,00	2,70 ± 0,27	2,98 ± 0,11	0,17 ± 0,02	0,42 ± 0,08
Casca de café	150	19,73 ± 0,39	14,23 ± 0,04	17,35 ± 0,24	13,02 ± 0,07	2,85 ± 0,05	3,46 ± 0,35	0,51 ± 0,21	0,22 ± 0,04
	180	18,87 ± 1,12	14,37 ± 0,17	9,80 ± 0,55	19,36 ± 0,63	2,14 ± 0,02	2,63 ± 0,1	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,14
	210	17,38 ± 0,21	14,19 ± 0,71	16,36 ± 2,20	13,26 ± 0,61	2,87 ± 0,32	2,95 ± 0,12	0,47 ± 0,05	0,44 ± 0,06
	230	20,76 ± 0,46	18,02 ± 3,90	13,94 ± 0,18	16,30 ± 4,23	2,94 ± 0,18	2,24 ± 0,13	0,41 ± 0,11	0,35 ± 0,50
	250	22,86 ± 0,37	20,67 ± 0,00	17,25 ± 0,45	22,02 ± 0,00	3,47 ± 0,18	3,11 ± 0,05	0,28 ± 0,15	0,52 ± 0,17
		Furfural		p-Hidroxi benzaldeído		Vanilina		Siringaldeído	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	1,16 ± 0,40	0,66 ± 0,55	0,58 ± 0,07 ^{g,h,i,j,k}	0,64 ± 0,00 ^{f,g,h,i,j}	1,03 ± 0,11 ^{g,h}	0,89 ± 0,10 ^{h,i}	1,26 ± 0,24 ^{d,e,f}	1,56 ± 0,12 ^{c,d,e}
	180	0,32 ± 0,13	1,02 ± 1,29	0,71 ± 0,01 ^{e,f,g,h,i}	0,85 ± 0,16 ^{d,e,f,g}	1,15 ± 0,15 ^{f,g,h}	1,26 ± 0,30 ^{f,g,h}	1,71 ± 0,29 ^{c,d}	1,64 ± 0,08 ^{c,d}
	210	0,19 ± 0,20	0,08 ± 0,00	1,13 ± 0,19 ^{b,c,d}	1,29 ± 0,13 ^b	1,54 ± 0,09 ^{d,e,f,g}	2,37 ± 0,31 ^{b,c}	1,76 ± 0,04 ^c	1,96 ± 0,27 ^c
	230	0,16 ± 0,09	0,37 ± 0,15	1,22 ± 0,01 ^{b,c}	1,39 ± 0,12 ^b	2,05 ± 0,06 ^{c,d}	2,76 ± 0,19 ^{a,b}	2,01 ± 0,26 ^{b,c}	2,47 ± 0,01 ^{a,b}
	250	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	1,89 ± 0,07 ^a	0,34 ± 0,09 ^{k,l,m,n}	3,01 ± 0,06 ^a	0,27 ± 0,08 ^{j,k}	2,83 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,06 ^{i,j,k,l}
Palha de cana	150	0,54 ± 0,50	0,19 ± 0,17	0,98 ± 0,09 ^{c,d,e}	0,56 ± 0,08 ^{h,i,j,k}	1,58 ± 0,18 ^{d,e,f}	1,08 ± 0,02 ^{f,g,h}	0,56 ± 0,00 ^{h,i,j,k}	0,74 ± 0,00 ^{g,h,i,j}
	180	0,87 ± 0,64	0,10 ± 0,00	0,54 ± 0,11 ^{h,i,j,k}	0,70 ± 0,00 ^{e,f,g,h,i}	1,09 ± 0,27 ^{f,g,h}	1,50 ± 0,33 ^{e,f,g,h}	0,70 ± 0,23 ^{g,h,i,j}	0,77 ± 0,09 ^{g,h,i}
	210	0,05 ± 0,01	0,16 ± 0,07	0,8 ± 0,03 ^{e,f,g,h}	0,89 ± 0,09 ^{d,e,f}	2,02 ± 0,07 ^{c,d,e}	2,63 ± 0,00 ^{a,b}	1,00 ± 0,06 ^{f,g,h}	0,73 ± 0,13 ^{g,h,i,j}
	230	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,06	0,96 ± 0,11 ^{c,d,e}	0,5 ± 0,01 ^{i,j,k,l}	2,46 ± 0,07 ^{b,c}	0,73 ± 0,15 ^{h,i,j}	1,10 ± 0,06 ^{e,f,g}	0,27 ± 0,02 ^{j,k,l}
	250	0,40 ± 0,45	0,19 ± 0,06	1,30 ± 0,09 ^b	0,41 ± 0,01 ^{j,k,l,m}	2,86 ± 0,14 ^{a,b}	0,41 ± 0,05 ^{i,j,k}	0,96 ± 0,18 ^{f,g,h}	0,29 ± 0,02 ^{i,j,k,l}
Casca de café	150	0,72 ± 0,03	0,32 ± 0,11	0,06 ± 0,00 ⁿ	0,15 ± 0,00 ^{m,n}	0,14 ± 0,01 ^k	0,19 ± 0,01 ^{j,k}	0,10 ± 0,01 ^{k,l}	0,12 ± 0,02 ^{k,l}
	180	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,10	0,16 ± 0,01 ^{m,n}	0,14 ± 0,01 ^{m,n}	0,20 ± 0,02 ^{j,k}	0,19 ± 0,00 ^k	0,10 ± 0,01 ^{k,l}	0,09 ± 0,01 ^{k,l}
	210	0,35 ± 0,23	0,34 ± 0,02	0,18 ± 0,02 ^{m,n}	0,14 ± 0,00 ^{m,n}	0,27 ± 0,01 ^{j,k}	0,15 ± 0,02 ^k	0,10 ± 0,01 ^{k,l}	0,04 ± 0,00 ^l
	230	0,61 ± 0,03	0,83 ± 0,46	0,24 ± 0,01 ^{l,m,n}	0,16 ± 0,06 ^{m,n}	0,36 ± 0,03 ^{i,j,k}	0,06 ± 0,01 ^k	0,09 ± 0,02 ^{k,l}	0,09 ± 0,00 ^{k,l}
	250	0,25 ± 0,05	0,57 ± 0,10	0,30 ± 0,01 ^{k,l,m,n}	0,16 ± 0,00 ^{m,n}	0,27 ± 0,01 ^{j,k}	0,14 ± 0,01 ^k	0,12 ± 0,00 ^{k,l}	0,07 ± 0,00 ^{k,l}

Para a casca de café, observou-se que não houve incremento na formação de aldeídos aromáticos quando se aumentou a temperatura com 15 min de reação, sendo notada pouca variação nos resultados. Já para as reações que ocorreram por período menos prolongado, foi possível verificar aumento progressivo no rendimento desses compostos com o aumento da

temperatura, exceto pela vanilina que atingiu seu pico com 230°C e começou então a ser degradada.

Figura 59 – Obtenção de p-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 11,6% nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

De maneira geral, a utilização de um meio mais alcalino (1 g NaOH/g de biomassa) favoreceu a formação dos aldeídos aromáticos, com rendimento cerca de 2,5 vezes maior em relação ao obtido no meio aquoso, sendo a lignina de bagaço a de melhor desempenho. O aumento da temperatura quando realizada a reação por apenas 5 min favoreceu a obtenção

desses compostos, inclusive para a casca de café que havia apresentado pouca reatividade em pH mais baixo. No entanto, a alcalinidade do meio associado a um maior tempo de reação (15 min), fez com que a degradação desses compostos ocorresse em menor temperatura, a partir de 210 – 230 °C, e os rendimentos foram inferiores aos obtidos com 5 min de reação.

A Tabela 49 apresenta a média dos rendimentos dos compostos obtidos após a oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 17,4% das ligninas e bagaço de cana, de palha de cana e de casca de café, e a Figura 60 apresenta de forma ilustrativa a variação do rendimento dos aldeídos aromáticos nos diferentes tempos, para as diferentes biomassas.

É possível verificar um comportamento bastante semelhante para a lignina de bagaço de cana oxidada por 5 e por 15 min, e bastante diferente do apresentado quando utilizado NaOH 11,6%. Observa-se 2 picos, um a 180 °C e outro a 210 °C, sendo que para ambos os tempos avaliados, ocorre um acréscimo no rendimento a 210 °C para a vanilina e o *p*-hidroxibenzaldeído, e um decréscimo para o siringaldeído; no entanto, a 250 °C observa-se um rendimento bastante baixo, que provavelmente está associado a degradação desses compostos. Esse comportamento observado pode ser um indicativo de que reações reversíveis estejam acontecendo até 230 °C, já que a concentração de um composto é resultado de sua formação e degradação no meio reacional num dado momento, e que maior concentração de OH⁻ no meio favoreceu o processo oxidativo da lignina, o que gerou um menor rendimento de produtos ao se comparar com a oxidação alcalina com NaOH 11,6%. Os maiores rendimentos de vanilina foram de 1,45 mg/g lignina quando utilizado 5 min, e de 2,64 mg/ g lignina quando utilizado 15 min de reação, ambas a 230 °C. Nessas condições, os rendimentos de vanilina e siringaldeído foram se alternando nos picos observados, e rendimentos inferiores foram observados para o *p*-hidroxibenzaldeído.

Já para a palha de cana, apesar do rendimento inferior nessa condição, o comportamento das curvas de obtenção dos compostos foram semelhantes, porém com temperaturas inferiores de degradação dos compostos. Para a reação com 5 min, observa-se um aumento acentuado na obtenção de vanilina com o aumento da temperatura, no entanto, os demais compostos começam a degradar a partir de 230 °C. Com 15 min de reação, essa degradação é mais elevada, e começa a partir de 180 °C para a vanilina e de 150 °C para os demais compostos, indicando novamente uma condição de oxidação mais severa. O rendimento máximo de vanilina após 5 min de reação foi de 2,26 mg/g lignina, a 250 °C, e após 15 min foi de 1,36 mg/g lignina, a 210 °C, o que demonstra a grande influência do tempo de reação no rendimento, que foi mais elevado com um tempo de reação mais reduzido. Nessas condições avaliadas, observou-se novamente um favorecimento na formação de vanilina > siringaldeído > *p*-hidroxibenzaldeído. É possível verificar também, que houve um aumento na produção de ácidos fórmico e acético nessas condições, porém em concentrações menos expressivas do que as observadas na reações com menor

concentração de soda no meio. Novamente, essa concentração foi bastante superior quando utilizado a lignina de palha de cana.

Tabela 49 – Obtenção de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 17,4%, nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min e 15 min, a partir de lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Biomassa	Temperatura (°C)	Concentração (mg produto/g lignina)							
		Ácido fórmico		Ácido acético		Ácido Levulínico		Hidroximetilfurfural	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	10,22 ± 3,03	16,72 ± 1,26	8,29 ± 2,13	7,79 ± 0,06	2,25 ± 0,11	2,71 ± 0,54	0,35 ± 0,05	0,74 ± 0,09
	180	25,72 ± 0,12	22,86 ± 1,67	13,41 ± 1,97	11,90 ± 1,69	4,86 ± 1,07	3,55 ± 0,97	0,47 ± 0,06	0,97 ± 0,17
	210	19,85 ± 0,68	23,62 ± 2,77	9,05 ± 0,68	12,64 ± 2,13	2,95 ± 0,32	4,07 ± 0,28	0,85 ± 0,22	0,75 ± 0,04
	230	22,46 ± 2,04	35,07 ± 0,44	10,20 ± 1,11	17,38 ± 0,72	4,33 ± 1,38	2,72 ± 0,63	0,38 ± 0,11	0,16 ± 0,24
	250	41,91 ± 0,93	33,01 ± 0,76	37,53 ± 0,53	26,43 ± 0,25	3,82 ± 0,02	3,30 ± 0,90	0,39 ± 0,09	0,20 ± 0,10
Palha de cana	150	2,25 ± 0,02	3,76 ± 0,27	213,09 ± 87,63	204,31 ± 94,47	2,51 ± 0,19	3,67 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0,34 ± 0,04
	180	12,07 ± 0,46	4,81 ± 0,26	155,99 ± 63,18	58,09 ± 29,67	5,15 ± 0,18	1,76 ± 0,16	0,63 ± 0,12	0,82 ± 0,05
	210	6,51 ± 0,04	7,91 ± 0,62	120,83 ± 71,97	121,54 ± 52,62	3,62 ± 0,01	5,21 ± 0,08	0,36 ± 0,19	0,62 ± 0,14
	230	9,15 ± 0,32	10,15 ± 0,38	40,23 ± 36,32	292,15 ± 276,91	2,89 ± 3,65	3,94 ± 0,21	0,61 ± 0,46	0,67 ± 0,60
	250	5,33 ± 0,18	7,37 ± 0,47	78,31 ± 23,81	77,59 ± 5,34	3,01 ± 0,08	4,78 ± 0,40	0,97 ± 0,07	1,23 ± 0,20
Casca de café	150	18,30 ± 0,40	16,09 ± 0,21	11,95 ± 0,42	11,73 ± 0,69	4,55 ± 0,08	3,73 ± 0,18	0,27 ± 0,03	0,40 ± 0,01
	180	21,21 ± 0,03	11,18 ± 0,63	12,03 ± 0,50	12,71 ± 0,28	3,62 ± 0,06	1,92 ± 0,06	0,28 ± 0,07	0,31 ± 0,02
	210	15,98 ± 0,94	8,25 ± 1,73	14,40 ± 0,08	31,67 ± 21,30	2,89 ± 0,07	2,21 ± 0,06	0,32 ± 0,08	0,03 ± 0,01
	230	12,07 ± 1,95	10,11 ± 1,85	35,5 ± 6,94	17,57 ± 11,54	2,45 ± 0,05	1,53 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,19 ± 0,00
	250	18,53 ± 0,68	8,63 ± 0,27	59,04 ± 57,27	9,93 ± 0,63	2,66 ± 0,15	2,03 ± 0,10	0,28 ± 0,05	0,44 ± 0,21
		Furfural		<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído		Vanilina		Siringaldeído	
		5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
Bagaço de cana	150	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,18	0,39 ± 0,02 ^{i,j,k,l}	0,66 ± 0,04 ^{f,g,h}	0,57 ± 0,08 ^{k,l,m}	0,94 ± 0,07 ^{i,j,k}	0,81 ± 0,11 ^{f,g,h,i,j}	1,57 ± 0,42 ^{b,c,d}
	180	0,28 ± 0,23	0,11 ± 0,02	0,73 ± 0,01 ^{e,f,g}	1,15 ± 0,12 ^b	1,14 ± 0,04 ^{g,h,i,j}	1,72 ± 0,13 ^{b,c,d,e}	1,92 ± 0,09 ^{a,b}	2,22 ± 0,19 ^a
	210	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,82 ± 0,02 ^{c,d,e,f}	1,11 ± 0,05 ^b	1,24 ± 0,00 ^{f,g,h,i}	1,51 ± 0,11 ^{c,d,e,f,g}	1,29 ± 0,11 ^{d,e,f}	1,18 ± 0,09 ^{d,e,f,g}
	230	0,11 ± 0,02	0,19 ± 0,09	0,96 ± 0,13 ^{b,c,d,e}	1,64 ± 0,15 ^a	1,45 ± 0,14 ^{d,e,f,g,h}	2,64 ± 0,18 ^a	1,40 ± 0,32 ^{c,d,e}	1,81 ± 0,25 ^{a,b,c}
	250	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,14	0,32 ± 0,08 ^{i,j,k,l,m}	1,03 ± 0,03 ^{b,c,d}	0,45 ± 0,12 ^{l,m,n}	1,39 ± 0,16 ^{e,f,g,h}	0,35 ± 0,01 ^{i,j,k,l}	0,39 ± 0,03 ^{i,j,k,l}
Palha de cana	150	1,32 ± 1,79	1,00 ± 0,05	0,33 ± 0,02 ^{i,j,k,l,m}	0,59 ± 0,00 ^{f,g,h,i}	0,79 ± 0,11 ^{j,k,l}	1,06 ± 0,06 ^{h,i,j}	0,36 ± 0,03 ^{j,k,l}	0,72 ± 0,08 ^{g,h,i,j}
	180	0,31 ± 0,30	1,03 ± 0,03	0,75 ± 0,04 ^{e,f,g}	0,54 ± 0,04 ^{g,h,i,j}	1,64 ± 0,02 ^{b,c,d,e,f}	1,36 ± 0,06 ^{e,f,g,h,i}	0,98 ± 0,11 ^{e,f,h,i,j}	0,64 ± 0,02 ^{h,i,j}
	210	0,90 ± 0,12	0,43 ± 0,05	1,05 ± 0,02 ^{b,c}	0,24 ± 0,21 ^{k,l,m,n}	1,85 ± 0,05 ^{b,c,d}	1,15 ± 0,00 ^{g,h,i,j}	1,00 ± 0,07 ^{e,f,g,h}	0,51 ± 0,00 ^{i,j,k,l}
	230	0,15 ± 0,04	0,41 ± 0,11	0,8 ± 0,06 ^{d,e,f}	0,15 ± 0,00 ^{l,m,n}	1,95 ± 0,04 ^{b,c}	0,57 ± 0,02 ^{k,l,m}	0,71 ± 0,06 ^{g,h,i,j}	0,12 ± 0,01 ^{k,l}
	250	0,25 ± 0,03	0,37 ± 0,27	0,66 ± 0,13 ^{f,g,h}	0,46 ± 0,11 ^{h,i,j,k}	2,26 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,09 ^{m,n}	0,59 ± 0,14 ^{h,i,j,k}	0,14 ± 0,07 ^{k,l}
Casca de café	150	0,11 ± 0,01	0,34 ± 0,10	0,11 ± 0,00 ^{m,n}	0,13 ± 0,01 ^{l,m,n}	0,18 ± 0,01 ^{m,n}	0,2 ± 0,01 ^{m,n}	0,06 ± 0,01 ^l	0,06 ± 0,00 ^l
	180	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,06	0,17 ± 0,01 ^{l,m,n}	0,11 ± 0,01 ^{m,n}	0,25 ± 0,01 ^{m,n}	0,16 ± 0,01 ^{m,n}	0,08 ± 0,00 ^l	0,05 ± 0,01 ^l
	210	0,42 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,15 ± 0,02 ^{l,m,n}	0,07 ± 0,01 ⁿ	0,18 ± 0,01 ^{m,n}	0,15 ± 0,01 ^{m,n}	0,06 ± 0,01 ^l	0,09 ± 0,00 ^l
	230	0,28 ± 0,03	0,31 ± 0,01	0,14 ± 0,01 ^{l,m,n}	0,15 ± 0,00 ^{l,m,n}	0,16 ± 0,03 ^{m,n}	0,08 ± 0,01 ⁿ	0,07 ± 0,00 ^l	0,03 ± 0,00 ^l
	250	0,65 ± 0,18	0,68 ± 0,22	0,16 ± 0,02 ^{l,m,n}	0,09 ± 0,01 ^{m,n}	0,15 ± 0,02 ^{m,n}	0,04 ± 0,00 ⁿ	0,05 ± 0,00 ^l	0,04 ± 0,00 ^l

Figura 60 – Obtenção de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído após oxidação úmida em meio alcalino utilizando NaOH 17,4%, nas temperaturas de 150, 180, 210, 230 e 250 °C por 5 min (1) e 15 min (2), a partir de lignina de bagaço de cana (A), de palha de cana (B) e casca de café (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Para a casca de café, a reação com 5 min já se apresentou mais severa a partir de 180 °C, e para 15 min a partir de 150 °C. Máxima concentração de vanilina foi de 0,25 mg/g lignina (5 min, 180 °C) e de 0,20 mg/g lignina (15 min, 150 °C). Nessas condições, observou-se um favorecimento na formação de vanilina > *p*-hidroxibenzaldeído > siringaldeído.

Em todas as condições avaliadas, a lignina de casca de café foi a que apresentou os menores rendimentos, fato associado a sua estrutura mais condensada, maior teor de impurezas e menor proporção de unidades guaiacil. Ligninas com relativamente alta quantidade de ligações C-C quando comparado às ligações éter, são consideradas mais condensadas. Ligninas condensadas são frequentemente mais rígidas e menos propensas a degradação, já que a energia necessária para quebrar ligações C-C, como por exemplo β -5', e ligações éter como as β -O-4, é de 125-127 Kcal/mol e 54-72 Kcal/mol, respectivamente (PARTASARATHI et al., 2011).

No geral, essa condição de meio fortemente alcalino (1,5 g NaOH/g de biomassa) desfavoreceu a formação dos aldeídos aromáticos, e diminuiu a temperatura de degradação desses compostos. No entanto, a oxidação úmida, apesar de ter gerado rendimentos de vanilina menores do que o obtido na oxidação alcalina à temperatura de 98 °C por 90 min, favoreceu preferencialmente a oxidação das unidade guaiacil à vanilina, utilizando concentrações significativamente menores de H_2O_2 e tempos de reação bastante curtos, porém, temperaturas mais elevadas. O fato de se utilizar temperaturas mais elevadas do que as usualmente utilizadas, associado a um curto tempo de reação, não causou a oxidação excessiva da lignina e degradação dos aldeídos aromáticos, visto que as condições que apresentaram um maior rendimento ocorreram à temperaturas mais elevadas. Estudos de otimização dessas reações poderiam aumentar esse rendimento de vanilina, utilizando menores concentrações de agente oxidante o que é interessante no aspecto ambiental e econômico, e uma relação tempo versus temperatura que oferecessem o melhor custo-benefício.

Um estudo do efeito da temperatura no rendimento da reação de oxidação de lignina à vanilina demonstrou que temperaturas iniciais mais altas levaram a um maior rendimento de vanilina em um menor tempo de reação (RODRIGUES PINTO et al., 2012). Para este estudo, foi utilizado oxigênio molecular como agente oxidante, concentração inicial de lignina de 60 g/L, concentração de NaOH de 2 M, pressão de O_2 inicial de 3,7 bar, e temperaturas de 99, 108, 120 e 140 °C, obtendo-se a maior concentração de vanilina (em torno de 6,3 g/L) após 70 min quando utilizado a temperatura mais alta, seguido por 5 g/L de vanilina após 78 min quando utilizado 120 °C, e em torno de 3,8 e 3,0 g/L com 115 min quando utilizado 108 e 99 °C, respectivamente.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) das condições utilizadas na oxidação úmida para saber quais as variáveis exerceram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na obtenção de vanilina (Tabela 50). Verifica-se que todos os efeitos e as interações influenciam estatisticamente no rendimento de vanilina. Isso se deve ao fato da degradação e formação de vanilina ocorrer durante todo o tempo de reação.

Tabela 50 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicados ao processo de oxidação úmida em termos de produção de vanilina. Valores de $p < 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.

FV	GL	SQ	QM	F	P
Biomassa	2	37,457	18,7283	1826,65	0,000
NaOH	2	25,01	12,50	1219,54	0,000
Temperatura	4	4,18	1,05	101,95	0,000
Tempo	1	0,45	0,45	44,25	0,000
Biomassa * NaOH	4	9,19	2,30	224,15	0,000
Biomassa * Temperatura	8	4,28	0,53	52,16	0,000
Biomassa * Tempo	2	2,91	1,45	141,67	0,000
NaOH * Temperatura	8	3,26	0,41	39,80	0,000
NaOH * Tempo	2	1,70	0,85	82,81	0,000
Temperatura * Tempo	4	3,14	0,79	76,57	0,000
Biomassa * NaOH * Temperatura	16	2,77	0,17	16,91	0,000
Biomassa * NaOH * Tempo	4	3,33	0,83	81,21	0,000
Biomassa * Temperatura * Tempo	8	3,80	0,47	46,28	0,000
NaOH * Temperatura * Tempo	8	6,33	0,79	77,17	0,000
Biomassa * NaOH * Temperatura * Tempo	16	5,67	0,35	34,53	0,000
Resíduo	90	0,92	0,01		
Total	179	114,40			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

5.3.4.2 Análise de Ultravioleta

A Tabela 51 e Figura 61 apresentam o coeficiente de extinção das ligninas bagaço de cana (NaOH 11,6%, 250 °C, 5 min – LB2505), palha de cana (NaOH 11,6%, 250 °C, 5 min – LP2505) e casca de café (NaOH 11,6%, 230 °C, 5 min – LC2305), ligninas essas que apresentaram maior rendimento de vanilina via oxidação úmida. A determinação do coeficiente de extinção da lignina é um importante indicativo de mudanças estruturais e morfológicas causadas pelo grau de oxidação. Pôde-se verificar que os coeficientes de extinção da lignina de bagaço e de palha de cana diminuíram, indicando que houve abertura de anéis aromáticos durante o processo oxidativo. Essa diminuição foi maior para a lignina de bagaço, que foi também a que apresentou maior rendimento de vanilina, indicando que essa obtenção foi acompanhada de maior degradação da lignina. O coeficiente de extinção da lignina de casca de café pouco mudou, indicando que a oxidação sofrida foi bastante branda.

Tabela 51 – Coeficiente de extinção das ligninas após a oxidação úmida. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Amostra	ϵ lignina não oxidada ($L \cdot g^{-1}$)	R^2	ϵ oxidação úmida ($L \cdot g^{-1}$)	R^2
Bagaço de cana (LB2505)	$23,18 \pm 0,34^a$	0,9991	$16,95 \pm 1,08^c$	0,9999
Palha de cana (LP2505)	$23,67 \pm 0,38^a$	0,9999	$20,12 \pm 0,08^b$	0,9999
Casca de café (LC2305)	$21,18 \pm 1,01^{a,b}$	0,9995	$21,01 \pm 0,48^{a,b}$	0,9999

Figura 61 – Curvas de calibração medidas a 280 nm utilizadas para determinar o coeficiente de extinção das ligninas nas condições avaliadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.4.3 Análise de Infravermelho

Os espectros de FTIR das ligninas de bagaço e palha de cana, e casca de café após a oxidação úmida são mostrados na Figura 62. Os espectros foram normalizados na região de 1510 cm^{-1} e comparados com o espectro da respectiva lignina antes da oxidação, visando verificar as modificações estruturais ocorridas durante a oxidação úmida.

Pôde-se verificar que todos os espectros de infravermelho das ligninas oxidadas são semelhantes aos espectros das ligninas sem oxidar, apresentando bandas típicas de lignina. Comparando-se os espectros de lignina de bagaço é possível verificar que as bandas de absorção mostram-se bastante similares, com pequenos incrementos de absorção em determinadas regiões. Na região correspondente ao estiramento das hidroxilas (3416 cm^{-1}) verifica-se uma certa diminuição da absorção para as ligninas submetidas a oxidação, o que poderia estar associado com a ruptura de grupos fenólicos (SILVERSTEIN et al., 2005). O mesmo é observado para LP2505, porém em menor proporção, e para lignina de casca de café oxidada não houve mudança, acordando a variação observada dos coeficientes de extinção.

Figura 62 – Espectros no infravermelho das ligninas de bagaço e de palha de cana e de casca de café antes e após a oxidação úmida (região de 4000 a 400 cm^{-1}). Os números das bandas e regiões assinaladas se referem à Tabela 52.

Fonte: Arquivo pessoal.

Importantes regiões a serem avaliadas na lignina após um processo oxidativo estão associadas ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ de carboxilas e carbonilas não conjugadas (1710 cm^{-1}) e conjugadas (1600 cm^{-1}), relacionadas a banda na região dos aromáticos (1510 cm^{-1}), pois estas fornecem um indicativo da eficiência do processo oxidativo. Esses valores podem ser observados na Tabela 52, onde a banda na região de 1710 cm^{-1} aumentou para todas as biomassas, porém em pequenas proporções, indicando que houve oxidação. A banda na região de 1600 cm^{-1} pouco variou. Em todas as ligninas oxidadas é possível verificar uma menor proporção relativa de estruturas aromáticas, porém essa variação é maior para a lignina de bagaço, indicando a quebra de anel fenólico, conforme observado pelo cálculo dos coeficientes de extinção.

Tabela 52 – Atribuição de importantes bandas no espectro de infravermelho de lignina de bagaço e de palha de cana, e de casca de café (cm^{-1}) após oxidação úmida, seguido de sua respectiva absorbância (A) e absorbância relativa (%A).

Número no gráfico	Lignina de bagaço oxidada (FB2505)			Lignina de palha oxidada (FP2505)			Lignina de casca de café oxidada (FC2305)		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%
1	1715	0,79	53,1	1710	0,83	74,0	1709	1,52	83,6
2	1611	0,99	67,3	1610	0,83	73,8	1630	1,48	81,2
3	1515	1,00	67,6	1515	1,00	88,8	1515	1,00	55,1
	Lignina de bagaço sem oxidadar			Lignina de palha sem oxidadar			Lignina de casca de café sem oxidadar		
	cm^{-1}	A	A (%)	cm^{-1}	A	%	cm^{-1}	A	%
1	1697	0,62	52,02	1704	0,80	75,92	1703	1,29	78,80
2	1598	0,92	77,88	1602	0,88	83,09	1627	1,47	89,81
3	1513	1,00	84,36	1513	1,00	94,39	1516	1,04	63,35

Valores relativos das bandas de absorbância (%A) foram medidos a partir da linha base de espectro normalizado em $1505\text{-}1516\text{ cm}^{-1}$, admitindo como 100 a banda de maior intensidade.

Na região chamada de impressão digital ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) é possível verificar uma maior variação na intensidade da absorção de algumas bandas da lignina de bagaço, como uma diminuição da absorção da banda em 1334 cm^{-1} , e uma diminuição da banda em 1221 cm^{-1} tanto para a lignina de bagaço, como a de palha oxidada; para a lignina de casca de café oxidada pouca alteração foi observada nesse região.

5.3.5 Escolha da condição que favoreceu a obtenção de vanilina

Baseando-se nas condições oxidativas que converteram maior percentual de lignina em vanilina, definiram-se três ligninas oxidadas, uma de cada biomassa estudada, para dar prosseguimento com a etapa de aplicação da lignina residual de maior massa molar obtida durante a oxidação, visando o aproveitamento integral da biomassa. As ligninas selecionadas foram provenientes da oxidação em meio alcalino (NaOH 10%) utilizando H_2O_2 como agente oxidante, a $98\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 min (Figura 63). Para se avaliar o efeito do solvente orgânico utilizado na extração dos compostos aromáticos na fração líquida após a oxidação, foram avaliados o éter dietílico e o etanol. Não foi possível realizar a separação das fases quando utilizado o etanol, pois o mesmo forma uma emulsão com a fração aquosa e não se separa. O resultado dessa comparação está apresentado na Tabela 53 e ilustrado na Figura 64.

Figura 63 – Ilustração das ligninas de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C), antes (1) e após (2) a oxidação sob as condições que melhor favoreceram a obtenção de vanilina.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 53 – Avaliação da utilização de diferentes solventes orgânicos na extração dos compostos aromáticos após a oxidação alcalina da lignina de bagaço de cana, de palha de cana e casca de café, nas condições pré-definidas. As médias de cada composto com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Biomassa	H ₂ O ₂ (%)	NaOH (%)	Solvente de extração	Conversão de lignina em produto (mg produto/g lignina)			
				Ácido Vanílico	Ácido Siringico	Vanilina	Siringaldeído
Bagaço de cana	9,1	10	Diclorometano	1,28 ± 0,40 ^{c,d}	1,95 ± 0,25 ^b	8,13 ± 1,43 ^a	0,08 ± 0,02 ^c
	9,1	10	Éter dietílico	8,31 ± 0,75 ^a	4,93 ± 0,46 ^a	8,62 ± 0,47 ^a	2,26 ± 0,36 ^a
Palha de cana	6,1	10	Diclorometano	3,16 ± 0,27 ^b	2,28 ± 0,28 ^b	6,48 ± 0,57 ^a	0,21 ± 0,15 ^e
	6,1	10	Éter dietílico	8,51 ± 0,45 ^a	3,92 ± 0,36 ^a	8,05 ± 0,77 ^a	1,47 ± 0,17 ^b
Casca de café	9,1	10	Diclorometano	1,02 ± 0,03 ^d	0,37 ± 0,16 ^c	1,15 ± 0,26 ^b	0,00 ± 0,00 ^e
	9,1	10	Éter dietílico	2,74 ± 0,33 ^{b,c}	0,71 ± 0,08 ^c	1,16 ± 0,31 ^b	0,00 ± 0,00 ^e

Figura 64 – Ilustração do processo de extração dos compostos de baixa massa molar usando éter dietílico (1) e diclorometano (2) como solvente para lignina de bagaço de cana (A), de palha (B) e de casca de café (C) oxidadas sob as condições que melhor favoreceram a obtenção de vanilina.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se que a extração com éter dietílico não difere significativamente da extração com diclorometano em termos de vanilina. No entanto, éter dietílico extrai de maneira mais eficiente os demais compostos aromáticos avaliados.

Essas ligninas foram aplicadas na obtenção de matrizes para liberação controlada de herbicidas (item 5.4). Outras aplicações foram propostas para a lignina, tais como a aplicação dessas ligninas em compósitos termoplásticos de polipropileno reforçados com fibras naturais, avaliando o efeito compatibilizante da lignina entre a matriz polimérica apolar e a matriz celulósica polar, utilizando dessa forma também a polpa celulósica obtida durante a etapa de fracionamento da biomassa (OLIVEIRA; GONÇALVES, 2013), e a utilização dessas ligninas como substituinte parcial do fenol em resinas fenol-formaldeído para aplicação em tintas (CAPRI et al., 2014), trabalho este que foi contemplado com a primeira colocação no 15º Prêmio ABRAFATI de Ciência em Tintas (Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas), em 2013 e encontra-se com pedido de patente registrado. O texto detalhado não foi apresentado na tese.

5.4 Matriz para liberação controlada de herbicida

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), laboratório integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas – SP.

Os grânulos de liberação controlada foram obtidos por meio da mistura das ligninas de bagaço e palha de cana, e de casca de café, antes e depois da oxidação alcalina, com o herbicida Ametrina na proporção [1:1] (m/m), 180 °C, por 7 min. Foi utilizada uma temperatura mais elevada para garantir o ponto de amolecimento da lignina, mesmo superior à temperatura de fusão da ametrina de 92 °C. Como o tempo de contato é relativamente curto, a cinética de degradação é desacelerada, como mostram outros trabalhos realizados em condições semelhantes. A formulação utilizando lignina oxidada de casca de café na proporção 1:1 não adquiriu forma vítrea e homogênea, portanto, aumentou-se a proporção de herbicida:lignina para 2:1, e para efeitos comparativos, preparou-se também uma formulação 2:1 utilizando lignina de casca de café não oxidada.

A Figura 65 apresenta o aspecto físico das matrizes herbicida:lignina obtidas. Para facilitar o referenciamento, as matrizes foram denominadas de acordo com a lignina utilizada, e destacada a proporção dos componentes somente quando diferente da proporção padrão deste estudo (1:1), conforme segue: MLB (matriz utilizando lignina de bagaço), MLBO (matriz com lignina de bagaço oxidada), MLP (matriz com a lignina de palha), MLPO (matriz com lignina de palha oxidada), MLC (matriz com lignina de casca de café), MLC 2:1 (matriz com lignina de casca

de café com menor proporção de lignina), MLCO 2:1 (matriz com lignina de casca de café oxidada contendo menor proporção de lignina).

Figura 65 – Aspecto físico das matrizes herbicida:lignina obtidas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para se comparar o efeito de cada lignina utilizada na matriz, foi realizada a análise da liberação do herbicida em água (sistema estático). Amostras foram retiradas diariamente nos primeiros 10 dias, e posteriormente com 15, 20 e 50 dias. As amostras foram analisadas por espectroscopia de UV a 223 nm, onde foi observado o pico máximo de absorção da ametrina.

Do ponto de vista analítico, triazinas, como a ametrina, são quantificadas por técnicas cromatográficas (GAO et al., 2009). Hernández et al. (2014), buscando viabilizar técnicas mais simples e de menor custo, avaliou o uso de espectroscopia de UV para determinar hexazinona (herbicida pertencente ao grupo da triazina), e obteve resultados satisfatórios em termos de precisão. Mamián et al. (2009) utilizou UV para determinar a degradação da atrazina, outro herbicida pertencente ao grupos das triazinas. A Figura 66 apresenta as curvas da lignina de bagaço em água (0,005 g/L), da lignina de bagaço em meio alcalino (0,005 g/L), da ametrina em água (0,005 g/L), e da liberação do herbicida da matriz em água após 1, 10, 20 e 50 dias de liberação, demonstrando que o pico de absorção da lignina na região de 210 nm não está interferindo na medida do percentual de ametrina liberada em água. A ametrina é solúvel em pH neutro, enquanto a lignina é pouco solúvel em pH inferior a 11.

Figura 66 – Espectro de absorção da lignina de bagaço em meio alcalino (0,005 g/L), da lignina de bagaço em água (0,005 g/L), da ametrina em água (0,005 g/L), e da liberação do herbicida na matriz em água após 1, 10, 20 e 50 dias de liberação.

Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação do comportamento de uma formulação de liberação controlada em condições de campo é uma tarefa muito difícil. Muitos fatores, tais como, o tipo de solo, temperatura, umidade e pH, afetam a eficiência da formulação. Inicialmente é necessário estudar as formulações em laboratório. O estudo da liberação em água é uma maneira simples e precisa de se avaliar a taxa de liberação do ingrediente ativo em formulações de liberação controlada no laboratório (WILKINS, 1990). O percentual de liberação do herbicida a partir da matriz de lignina está apresentado na Tabela 54 e na Figura 67.

Tabela 54 – Média e desvios do percentual de liberação do herbicida das matrizes. As médias do período final de análise com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Tempo (h)	Ametrina total liberada (%)						
	MLB	MLBO	MLP	MLPO	MLC	MLC 2:1	MLCO 2:1
24	4,78 ± 0,25	2,93 ± 0,07	3,78 ± 0,27	2,26 ± 0,25	7,29 ± 0,04	5,59 ± 0,19	5,89 ± 0,23
48	8,98 ± 0,24	5,35 ± 0,21	7,91 ± 0,23	4,80 ± 0,41	13,95 ± 0,63	10,70 ± 0,94	11,70 ± 0,77
72	11,90 ± 0,43	7,32 ± 0,24	11,41 ± 0,68	6,83 ± 0,48	18,41 ± 0,82	15,20 ± 0,98	16,49 ± 1,63
96	13,71 ± 0,64	8,63 ± 0,33	13,38 ± 0,64	8,20 ± 0,60	21,41 ± 0,68	18,04 ± 1,42	19,73 ± 1,57
120	15,15 ± 0,81	9,60 ± 0,39	14,80 ± 0,69	9,17 ± 0,61	23,82 ± 0,84	20,25 ± 1,27	22,19 ± 1,68
144	16,65 ± 0,98	10,63 ± 0,45	16,55 ± 0,84	10,46 ± 1,01	26,02 ± 0,89	22,60 ± 1,11	24,89 ± 1,98
168	18,34 ± 1,13	11,87 ± 0,46	18,34 ± 0,73	11,74 ± 1,16	28,38 ± 1,20	25,24 ± 1,56	27,76 ± 2,2
192	19,77 ± 1,29	12,94 ± 0,48	19,70 ± 0,57	12,87 ± 1,14	30,39 ± 1,55	27,48 ± 1,64	30,00 ± 2,12
216	21,14 ± 1,47	13,96 ± 0,55	21,04 ± 0,48	13,96 ± 1,16	32,44 ± 1,49	29,61 ± 1,47	32,43 ± 2,43
240	22,36 ± 1,43	14,80 ± 0,72	22,26 ± 0,67	15,31 ± 1,60	34,37 ± 1,52	31,8 ± 1,59	34,87 ± 2,29
360	27,37 ± 1,85	18,66 ± 0,35	27,51 ± 0,64	19,65 ± 1,90	39,64 ± 2,19	38,41 ± 1,34	41,66 ± 2,56
480	30,44 ± 1,79	21,77 ± 0,57	31,13 ± 0,54	22,81 ± 2,05	43,91 ± 2,33	43,59 ± 1,47	46,98 ± 2,44
1200	40,66 ± 1,79 ^c	31,05 ± 1,03 ^d	40,89 ± 0,86 ^c	32,9 ± 1,74 ^d	51,00 ± 2,19 ^b	55,08 ± 0,52 ^{a,b}	55,28 ± 1,64 ^a

Figura 67 – Liberação do herbicida ametrina em água em função do tempo, a partir das matrizes MLB, MLBO, MLP, MLPO, MLC, MLC 2:1 e MLCO 2:1.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com os dados apresentados, pôde-se observar que em relação às matrizes que utilizaram lignina de bagaço e palha de cana, a biomassa pareceu não influir na taxa de liberação, sendo a oxidação da lignina a variável de maior influência, gerando um efeito retardatório na liberação desse herbicida de cerca de 24% e 19%, respectivamente. Possivelmente, o fato da lignina oxidada ser menos condensada possibilitou uma maior interação entre a molécula e o herbicida, fazendo com que essa liberação ocorresse de forma mais lenta. No entanto, quando se compara com a matriz MLC, verifica-se que a biomassa tem grande influência nessa liberação, sendo a liberação da matriz LC cerca de 21% mais rápida do que as matrizes MLB e MLP, e cerca de 63% mais rápida quando comparada às matrizes MLBO e MLPO. Vale ressaltar, que durante o período avaliado, em nenhuma das matrizes a liberação total do herbicida superou 60%, indicando que independente do modelo cinético, a liberação é prolongada. A influência desses fatores na taxa de liberação do herbicida pode ser observado pela Análise de Variância, conforme apresentado na Tabela 55. No caso das matrizes com lignina de casca de café, apesar da proporção entre o herbicida e a lignina não interferir significativamente no processo, foi observado um aumento da liberação da ametrina em torno de 8% quando utilizado maior proporção de herbicida.

Tabela 55 – ANOVA dos efeitos das variáveis aplicadas ao processo de liberação do herbicida em água. Valores de $P < 0,05$ indicam parâmetros estatisticamente significativos.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Biomassa	2	3135,6	1567,79	142,44	0,000
Oxidação da lignina	1	682	682,03	61,96	0,000
Proporção dos componentes	1	8,6	8,63	0,78	0,377
Tempo de reação	12	28628,3	2385,69	216,75	0,000
Resíduo	256	2817,7	11,01		
Total	272	41227,5			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

A liberação do ingrediente ativo depende das interações físico-químicas entre o defensivo agrícola, a matriz e a água, e também pode ser influenciada pelas condições de processamento. Cotrim et al. (1993), demonstraram que diferentes tipos de lignina e diferentes condições de processamento proporcionaram velocidades de liberação distintas para formulações contendo 2,4-D, diuron e ametrina. As diferenças observadas foram atribuídas às diferentes propriedades físicas e químicas das ligninas utilizadas, sendo que o desenvolvimento de formulações com ligninas de diferentes procedências pode ser útil no controle das velocidades de um determinado ingrediente ativo.

Isso pôde ser observado para lignina de casca de café, que possui um perfil bem diferente das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, o que tornaria seu emprego interessante em culturas que necessitem uma taxa de liberação mais rápida.

Uma taxa de liberação constante é o objetivo solicitado para muitas aplicações, o que seria sinônimo de uma taxa de liberação de ordem zero, a qual é bastante difícil de se obter (WILKINS, 1999). Admitindo-se o mecanismo de difusão para essa formulação, a cinética mais adequada para descrever a liberação do herbicida foi de ordem $\frac{1}{2}$, conforme representado pela equação de Higuchi (SOUZA, 1994). Os valores da constante aparente de difusão (equação 6), variável que é proporcional à velocidade de liberação do ingrediente ativo, foram empregadas neste trabalho com o objetivo de verificar as possíveis modificações ocorridas na formulação quando utilizado os diferentes tipos de ligninas.

$$Q = K t^{1/2} \quad (6)$$

Onde: Q= razão entre quantidade de ingrediente ativo liberado e quantidade inicial;

t= tempo (dias);

K= constante de difusão aparente.

A constante de difusão foi calculada desconsiderando o último ponto de amostragem (50 dias), pois o comportamento cinético não é mais regido por uma cinética de ordem meio, conforme prevê a equação 5, mas sim por uma cinética logarítmica.

A constante calculada com base na inclinação da curva (Figura 68) foi igual a 3,68, 2,70, 3,90, 2,98, 5,24, 5,54 e 6,00 dias^{-1/2} para as matrizes MLB, MLBO, MLP, MLPO, MLC, MLC 2:1 e MLCO 2:1, respectivamente, mostrando uma correlação satisfatória ($R^2 = 0,99, 1,00, 0,99, 1,00, 0,98, 1,00$ e $0,99$). As constantes de difusão acordam o que foi discutido, mostrando como a matriz MLC apresenta uma maior taxa de difusão, e portanto, uma maior velocidade de liberação do herbicida.

Figura 68 – Liberação da ametrina nas diferentes matrizes avaliadas (meio aquoso a $28 \pm 2^\circ\text{C}$).

Fonte: Arquivo pessoal.

De uma maneira geral, os testes preliminares proporcionaram a obtenção de matrizes capazes de liberar o herbicida com diferentes cinéticas, dependendo das propriedades e das proporções das ligninas empregadas, o que em termos práticos, poderia atender a necessidade de uma maior ou uma menor taxa de liberação em determinado cultivo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química das 3 biomassas in natura variou em termos de percentual de celulose (bagaço>palha>casca), de hemicelulose (palha>casca>bagaço) e de lignina (casca>palha>bagaço). As reações de pré-tratamento removeram preferencialmente a hemicelulose (76,6 à 86,5%), enquanto o tratamento alcalino removeu cerca de 80,81% à 85,46% da lignina remanescente, solubilizando preferencialmente a fração insolúvel. Apesar do bagaço de cana in natura ter apresentado cerca de 20% menos lignina do que a casca de café, cada kg de bagaço tratado gerou cerca de 0,1 kg de lignina, enquanto para casca de café cada kg de biomassa gerou 0,096 kg de lignina, e para a palha de cana foi gerado 0,09 kg de lignina.

As ligninas avaliadas apresentaram-se relativamente livres de polissacarídeos e contaminantes, exceto pela lignina de casca de café que apresentou um alto teor de extrativos (6,1%). As análises do coeficiente de extinção, de FTIR e de RMN indicaram que as ligninas de bagaço e de palha apresentaram maior quantidade de anéis aromáticos em sua estrutura quando comparada à lignina proveniente de casca de café, com predominância de ligações éter (β -O-4). As 3 ligninas são do tipo H/G/S, típico de gramíneas, com uma predominância de unidades siringil para a lignina de bagaço, guaiacil para a lignina de palha de cana, e hidroxil para a de casca de café. A lignina de casca de café apresentou uma estrutura mais condensada, com predominância de ligações C-C, o que posteriormente, associado a menor proporção de unidade G e S e maior presença de contaminantes, refletiu em um menor rendimento na conversão dessa lignina em compostos aromáticos.

Nas reações de oxidação avaliadas foi possível verificar a formação de aldeídos aromáticos de importância econômica, como por exemplo a vanilina, o siringaldeído, o *p*-hidroxibenzaldeído (ou de seu precursor ácido *p*-cumárico), e seus derivados, porém, com baixos rendimentos.

Nas oxidações utilizando lacase como agente oxidante, o maior rendimento de vanilina (1,76 mg/g lignina) foi obtido com a lignina de bagaço de cana a uma maior atividade enzimática (200 UI).

A oxidação em meio ácido apresentou as menores taxas de conversão à vanilina, com um rendimento máximo de 0,52 mg vanilina/g lignina quando utilizada lignina de palha de cana, H₂O₂ 9,1% e HCl 0,2 M.

A oxidação em meio alcalino utilizando H₂O₂ levou a maior conversão de lignina em aldeídos aromáticos, demonstrando a importância da concentração de OH⁻ na conversão da lignina em vanilina. A oxidação da lignina de bagaço de cana apresentou maior rendimento de vanilina quando utilizado H₂O₂ 9,1% e NaOH 10%, com uma conversão de 8,13 mg produto/g

lignina. Essas mesmas condições favoreceram a obtenção de vanilina a partir da lignina de casca de café, porém com um rendimento bastante inferior (1,15 mg vanilina/g lignina). A lignina de palha de cana em meio alcalino (NaOH 10%) demandou uma menor concentração de agente oxidante (H_2O_2 6,1%) para se obter um rendimento máximo de vanilina de 6,48 mg/g lignina.

Dentre os meios avaliados na oxidação úmida, o meio alcalino (NaOH 11,7%) aumentou o rendimento de vanilina em 2,5 vezes em relação ao máximo obtido em meio aquoso, e em 0,15 vezes em relação ao meio de maior alcalinidade (NaOH 17,4%); o rendimento máximo (3,01 mg vanilina/g lignina) foi obtido empregando-se lignina de bagaço de cana, a 250 °C por 5 min, o que pode ser interessante visto a menor concentração de H_2O_2 utilizada e o curto tempo de reação.

Neste trabalho, foram testadas condições de oxidações previamente estudadas em nosso grupo de pesquisa por se tratar de ligninas ainda pouco estudadas, especialmente as ligninas de palha de cana e de casca de café para obtenção de aldeídos aromáticos. A partir dos testes iniciais realizados e de conhecimento mais aprofundado sobre a estrutura dessas ligninas, muito poderá ser feito para otimizar a obtenção desses compostos, como por exemplo utilizar catalisadores. Outro ponto interessante seria avaliar a possibilidade de acoplar a reação de oxidação logo após a deslignificação alcalina, concentrando o licor negro, o que iria economizar gastos para alcalinizar e aquecer o meio, bem como, evitaria as etapas de precipitação, lavagem, secagem e maceração da lignina.

Foi possível o aproveitamento da lignina oxidada residual na obtenção de matrizes capazes de liberar o herbicida com diferentes cinéticas, dependendo das propriedades e das proporções das ligninas empregadas. Além disso, a oxidação da lignina de bagaço e palha de cana se mostrou bastante promissora, visto que ela retardou a liberação do herbicida em 20 a 24%, o que seria difícil de se obter utilizando somente diferentes proporções de lignina e herbicida, pois existe um limitante para se obter uma matriz homogênea e vítrea. Vale ressaltar, que apesar de não ter sido explorado mais a fundo neste trabalho, existe um potencial em utilizar essas ligninas em resinas fenólicas, o que foi reconhecido por meio da premiação recebida e da solicitação da patente.

Portanto, as diferentes propriedades das ligninas obtidas a partir das diferentes biomassas demonstram que seu potencial de aplicação é amplo, incluindo a obtenção de vanilina, oferecendo alternativas para auxiliar a viabilização de biorrefinarias no país, ao mesmo tempo que contribuiria na resolução de problemas com os resíduos sólidos gerados pela agroindústria, colaborando com um desenvolvimento sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, S. et al. Kinetics of the alkaline nitrobenzene oxidation of lignin in rice straw. **Chemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 17-21, 1992.

ADSUL, M. G. et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4304–4312, 2011.

ALEX, P.; KOSIKOVA, B.; PODSTRANSKA, G. The effect of blending lignin with polyethylene and polypropylene on physical properties. **Polymer**, v. 41, n. 13, p. 4901–4908, 2000.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2009.

AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 277–299, 2001.

ANTUNES, C. S. A. et al. Early stages in the TiO₂-photocatalyzed degradation of simple phenolic and non-phenolic lignin model compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 163, n. 3, p. 453, 2004.

APTA – AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/cana>>. Acesso em: 10 de novembro de 2010.

ARAÚJO, J. D. P. **Production of vanillin from lignin present in the Kraft black liquor of the pulp and paper industry**. 2008. Ph. D. Thesis (Physics) - FEUP Department of Physics Engineering, University of Porto, Porto, Portugal, 2008.

ARAÚJO, J. D. P.; GRANDE, C. A.; RODRIGUES, A. E. Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 8, p. 1024-1032, 2010.

ARAÚJO, J. R.; WALDMAN, W. R., DE PAOLI, M. A. Thermal properties of high density reinforced with natural fibres: effect of the coupling agent. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1770-1775, 2008.

ARGYROPOULOS, D. S. (Ed.). **Oxidative delignification chemistry: fundamentals and catalysis**. Washington, DC: American Chemical Society, 2001. 785 p.

ALESP - ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Lei nº 11.241**, de 19 set. 2002. Disponível em: <<http://www.al.sp.gov.br/legislacao/norma.do?id=217>>. Acesso em: 05 abril de 2011.

AUGUSTINE, A. J. et al. Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. **Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 2036-45, 2008.

BACKA, S.; ANDRSEN, M.; ROJAHN, T. Biorefineries using wood for production of speciality cellulose fibers, lignosulfonates, vanillin, bioethanol and biogas - the Borregaard Sarpsborg example. In: DAHLQUIST, E. (Ed.). **Biomass as energy source: resources, systems and applications**. London: Taylor & Francis Group, 2013. cap. 8, p. 144-172.

BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Z. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

BAUCHER, M. et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 17 p. 125-197, 1998.

BELKACEMI, K.; TURCOTTE, G.; SAVOITE, P. Aqueous/steam-fractionated agricultural residues as substrates for ethanol production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 173–179, 2002.

BERGGREN, R. et al. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.255–264, 2003.

BERNDES, G.; HOOGWIJK, M.; VAN DEN BROEK, R. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass Bioenergy**, v. 25, p. 1–28, 2003.

BJØRSVIK, H. R.; MINISCI, F. Fine Chemicals from lignosulfonates. 1. Synthesis of vanillin by oxidation of lignosulfonates. **Organic Process Research & Development**, v. 3, p. 330-340, 1999.

BJØRSVIK, H. R.; LIGUORI, L. Organic processes to pharmaceutical chemicals based on fine chemicals from lignosulfonates. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 3, p. 279-290, 2002.

BJØRSVIK, H.R.; LIGUORI, L.; MINISCI, F. High selectivity in the oxidation of mandelic acid derivatives and in o-methylation of protocatechualdehyde: new process for synthesis of vanillin, iso-vanillin and heliotropin. **Organic Process Research & Development**, v. 4, p. 534–543, 2000.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BORGES DA SILVA, E. A. et al. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p. 1276-1292, 2009.

BORREGAARD INGREDIENTS, 2009. Disponível em:< <http://www.borregaard.com/>>. Acesso em: 03 de agosto de 2012.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1379, p. 381-390, 1998.

BOZELL, J. J. et al. **Top value added candidates from biomass**. Richland, WA: Pacific Northwest National Laboratory, 2007. v. 2.

BRASIL (a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Vegetal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 02 de abril de 2015.

BRASIL (b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Vegetal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/caffe>>. Acesso em: 02 de abril de 2015.

BRENDA. Enzyme Database – Brenda. Disponível em:

< http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=1.10.3.2>. Acesso em: 20 de outubro de 2012.

CAFÉ BRASIL. Classificação do café. Disponível em: <<http://www.cafebrasil.com.br>>. Acesso em 25 jun. 2007.

CALABRIA, G. M. M.; GONÇALVES, A. R. Obtainment of chelating agents through the enzymatic oxidation of lignins by phenol oxidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1-3, p. 320-325, 2006.

CALABRIA, G. M. M.; GONÇALVES, A. R. Oxidação enzimática da lignina utilizando a enzima polifenoloxidase extraída de batata. In: VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 6, 2004, Rio de Janeiro - RJ, p. 222.

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

CANILHA, L. et al. Xylitol bioproduction from wheat straw: process engineering and technical feasibility. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 22-71, 2008.

CAPANEMA, E. A.; BALAKSHIN, M. Y.; KADLA, J. F. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 25, p. 9639-9649, 2005.

CAPRI, M. R.; OLIVEIRA, F. C.; PINTO, A. C.; CAPRI NETO, A.; GONÇALVES, A. R. Pesquisadores mostram soluções para uso de matérias-primas renováveis. **Revista ABRAFATI**, v. 22, n. 98, 2014

CARA, C. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by stem explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 423-429, 2006.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 22, n. 12, 1992.

CARVALHO, W. et al. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 131–141, 2004.

CHATEL, G.; ROGERS, R. D. Review: oxidation of lignin using ionic liquids - an innovative strategy to produce renewable chemicals. **ACS sustainable chemistry & engineering**, v. 2, n. 3, p. 322-339, 2014.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; LÓPEZ CONTRERAS, A. M.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 741–755, 1999.

CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. (Ed.). **Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helms, 1985. 458 p.

COBOS, D. D. et al. Obtención de vainillina a partir de bagazo de caña de azúcar. **Tecnología y Ciencia**, v. 6, n. 2, p. 32-38, 1990.

COLLINSON, S. R.; THIELEMANS, W. The catalytic oxidation of biomass to new materials focusing on starch, cellulose and lignin. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 1854-1870, 2010.

COMPANY INFORMATION BOOKLET. Kenya Planters Cooperation Union (KPCU), Factory Data, Nairobi, Kenya, 1996.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segundo Levantamento Safra 2011/2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_16_08_47_43_boletim_setembro_2014.pdf> Acesso em: 10 de dezembro de 2014.

CONVERSE A. O.; WARE, W. **On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis**. In: IEA/BIOFOR WORKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, 18 a 20 out., 1994, Ottawa – Canadá.

CORREDOR, D. Y. **Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass**. 2008. Ph. D. Thesis (Biology) - Department of Biological & Agricultural Engineering, Kansas State University, Manhattan, 2008.

COTRIM, A. R. The influence of different lignins on the controlled - release of 2, 4-d and Ametrin herbicides. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3., 1993, Brasil. **Proceedings...** Brasil: UFMG, 1993. p. 278-281.

COTTERILL, J. V.; WILKINS, R. M.; DA SILVA, A. F. T. Controlled release of diuron from granules based on a lignin matrix system. **Journal of Controlled Release**, v. 40, p. 133-142, 1996.

CRESTINI, C.; ARGYROPOULOS, D. S. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ³¹P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and a-O-4 substructures. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1212-1219, 1997.

CRESTINI, C.; CRUCIANELLI, M.; ORLANDI, M.; SALADINO, R. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. **Catalysis Today**, v. 156, n. 1-2, p. 8-22, 2010.

CUNHA, H. C. M. **Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana prétratado por explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos**. 2005. 196 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo, 2005.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Production of vanillin: a biotechnological opportunity. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.

DAVIN, L. B. et al. Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Products Report**, v. 25, p. 1015, 2008.

DAVIS, L. et al. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, n. 1, p. 49-59, 2005.

DENCE, C. W. Chemistry of mechanical pulp bleaching. In: DENCE, C. W., REEVE, D. W. (Ed.), **Pulp bleaching: principle and practice**. Atlanta: Tappi Press, 1996. cap. 3. p. 161-182.

DENG, H.; LIN, L.; LIU, S. Catalysis of Cu-doped Co-based perovskite: type oxide in wet oxidation of lignin to produce aromatic aldehydes. **Energy Fuels**, v.24, n.9, p. 4797-4802, 2010.

DING, T. Y.; HUI, S. L.; ONG, L. G. A. Comparison of pretreatment strategies for conversion of coconut husk fiber to fermentable sugars. **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 1540-1547, 2012.

DOCQUIER, S. Beneficial use of lignosulfonates in in vitro plant cultures: stimulation of growth, of multiplication and of rooting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 3, p. 285-291, 2007.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 259-276, 2011.

DOMTAR LIMITED (USA), Harry Borden Marshall, Donald L. Vincent. **Production of Syringaldehyde from Hardwood Waste Pulping Liquors**. US 4075248 A, 7 Sep. 1976, 21 Feb, 1978.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57 p. 859-73, 2001.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do café orgânico**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 20 de junho de 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Ed. Educ, 2004.

ESPOSITO, L. J. et al. Vanillin. In: KROSCWITZ, J. L. (Ed.), **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. cap. 24, p. 812–825.

FABBRI, C.; AURISICCHI, C.; OSVALDO, L. Iron porphyrins-catalysed oxidation of α -alkyl substituted mono and dimethoxylated benzyl alcohols. **Central European Journal of Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 145-153, 2008.

FAIX, O. Fourier transform infrared spectroscopy. In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Ed.) **Methods in lignin chemistry**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. cap. 3, p. 83-109.

FAN, L. et al. Cultivation of pleurotus mushroom on Brazilian coffee husk and its effect on caffeine and tannic acid. **Micologia Aplicada International**, v. 15, p. 15-21, 2003.

FARGUES, C.; MATHIAS, A. A.; RODRIGUES, A. Kinetics of vanillin production from kraft lignin oxidation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, n. 1, p. 28-36, 1996a.

FARGUES, C. et al. Kinetics of vanillin oxidation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 19, n. 2, p. 127-136, 1996b.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por Aspergillus niger e Penicillium sp. Em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERGUS, B. J.; PROCTER, J. A. N.; SCOTT, GORING, D. A. I. The distribution of lignin in sprucewood as determined by ultraviolet microscopy. **Wood Science and Technology**, v. 3, p. 117-138, 1969.

FERNANDO, S. et al. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. **Energy Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1727–1737, 2006.

FERRAZ, A. et al. Biodegradation of acydolysis lignins from chilean hardwoods by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 8, p. 545-548, 1997.

FERRAZ, A. et al. Controlled release of 2,4-D from granule matrix formulations based on six lignins. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 2001-212, 1997.

FERRAZ, F. D. O; SILVA, S. S. D. Characterization of coffee husk biomass for biotechnological purposes. **New Biotechnology**, v. 25, p. 256, 2009.

FITZPATRICK, M. et al. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915 - 8922, 2010.

FRANCA A. S.; OLIVEIRA L. S. Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. In: COLUMBUS F. (Ed.). **Agricultural wastes**. New York: Nova Publishers, 2009. cap. 8, p. 155-189.

FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Phenolic resins and composites. In: NICOLAIS, L.; BORZACHIELLO, A.; LEE, S. M. (Ed.). **Wiley Encyclopedia of Composites**, 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. p. 2059-2068.

GAMBARATO, B. C. **Isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana-de-açúcar**. 2014, 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

GAO, Y. et al. Determination of triazine herbicides in aqueous samples using solidification of a floating drop for liquid-phase micro-extraction with liquid chromatography. **Analytical Letters**, v. 42, n. 11, p. 1620-1631, 2009.

GARCIA, M. A. et al. Use of kraft pine lignin in controlled-release fertilizer formulations. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 245-249, 1996.

GASPAR, A. R. et al. Alternatives for lignocellulosic pulp delignification using polyoxometalates and oxygen: a review. **Green Chemistry**, v. 9, p. 717–730, 2007.

GELLERSTEDT, G. A.; MAJTNEROVA, A.; ZHANG, L. Towards a new concept of lignin condensation in Kraft pulping. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 817-826, 2004.

GLASSER, W. G. Preliminary evaluation of an H₂SO₄ wood-saccharification lignin for use in phenolic resins. **Biomass**, v. 13, p. 235-254, 1987.

GOGOTOV, A. F. Use of lignin derivatives as oxidants for production of aromatic aldehydes from lignin. **Zhurnal prikladnoi khimii**, v. 73, n. 3, p. 545-547, 2000.

GOHEEN, D. W. Chemicals from lignin. In: GOLDSTEIN, I. S. (Ed.). **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981. cap. 8, p. 143–162.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V; LUDWIG, C. H. (Ed). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971. p. 241-266.

GÓMEZ, E. O.; PÉREZ, J. M. M.; PÉREZ, L. E. B. Pirólise rápida de materiais lignocelulósicos para a obtenção de bio-óleo. In: CORTEZ BARBOSA, L. A.; SILVA LORA, E. E.; GÓMEZ, E. O. (Ed.). **Biomassa para energia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2008. cap 11, p. 353-416.

GOMIDE, J. L. et al. Caracterização tecnológica para produção de celulose da nova geração de clones de Eucalyptus do Brasil. **Revista Árvore**, v. 29, n. 1, p. 129-137, 2005.

GONÇALVES, A. R. et al. Oxidation of lignin model dimmers with molecular oxygen in acidic media. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WOOD AND PULPING CHEMISTRY, 8., 1995, Helsinki. **Proceedings...** Helsinki, 1995. v. 2, p. 331- 336.

GONÇALVES, A. R. et al. Piassava Fibers (*Attalea funifera*): NMR Spectroscopy of their Lignin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 491-494, 2000.

GONÇALVES, A. R. **Oxidação de ligninas e modelos de lignina com oxigênio molecular em meio ácido**. 1995. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

GONÇALVES, A. R.; BENAR, P. Hydroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of products. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 2, p. 103-111, 2001.

GONÇALVES, A. R.; LABAT, G. A. A. Spectroscopy analysis in uv-visible of the sugarcane bagasse lignin oxidation obtained by steam explosion. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 8, 2004, São Pedro-SP, **Proceedings...**, São Pedro-SP, 2004. p.125-127.

GONÇALVES, A. R.; LUZ, S. M. Oxidation of Kraft lignin and liquor using oxygen and application in the removal of metals from aqueous solutions. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2001, Lorena-SP. **Anais...** Lorena, Sp, 2001. v. 6, p. 345-347.

GONÇALVES, A. R.; SCHUCHARDT, U. A. Oxidation of organosolv lignins in acetic acid - Influence of oxygen pressure. **Biotechnology and Applied Biotechnology**, v. 77, n. 9, p. 127-132, 1999.

GOUVEA, B. M. et al. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1315-1319, 2009.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6p. 1500-1503, 2009.

GUNDERSEN, S. A; SAETHER, O.; SJOBLUM, J. Salt effects on lignosulfonate and kraft lignin stabilized O/W-emulsions studied by means of electrical conductivity and video-enhanced microscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 186, n. 3, p. 141-153, 2001.

HALL, D. O. Biomass energy in industrialised countries-a view of the future. **Forest Ecology and Management**, v. 91, p. 17-45, 1997.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels Bioprod Bioref.**, v. 5, p. 215 – 225, 2011.

HAMELINCK, C.N.; FAAL, A. P. C. Outlook for advanced biofuels. **Energy Policy**, v. 34, p. 3268–83, 2005.

HE, Y. et al. Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 4, p. 2775-2781, 2008.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HERMANS, I. et al. Selective oxidation catalysis: opportunities and challenges. **Topics Catalysis**, v. 52, p. 1162-1174, 2009.

HERRERA, F. J. G. et al. Lignin based formulations to prevent pesticides pollution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 220-225, 2009.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. **Wood Science Technology**, v. 24, p. 23-63, 1990.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell wall. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. M. (Ed.). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications**, Boca Raton: CRC Press, 1980. cap. 1, p. 1-20.

HOAREAU, W. et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 567-576, 2004.

HOCKING, M. B. Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. **Journal of Chemical Education**, v. 74, p. 1055-1059, 1997.

HON, D. N. S.; SHIRAIISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. New York: Marcel Dekker. 1991.

HONGZHANG, C. E.; LIYING, L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 666-676, 2007.

HULLEMAN, S. H. D.; VAN HAZENDONK, J. M.; VAN DAM, J. E. G. Determination of crystallinity in native cellulose from higher plants with diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 261, n. 1, p. 163–172, 1994.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA), 2009. Disponível em: < <http://www.iea.org/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2009.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Key world energy statistics**. 2011. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key_world_eergy_stats-1.pdf>. Acesso em: 29 de agosto de 2012

IPT – INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. 2006. Disponível em: < www.ipt.br/institucional/imprensa>. Acesso em: 10 de janeiro de 2010.

JAYARAMUDU, J.; GUDURI, B. R.; RAJULU, A. V. Characterization of new natural cellulosic fabric *Grewia tilifolia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 847-851, 2010.

Jl, Y. **Kinetics and mechanism of oxygen delignification**. 2007. Ph. D. Thesis (Chemistry) - Department of Chemical and Biological Engineering, University of Maine, Orono, 2007.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibers and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 343-364, 2008.

KAČURÁKOVÁ, M. et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectin polysaccharide and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2000.

KADAM, K. L.; CHIN, C. Y.; BROWN, L. W. Environ. Continuous biomass fractionation process for producing ethanol and low-molecular-weight lignin. **Sustainable Energy**, v. 28, n. 1, p. 89-99, 2009.

KADLA, J.; CHANG, H.; JAMEEL, H. The reactions of lignins with high temperature hydrogen peroxide. Part 2. The oxidation of Kraft lignin. **Holzforschung**, v. 53, n. 3, p. 277-284, 1999.

KAGAWA, S.; ROKUGAWA, M. Studies on the utilization of alkali lignin (part 3) On the preparation of vanillin by air oxidation. **Japan Tappi Journal**, v. 46, p. 506-511, 1971.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiol and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

KAMM, B.; SCHOENICKE, P.; KAMM, M. Biorefining of green biomass - technical and energetic considerations. **Clean-Soil Air Water**, v. 37, n. 1, p. 27-30, 2004.

KANEKO, M. et al. Photoelectrochemical reaction of biomass and bio-related compounds with nanoporous TiO₂ film photoanode and O₂-reducing cathode. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 2, p. 336-340, 2006.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-44, 2006.

KHABAROV, Y. G.; KOSHUTINA, N. N.; SHERGIN, A. E. Manufacture of alkali-soluble iron chelates with nitrosated lignosulfonic acid. **RU 2**, v. 165, p. 936-941, 2001.

KIM, J.; YUN, S.; OUNAIES, Z. Discovery of cellulose as a smart material. **Macromolecules**, v. 39, p. 4202-4206, 2006.

KIM, K. H. Two-stage dilute acid-catalyzed hydrolytic conversion of softwood sawdust into sugars fermentable by ethanologenic microorganisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2461-2470, 2005.

KINDSIGO, M.; HAUTANIEMI, M.; KALLAS, J. Wet oxidation of recalcitrant lignin water solutions: experimental and reaction kinetics. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 2, p. 155-160, 2009.

KINDSIGO, M.; KALLAS, J. Degradation of lignins by wet oxidation: model water solutions. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 132-44, 2006.

KIRK, T.K.; FARELL, R.L. Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRUTHIKA, A. V.; VELURAJA, K. Experimental studies on the physico-chemical properties of banana fibre from various varieties. **Fibers and Polymers**, v. 10, n. 2, p. 193-199, 2009.

KLEINERT, M.; BARTH, T. Phenols from lignin. **Chemical Engineering Technology**, v. 31, n. 5, p. 736-745, 2008.

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 281-300, 2003.

KRISTENSEN, J. B. et al. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 5, p. 1-9, 2008.

KRUTOV, S. M. et al. Lignin wastes: past, present, and future. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 84, n. 13, p. 2632-2642, 2014.

KUBO, S.; KADLA, J. F. Hydrogen bonding in lignin: a Fourier transform infrared model compound study. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2815-2821, 2005.

LABAT, G. A. A. **Estudo cinético da oxidação de ligninas obtidas da palha e do bagaço de cana e aplicações de lignina de bagaço em resinas à base de materiais naturais**. 2008. 96 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

LABAT, G. A. A.; GONÇALVES, A. R. Oxidation in acidic medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 151-161, 2008.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266-1290, 2013.

LEÃO, R. M. **Tratamento superficial de fibra de coco e aplicação em materiais compósitos como. Reforço do polipropileno**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Mecânicas) - Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LEBO, S. E.; GARGULAK, J. D.; TIMOTHY, J. M. Lignin. In: OTHMER, K. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 1, p. 1-32.

LI, C. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4900-4906, 2010.

LIGNOTECH (USA). Stuart E. Lebo. **Methods for producing improved pesticides**. US005529772A, 9 Jun. 1994, 25 Jun. 1996.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.

LOE, Ø.; Høgmøen, H. Vanillin from wood: A CO₂-friendly and sustainable bio-chemical. **Specialty Chemicals**, v. 30-31, 2011.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 10, p. 39-48, 2002.

LUCK, F. A review of industrial catalytic wet air oxidation processes. **Catalysis Today**, v. 27, n. 1-2, p. 195-202, 1996.

LYND, L.R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 577-583, 2005.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1427-1445, 2015.

MAMIÁN, M.; TORRES, W.; LARMAT, F. E. Electrochemical Degradation of Atrazine in Aqueous Solution. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2009.

MANCHAND, P. S. et al. Syntheses of antibacterial 2,4-diamino-5-benzylpyrimidines. Ormetoprim and trimethoprim. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 3531–3535, 1992.

MARIANO, A. P. et al. Butanol production in a first-generation Brazilian sugarcane biorefinery: technical aspects and economics of greenfield projects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 316-323, 2013.

MARTIN, R.S.; PEREZ, C.; BRIONES, R. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 217- 223, 1995.

MATHIAS, A. L.; LOPRETTIT, M. I.; RODRIGUES, A. E. Chemical and biological oxidation of *Pinus pinaster* lignin for the production of vanillin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, n. 3, p. 225-234, 1995.

MATHIAS, A. L.; RODRIGUES, A. E. Production of vanillin by oxidation of pine Kraft lignins with oxygen. **Holzforschung**, v. 49, p. 273–278, 1995.

MATHIAS, A. L. **Produção de vanilina a partir da lenhina: estudo cinetico e do processo**. 1993. Ph. D. Thesis (Physics) - FEUP Department of Physics Engineering, University of Porto, Porto, Portugal, 1993.

MATSUSHITA, Y. et al. Surface characteristics of phenol–formaldehyde–lignin resin determined by contact angle measurement and inverse gas chromatography. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 115-121, 2006.

MAYER, A. M. Poluphenoloxidases in plants: recent progress. **Phytochemistry**, v. 6, p. 11-20, 1987.

MAZIERO, P. et al. Features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 61- 69, 2012.

MAZIERO, P.; GONÇALVES, A. R. Obtenção de produtos de maior valor agregado provenientes do aproveitamento de resíduos da agroindústria – Conceito de biorefinaria. **Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia**, 2009.

MCDUGALL, G. J. et al. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 1-20, 1993.

MEIER, J. N. et al. Effects of lignosulfonate-fertilizer applications on soil respiration and nitrogen dynamics. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 73, n. 2, p. 233-242, 1993.

MENON, H.; RAGAUSKAS, A. J. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MISHRA, V. S.; MAHAJANI, V. V.; JOSHI, J. B. Wet air oxidation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 2-48, 1995.

MORIYA, R. Y. **Uso de xilanases e lacases de microorganismos no branqueamento de polpas organosolv de palha de cana-de-açúcar e estudo dos derivados celulósicos obtidos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena, SP, 2007.

MOROHOSHI, N. Chemical characterization of wood and its components. In: HON, D. N. S.; SHIRAIISHI, N. (Ed.). **Wood and cellulosic chemistry**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 8, p. 331-394.

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

MOUSAVIOUN, P., DOHERTY, W. O. S. Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 52-58, 2009.

MULDER, W.J. et al. Lignin based controlled release coatings. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 915-920, 2011.

MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13-24, 2014.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012.

NASCIMENTO, R. A. A. **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: Identificação dos compostos de degradação e reações envolvidas**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

NAVYA, P. N.; MURTHY, P. S. Production, statistical optimization and application of endoglucanase from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 36, n. 8, p. 1115-1123, 2012.

NEDLAC - National Economic and Development Council. **Part 3- aroma chemicals from petrochemical feedstocks, industry and market analysis - vanillin**. 2004. Disponível em: < <http://www.nedlac.org.za/media/5965/key.pdf>>. Acesso em 20 jul., 2012.

NELSON, M. L.; O'CONNOR, R. T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and of amorphous cellulose. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 8, n. 3, p. 1311-1324, 1964a.

NELSON, M. L.; O'CONNOR, R. T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and of amorphous cellulose. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 8, n. 3, p. 1325-1341, 1964b.

NIEMI, K.; KEVERS, C.; HAEGGMAN, H. Lignosulfonate promotes the interaction between scots pine and an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* in vitro. **Plant and Soil**, v. 271, n. 1-2, p. 243-249, 2005.

NIMZ, H. et al. C-13 Spectra of lignins 8. Structural differences between lignins of hardwood, softwoods and compression wood. **Holzforchung**, v. 35, n. 1, p. 16-26, 1981.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2005.

NORGREN, M.; EDLUND, H.; WÅGBERG, L. Aggregation of lignin derivatives under alkaline conditions. Kinetics and aggregate structure. **Langmuir**, v. 18, p. 2859-2865, 2002.

NREL – NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 15 de junho de 2011.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 659-664, 2009.

OHGREN, K. et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; CRUZ, A. J. G.; COSTA, C. B. B. Improving second generation bioethanol production in sugarcane biorefineries through energy integration. **Applied Thermal Engineering**, 2014.

OLIVEIRA, F. C. ; GONCALVES, A. R. Oxidized sugarcane bagasse and coffee husk lignin as compatibilizing agent for natural fiber reinforced thermoplastic composites. In: EUROPEAN BIOMASS CONFERENCE AND EXHIBITION (EU BC&E 2013), 21. 2013, Copenhagen. European Biomass Conference and Exhibition **Proceedings...**, 2013. p. 1570-1577

OLIVEIRA, L. R. M. **Estudo de alternativas viáveis de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose**. 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia industrial) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

OLIVEIRA, L. S. et al. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3244–3250, 2008.

PACHECO, S. M. V.; FURIGO J. R., A.; MORGADO, A. F. Uma revisão sobre rotas sintéticas e biotecnológicas para produção de vanilina. **Periódico Tchê Química**, v. 4, n. 8, p.45-55, 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 25-33, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000.

PARK, Y. et al. Developing lignin-based resin coatings and composites. **Industrial crops and products**, v. 27, p. 163-167, 2008.

PARTENHEIMER, W. The aerobic oxidative cleavage of lignin to produce hydroxy-aromatic benzaldehydes and carboxylic acids via metal/bromide catalysts in acetic acid/ water mixtures. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 351, n. 3, p. 456-466, 2009.

PARTENHEIMER, W. The aerobic oxidative cleavage of lignin to produce hydroxyaromatic benzaldehydes and carboxylic acids via metal/bromide catalysts in acetic acid/water mixtures. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 351, p. 456, 2009.

PASQUINI, D. et al. Surface morphology and molecular organization of lignins in Langmuir - Blodgett films. **Langmuir**, v. 18, p. 6593, 2002.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane baggase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PEREIRA, F. M. et al. Estimation of solubility effect on the herbicide controlled-release kinetics from lignin-based formulations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 108, p. 913-920, 2003.

PEREIRA, S. C et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 44, p. 2-16, 2015.

PÉREZ, M. F. et al. Prevention of chloridazon and metribuzin pollution using lignin-based formulations. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1412-1419, 2010.

PERLACK, R. D.; WRIGHT, L. L.; TURHOLLOW, A. F.; GRAHAM, R. L.; STOKES, B. J.; ERBACH, D. C. U. S. Department of Energy, Biomass as Feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply, 2005.

PICCOLO, C.; BEZZO, F. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocelluloses. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 3, p. 478-491, 2009.

PINTO RODRIGUES, P. C.; BORGES DA SILVA, E. A.; RODRIGUES, A. Lignin as source of fine chemicals: vanillin and syringaldehyde. In: BASKAR, C.; BASKAR, S.; DHILLON, R. S. (Ed.). Biomass conversion: the interface of biotechnology, chemistry and materials science. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. cap. 12, p. 381-420.

PINTO, P. R.; BORGES DA SILVA, E. A.; RODRIGUES, A. E. Insights into oxidative conversion of lignin to high-added-value phenolic aldehydes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 2, p. 741-748, 2011.

PRADE, L.; HUBER, R.; BIESELER, B. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase- explanations for the selectivity of the enzyme in plants. **Structure**, v. 6, n. 11, p. 1445-1452, 1998.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBUCHER, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 296-314, 2001.

PU, Y.; HALLAC, B.; RAGAUSKAS, A. J. Plant biomass characterization: Application of solution and solid-state NMR spectroscopy. In: WYMAN, C. E.; WILEY, J. (Ed.). **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. cap. 18, p. 369-390.

PYE, E. K. Industrial lignin production and applications. In: KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. (Ed.). **Biorefineries: industrial processes and products**. Weinheim: WILEY-VCH, 2008. p. 165-200.

RAGNAR, M.; LINDGREN, C. T.; NILVEBRANT, N. O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 20, n. 3, p. 277-305, 2000.

RALPH, J. et al. Solution-state NMR of lignins. In: ARGYROPOULOS, D. S. (Ed.). **Advances in lignocellulosics characterization**. Atlanta: Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1999. cap. 3, p. 55-108.

RALPH, J. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29, 2004.

RAMIRES, E. C. et al. Valorization of an industrial organosolv-sugarcane bagasse lignin: characterization and use as a matrix in biobased composites reinforced with sisal fibers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 4, p. 612-621, 2010.

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

REICHERT, J. S.; CAMBELL, D. J.; MILLS, R. T. Sodium per-oxide bleaching of mechanical pulps. **Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, v. 27, p. 364-370, 1944.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 54, p. 2-18, 2011.

ROCHA, G. J. M. et al. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1997. v. 5.

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROSA, S. M. L. **Isolamento de nanocristais de celulose de resíduos agrícolas e emprego em nanocompósitos de polipropileno**. 2012. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROSTRUP-NIELSEN, J. R. Making fuels from biomass. **Science**, v. 308, n. 5727, p. 1421-1422, 2005.

SAAD, M. B. W. et al. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 220-225, 2008.

SAENGER, M. et al. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, v. 23, p. 103-121, 2001.

SAKA, S.; GORING D. A. I. Localization of lignins in wood cell walls. In: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. Kyoto: Academic Press, 1985. cap. 3, p. 51-62.

SALES, F. G. et al. Experimental evaluation and continuous catalytic process for fine aldehyde production from lignin. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 18, p. 5386-5391, 2007.

SALES, F. G. et al. Kinetic evaluation and modeling of lignin catalytic wet oxidation to selective production of aromatic aldehydes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 20, p. 6627-6631, 2006.

SALES, F. G.; ABREU, C. A. M.; PEREIRA, J. A. F. R. Catalytic wet-air oxidation of lignin in a three-phase reactor with aromatic aldehyde production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 211-218, 2004.

SALGADO, P. R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

SALOMON, P. (1979) DEA Génfie Chimique, INP Grenoble. Quoted by Dardelet et al. (1985)

SAMUEL, R. et al. HSQC (heteronuclear single quantum coherence) ^{13}C – ^1H correlation spectra of whole biomass in perdeuterated pyridinium chloride-DMSO system: An effective tool for evaluating pretreatment. **Fuel**, v. 90, n. 9, p. 2836-2842, 2011.

SAMUEL, R. et al. Structural changes in switchgrass lignin and hemicelluloses during pretreatments by NMR analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 11, p. 2002-2009, 2011.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANDERSON, K. Lignocellulose: a chewy problem. **Nature**, v. 474, p. 12-14, 2011.

SANTOS, E. G. **Estudo da adsorção de contaminantes orgânicos provenientes da água de extração do petróleo, em coluna de leito fixo, utilizando biomassas como adsorventes**. 2005, 229p. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Campina Grande, Paraíba.

SANTOS, R. B. et al. Lignin structural variation in hardwood species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4923-4930, 2012.

SARAVANAKUMAR, S. S. et al. Characterization of a novel natural cellulosic fiber from Prosopis juliflora bark. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1928-1933, 2013.

SCALBERT, A. et al. Comparison of wheat straw lignin preparations I. Chemical and spectroscopic characterizations. **Holzforchung**, v. 40, n. 2, p. 119-127, 1986.

SCHRADER, J. et al. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 463-472, 2004.

SCHUCHARDT, U. L. F.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SCHULTZ, T. P.; TEMPLETON, M. C. Proposed mechanism for the nitrobenzene oxidation of lignin. **Holzforschung**, v. 40, n. 2, p. 93–97, 1986.

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SETTE, M.; LANGE, H.; CRESTINI, C. Quantitative HSQC analyses of lignin: a practical comparison. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 6, n. 7, p. 7, 2013.

SGRICCIA, N.; HAWLEY, M. C.; MISRA, M. Characterization of natural fiber surfaces and natural fiber composites. **Composites**, v. 39, n. 10, p. 1632–1637, 2008.

SHI, J.; LI, J. Metabolites and chemical group changes in the wood forming tissue of *Pinus koraiensis* under inclined condition. **Bioresources**, v. 7, n. 3, p. 3463-3475, 2012.

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali pretreated biomasses. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 353-362, 2012.

SILVA, O. F.; FURTADO, A. L.; CHALFOUN, S. M.; GELLI, D. S. **Análise de APPCC no controle da ocratoxina**. Seção artigos e projetos. Disponível em: <http://www.coffebreak.com.br>. Acesso em 25 jun. 2007.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SILVA, E. A. B. et al. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. **Chemical engineering research and design**, p. 1276-1292, 2009.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809–817, 2011.

SIM, F. S. et al. Computer-assisted analysis of Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectra for characterization of various treated and intreated agriculture biomass. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 5367-5380, 2012.

SINGH, R. et al. Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 1, p. 57–66, 2005.

SIXTA, H.; POTTHAST, A.; KROTSCHKE, A. W. Chemical Pulping process. In: SIXTA, H. **Handbook of pulp**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2006. cap. 4, p. 109-185.

SOUZA, J. A. **Utilização de lignina para obtenção de formulação de liberação controlada do ácido 2,4 diclorofenoxiacético**. 1994. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

SRIDHAR, P.; ARAUJO, J. D.; RODRIGUES, A. E. Modeling of vanillin production in a structured bubble column reactor. **Catalysis Today**, v. 105, n. 3-4, p. 574– 581, 2005.

STARK, K. et al. Oxidative depolymerization of lignin in ionic liquids. **Chemsuschem**, v. 3, n. 6, p. 719-723, 2010.

STICKLEN, B. M. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, 2008.

SUGARCANE, 2012. Disponível em:<<http://sugarcane.org/sugarcane-products/bioelectricity>>. Acesso em jul. de 2012.

SUN, R. C.; LAWOTHER, J. M.; BANKS, W. B. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 1-8, 1997.

SUN S. N. et al. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production. Part 1: structural characterization of the lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 570-577, 2013.

SUN, R. C. et al. Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, n. 1, p. 101-109, 2000.

SUN, R. C. et al. Structural and physico-chemical characterization of lignins solubilized during alkaline peroxide treatment of barley straw. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 7, p. 1399-1407, 2002.

SUN, R. C.; FANG, J. M.; TOMKISON, J. Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. **Industrial Crops and Products**, v. 12, n. 2, p. 71-83, 2000.

SUN, R.; LAWOTHER, J. M.; BANKS, W. B. The effect of alkaline nitrobenzene oxidation conditions on the yield and components of phenolic monomers in wheat straw lignin and compared to cupric(II) oxidation. **Industrial Crops and Products**, v. 4, n. 4, p. 241-254, 1995.

SUN, X. F. et al. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 97-106, 2005.

SUN, X. F. et al. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, p. 245-256, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, p. 472-499, 2007.

TARABANKO, V. E. et al. Influence of lignin origin on the efficiency of the catalytic oxidation of lignin into vanillin and syringaldehyde. **Russian Chemical Bulletin**, v. 2, p. 367-371, 1995.

TARABANKO, V. E. et al. On the mechanism of vanillin formation in the catalytic-oxidation of lignin with oxygen. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 55, n. 1, p. 161-170, 1995.

TARABANKO, V. E. et al. Production of the fine chemicals from hardwood. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM "CATALYTIC AND THERMOCHEMICAL CONVERSION OF NATURAL ORGANIC POLYMERS", 4., 2000. **Anais...** Krasnoyarsk: Russia, 2000. p. 77-80.

TARABANKO, V. E.; PETRUKHOV, D. Study of mechanism and improvement of the process of oxidative cleavage of lignins into the aromatic aldehydes. **Chemistry for Sustainable Development**, v. 11, p. 655-667, 2003.

TARABANKO, V. E.; PETUKHOV, D. V.; SELYUTIN, G. E. New mechanism for the catalytic oxidation of lignin to vanillaldehyde. **Kinetics and Catalysis**, v. 45, n. 4, p. 603-611, 2004.

TEJADO, A. et al. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1655-1663, 2007.

THIBAUT, J. F. ; ASTHER, M.; CECCALDI, B. C. Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 31, p. 530-536, 1998.

THIELEMANS, R.; WOOL, P. Butyrate Kraft lignin as compatibilizing agent for natural fiber reinforced thermoset composites. **Composites. Part A, Applied science and manufacturing**, v. 35, n. 3, p. 327-338, 2004.

TOLEDO, J. L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação do café**. Rio de Janeiro: ABIC, 1997. p. 11-67.

TORR, K. M. et al. Mild hydrogenolysis of in situ and isolated Pinus radiata lignins. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7608-7611, 2011.

TUCKER, M. P. et al. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn Stover and cellulase enzyme digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p.165-78, 2003.

TUOMELA, M. **Degradation of lignin and other ¹⁴C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi**. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química e Microbiologia) – University of Helsinki, Helsinki, Finlandia, 2002.

U. S. Department of Energy. Disponível em: <<http://genomics.energy.gov/gallery/gtl/detail.np/detail-36.html>>. Acesso em 15 de agosto de 2012.

UNICA, 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em 07 de julho de 2011.

UNICA, UNICADATA – Cana-de-açúcar. 2015. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem>>. Acesso em 26 de março de 2015

VALLS, R. G.; HATTON, T. A. Metal ion complexation with lignin derivatives. **Chemical Engineering Journal**, v. 94, p. 99-105, 2003.

VANDERGHEM, C. Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of Miscanthus giganteus lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1761-1770, 2011.

- VASCONCELOS, S. M. et al. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46-52, 2013.
- VAZQUEZ, G. et al. The influencing of pulping conditions on the structure of acetosolv Eucalyptus lignins. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 17, n. 1-2, p. 147-162, 1997.
- VILLAQUIRÁN, A. I. **Pulpeo de bagazo de cana por el proceso soda-antraquinona**. 1987. Tesis (Mestrado) - Facultad de Ciencias Florestales, Universidad de los Andes, Mérida, 1987.
- VILLAR, J. C.; CAPEROS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Oxidation of hardwood kraft-lignin to phenolic derivatives with oxygen as oxidant. **Wood Science and Technology**, v. 35, p. 245-255, 2001.
- VILLAR, J. C.; CAPEROS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Oxidation of hardwood Kraft lignin to phenolic derivatives. Nitrobenzene and copper oxide as oxidants. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 17, n. 3, p. 259-285, 1997.
- VIRMOND, E. et al. Characterisation of agroindustrial solid residues as biofuels and potential application in thermochemical processes. **Waste Management**, v. 32, p. 1952-1961, 2012.
- VOITL, T.; VON ROHR, P. R. Demonstration of a process for the conversion of kraft lignin into vanillin and methyl vanillate by acidic oxidation in aqueous methanol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 2, p. 520-525, 2010.
- WALTON, M.J.; MAYER; NARBAD, A. Molecules of interest: vanillin. **Phytochemistry**, v. 63, p. 505-515, 2003.
- WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; Narbad, A. Vanillin. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 505-515, 2003.
- WANG, H.; DE VRIES FRITS, P.; JIN, Y. A win-win technique of stabilizing sand dune and purifying paper mill black-liquor. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 488-493, 2009.
- WANGA, M.; LEITCH, M.; CHUNBA XU, C. Synthesis of phenol-formaldehyde resol resins using organosolv pine lignins. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 3380-3388, 2009.
- WEN, J. et al. Homogeneous lauroylation of ball-milled bamboo in ionic liquid for bio-based composites production. Part I: modification and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1491-1501, 2011.
- WEN, J. L. et al. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Methodology. **Materials**, v. 6, n. 1, p. 359-391, 2013.
- WIESENTHAL, T. et al. **How much bioenergy can Europe produce without harming the environment?** Copenhagen, Denmark: European Environment Agency, 2006.
- WILKINS, R. M. (Ed.). **Controlled delivery of crop protection agents, London**. London: Taylor and Francis, 1990. 322 p.
- WILKINS, R. M. Controlled-release delivery systems for pesticides. In: Scher, H. B. (Ed.). **Controlled-release granules, with emphasis on lignin-based methods**. New York: Marcel Dekker Inc., 1999. cap. 8, p. 195-218.

WOOD, T. M.; SADDLER J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods Enzymology**, v. 160, p. 3-11, 1988.

WU, G.; HEITZ, M.; CHORNET, E. Improved alkaline oxidation process for the production of aldehydes (vanillin and syringaldehyde) from steam-explosion hardwood lignin. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 33, p. 718–723, 1994.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, 1999.

XIANG, Q.; LEE, Y. Y. Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p.153-162, 2000.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye staw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, n. 2, p. 307-319, 2001.

XIAO, L. P. et al. Characterization of MWLs from *Tamarix ramosissima* isolated before and after hydrothermal treatment by spectroscopical and wet chemical methods. **Holzforschung**, v. 66, n. 3, p. 295-302, 2011.

XU, F. et al. Fractional isolation and structural characterization of mild ball-milled lignin in high yield and purity from *Eucommia ulmoides* Oliv. **Wood Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 211-226, 2007.

YAMAN S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Conversion and Management**, v. 45, p. 651-671, 2004.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5756–5762, 2008.

YANG, D. et al. Studies on the structural characterization of lignin, hemicelluloses and cellulose fractionated by ionic liquid followed by alkaline extraction from bamboo. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 141-149, 2013.

YE, L. et al. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 38-44, 2013.

YOSHIDA, L. M. **Extração de solúveis do café torrado**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

YUAN T.Q. et al. Characterization of lignin structures and ligninecarbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative ¹³C and 2D HSQC NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 10604-10614, 2011.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3552-3599, 2010.

ZHANG, J.; DENG, H.; LIN, L. Wet Aerobic Oxidation of Lignin into Aromatic Aldehydes Catalysed by a Perovskite-type Oxide: LaFe_{1-x}Cu_xO₃ (x=0, 0.1, 0.2). **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 2747-2757, 2009.

ZHBANKOV, R. G. et al. Structural physico-chemistry of cellulose macro molecules. Vibrational spectra and structures of cellulose. **Journal of Molecular Structure**, v. 614, n. 1-3, p. 117-125, 2002.